SILVIA LUCENA LAGE

**Papel de inflamassomas e vias lisossomais na morte celular e resposta imune
induzidas pela flagelina**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2015

SILVIA LUCENA LAGE

**Papel de inflamassomas e vias lisossomais na morte celular e resposta imune
induzidas pela flagelina**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientadora: Profa. Dra. Karina Ramalho
Bortoluci

Versão original

São Paulo
2015

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Lage, Silvia Lucena.

Papel de inflamassomas e vias lisossomais na morte celular e resposta imune induzidas pela flagelina / Silvia Lucena Lage. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Profa. Dra. Karina Ramalho Bortoluci.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Interação entre receptores da imunidade inata na ativação de macrófagos e células dendríticas.

Versão do título para o inglês: Role of inflammasomes and lysosomal pathway in cell death and immunity induced by flagellin.

1. Flagelina 2. Inflamassomas 3. Lisossomas 4. Sinalização da IL-1
5. Adjuvantes I. Bortoluci, Profa. Dra. Karina Ramalho II.
Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas.
Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB0149/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Silvia Lucena Lage.

Título da Tese: Papel de inflamassomas e vias lisossomais na morte celular e resposta imune induzidas pela flagelina.

Orientador(a): Profa. Dra. Karina Ramalho Bortoluci.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Presidente: Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

	<p>UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS</p> <p>Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011)3091-8405 e-mail: cep@icb.usp.br</p>
<p>COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</p>	

Decl. CEUA-038/ICB/USP

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 109/07/CEUA, datado de 06.12.07, por solicitação da Profa. Dra **Karina Ramalho Bortoluci**, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão da aluna **SILVIA LUCENA LAGE** ao Projeto de Pesquisa "*Papel dos receptores do tipo Toll e do tipo NOD-LRR na ativação metabólica e funcional de macrófagos*", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao referido certificado.

São Paulo, 23 de setembro de 2011.

Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima
Coordenador da CEUA
ICB/USP

Esta tese é dedicada aos meus avós
e a todos os meus professores.

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo, agradeço a Deus por suprir todas as minhas necessidades durante essa caminhada.

À minha querida mãe por ter aceito o desafio de ser mãe em vez de ser avó e ter desempenhado esta tarefa com tanta dedicação e carinho! Obrigada pelos sacrifícios e por tudo que sempre fez e continua fazendo por mim!

Ao meu avô, por todo o amor, carinho e dedicação durante todas as etapas da minha vida. Por ter me ensinado o bom caminho pelo exemplo, por ter estado ao meu lado em todos os momentos e por ter acreditado e lutado tanto pelos meus sonhos. A você devo a construção dos meus valores!

Ao meu pai, que apesar da distância sempre me deu muito amor, amizade, carinho e sempre demonstrou toda a sua preocupação em todos os momentos da minha vida. Obrigada por estar ao meu lado nas etapas difíceis e por compartilhar comigo as minhas alegrias.

A minha tia Sônia pelo grande apoio e incentivo em todas as etapas da minha vida. Um obrigado especial por cuidar das minhas “jóias preciosas”!

Aos queridos tios Roberto e Cláudia que são os responsáveis pela realização deste sonho de vir para a USP. Não há palavras para agradecer tudo o que vocês têm feito por mim. Obrigada por “adotarem mais um filha”. Que Deus abençoe vocês imensamente!

Ao Eduardo, por compartilhar minhas alegrias e tristezas com o mesmo apoio firme e carinhoso. Obrigada por toda a ajuda durante essa jornada, e, acima de tudo, pelo seu companheirismo, compreensão e carinho. Agradeço a Deus por ter colocado você ao meu lado na caminhada da vida. Te amo!

As minhas queridas “irmãs” Gláucia e Natália que, apesar da distância, permaneceram ao meu lado nos momentos mais difíceis, ajudando a superar as dificuldades e tropeços de mais essa etapa importante da minha vida. Obrigada por essa amizade tão bonita! Lá se vão 11 anos...espero os próximos! Natália, um obrigado especial por ter me dado esse presente que é o Nicolas! Espero estar a

altura de tamanha responsabilidade!

Agradeço à minha orientadora e amiga Dr^a Karina Bortoluci pelo voto de confiança em mim depositado, pela amizade e pela orientação durante cada etapa deste trabalho. Muito obrigada pela dedicação, compreensão e apoio, e por ter contribuído tanto para o meu crescimento profissional e pessoal.

Ao Dr^o Gustavo Amarante-Mendes. Obrigada por todo o apoio científico e acadêmico durante essa caminhada.

Obrigada aos queridos companheiros do laboratório: Laura, Kelly, Aline, Gabi, Babi e Marcelo, pela parceria e amizade. Kelly, minha filhota, muito obrigada por toda a sua ajuda na realização de algumas etapas importantes para a construção deste trabalho. Você vai longe e vou ficar muito orgulhosa! Laurinha, muito obrigada por toda a sua ajuda, pelas caronas, pelas conversas, por você ser essa pessoa especial que se tornou essa amiga tão querida! Aline, “é nós, mano”! Estou contando contigo para a realização “daqueles” planos!! Gente, eu sei o quanto vocês torcem por mim e eu espero que saibam o quanto eu torço por cada um de vocês. Vamos que vamos!

Muito obrigada às pessoas que já fizeram parte do lab e que contribuíram para a minha trajetória e para este trabalho: Thaís, Carla, Virgínia, Bruna e Danny.

Um obrigado especial às queridas amigas Carininha e Alê. Obrigada por estarem ao meu lado nos momentos bons e principalmente, nos momentos difíceis, pelos conselhos e pela repreensão quando necessário. Obrigada por todo o apoio que sempre recebi e por tudo o que pude aprender com vocês! Com certeza, vocês são grandes “culpadas” por eu ter chegado até aqui. Muito obrigada!

Muito obrigada a prof^a Maria Regina D’Império Lima e aos amigos do laboratório da Imunologia das Parasitoses pela amizade, pela mão estendida sempre, por contribuírem de forma tão significativa para a superação de momentos importantes desta caminhada.

Agradeço ao prof^o Maurício Rodrigues a quem dedico profundo respeito e admiração. Muito obrigada pelo incentivo, professor! Foi um privilégio! E muito obrigada a todos os alunos que fazem, ou que fizeram parte do laboratório de

Desenvolvimento de Vacinas Recombinantes contra Protozoários Patogênicos da UNIFESP: Profº Ronnie, Mariana, Jonatan, Fernando, Ramon, Camila, Laís, Ariane, Adriano, Letícia, Mônica, Cibele, Marina, Priscila, Bárbara, Leonardo e Luciana, por me receberem com tanto carinho e por todo o apoio que sempre me deram. Mari, Nando e Ramon, os nossos cafés filosóficos foram incríveis! Muito obrigada por compartilharem esses momentos tão enriquecedores!

Agradeço ao Profº Drº Alan Sher por me receber tão carinhosamente em seu laboratório, abrindo assim as portas para essa experiência no exterior, que foi fundamental na minha caminhada e a todos os seus alunos, técnicos e pesquisadores que me deram um suporte incrível. Um agradecimento especial às pesquisadoras e amigas Dragana Jankovic e Mahtab Moayeri que gentilmente discutiram ciência comigo, sempre dispostas a ajudar, não só com reagentes, mas compartilhando o seu tempo e conhecimento científico. Ao pesquisador e amigo Nicolas Riteau por todo o apoio pessoal e profissional.

A amiga Maria Eni, pelas conversas, conselhos e por toda a sua ajuda tão importante para a concretização deste trabalho.

Ao João, técnico do biotério e à Ivanete, técnica do nosso laboratório. Os meus profundos agradecimentos!

As secretárias do departamento de Imunologia pela ajuda sempre que necessário.

Aos órgãos de apoio científico CNPq, CAPES e FAPESP.

Aos membros da banca por aceitarem participar deste momento tão importante da minha vida.

A todos vocês, muito obrigada!

Trabalho realizado no laboratório de Imunobiologia Molecular e Desenvolvimento de Vacinas Recombinantes contra Protozoários Patogênicos do Centro de Terapia Celular e Molecular da Universidade Federal de São Paulo, sob orientação da Profa. Dra. Karina Ramalho Bortoluci. Projeto Financiado pela CAPES, CNPq e FAPESP e realizado com bolsa de doutorado FAPESP, nº. 2011/508002-0

“Mar calmo não faz bom marinheiro”

sabedoria popular

“Não importa quantos cisnes brancos você veja ao longo da vida; isso nunca lhe
dará certeza de que cisnes negros não existem”

Karl Popper

RESUMO

Lage SL. Papel de inflamassomas e vias lisossomais na morte celular e resposta imune induzidas pela flagelina. [tese (Doutorado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

A flagelina é um agonista natural dos sensores TLR e NLR que vem sendo investigada como adjuvante em diferentes estratégias vacinais. O reconhecimento da flagelina é compartilhado pelo TLR5 e pelo complexo inflamassoma NAIP/NLRC4. Os inflamassomas são responsáveis pela secreção das citocinas IL-1 β e IL-18 e pela indução de um processo de morte celular denominado de piroptose, via ativação da caspase-1. Entretanto, a regulação molecular da ativação do inflamassoma em resposta à flagelina, bem como os mecanismos envolvidos na sua propriedade imunoestimulatória ainda são pouco compreendidos. Nós avaliamos a ativação de macrófagos em resposta à flagelina de *B. subtilis* inserida em vesículas lipídicas (DOTAP), que permitem a sua liberação no citosol, assim como o impacto deste estímulo para a morte celular. Utilizando esta abordagem, nós observamos a indução de um processo de morte celular atípico nos macrófagos peritoneais (PMs) deficientes nos componentes dos inflamassomas (NLRC4, ASC e caspase-1/11). Apesar da ausência de IL-1 β , a morte dos PMs manteve seu resultado inflamatório e antimicrobiano, sendo esta acompanhada da liberação da citocina IL-1 α . Este processo foi regulado por uma via lisossomal, especialmente pelas catepsinas B e D. Ainda, a catepsina B pareceu regular a secreção das citocinas IL-1 α e IL-1 β , mediada por caspase-1, sugerindo uma cooperação entre a via lisossomal e os inflamassomas nas respostas induzidas por flagelina. Uma vez que a flagelina de *S. typhimurium* é a mais empregada como imunógeno, nós investigamos sua habilidade em ativar os PMs na ausência de DOTAP como carreador. De maneira similar, as células estimuladas com a flagelina livre de *S. typhimurium* foram capazes de induzir dano lisossomal e secreção de IL-1 α e IL-1 β . A secreção destas citocinas pela flagelina foi mediada pelo eixo caspase-catepsinas, mostrando sua habilidade em ativar o inflamassoma e a via lisossomal na ausência de sistemas de transfecção. Ao avaliarmos o impacto desta via para a geração de resposta imune adaptativa, nós observamos que células dendríticas derivadas da medula óssea (BMDCs) estimuladas com flagelina foram capazes de induzir produção de IFN- γ e IL-17 por células T antígeno-específicas em resposta ao peptídeo da ovalbumina (OVA). A secreção dessas citocinas parece ocorrer de maneira independente de TLR5, porém dependente de caspase-1/11, NLRC4 e da produção de IL-1 α pelas BMDCs, indicando que o efeito adjuvante da flagelina é dependente da via de sinalização da IL-1 mediada pelo inflamassoma e pela via lisossomal. De acordo com isso, resultados preliminares mostram que a flagelina é capaz de induzir aumento dos títulos de anticorpos para OVA co-administrada, *in vivo*, de uma maneira dependente de caspase-1/11 e NLRC4. Assim, nossos achados abrem novas perspectivas com relação às vias que regulam a ativação do inflamassoma em resposta à flagelina e à geração de estratégias vacinais baseadas nestes sensores.

Palavras-chave: Flagelina. Inflamassomas. Lisossomas. Sinalização da IL-1. Adjuvantes.

ABSTRACT

Lage SL. Role of inflammasomes and lysosomal pathway in cell death and immunity induced by flagellin. [Ph. D. thesis (Immunology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

Flagellin is a natural agonist of TLR and NLR sensors that has been extensively investigated as an adjuvant in multiple vaccine strategies. Innate immune recognition of flagellin is shared by transmembranic TLR5 and cytosolic NAIP/NLRC4 inflammasome complex. Inflammasomes are responsible for the induction of the pro-inflammatory cytokines IL-1 β and IL-18 and induction of necrotic cell death named pyroptosis, responses mediated by caspase-1. However, the molecular regulation of inflammasome activation in response to flagellin, as well as the mechanisms involved in its immunomodulatory properties are still poorly understood. We first evaluated macrophage activation and cell death in response to flagellin from *B. subtilis* inserted into lipid vesicles (DOTAP), which allows its delivery to cell cytosol. By using this approach, atypical cell death induction was found in peritoneal macrophages (PMs) from mice deficient in the inflammasome components (NLRC4, ASC and caspase-1/11). In this context, despite the absence of IL-1 β secretion, inflammasome-independent cell death in response to flagellin retained its inflammatory and antimicrobial features, being accompanied with IL-1 α secretion. Importantly, inflammasome-independent cell death in response to flagellin was regulated by a lysosomal pathway with the participation of cathepsins B and D. Furthermore, cathepsin B also regulated caspase-1-dependent IL-1 α and IL-1 β secretion in response to flagellin, suggesting a cooperation between the inflammasome and lysosomal pathway. Since flagellin from *S. typhimurium* is extensively studied as immunogen, we investigated its ability to activate PMs in the absence of DOTAP as a carrier, and the impact of those stimuli to the adaptive immune response. Similar to observed with *B. subtilis* inserted into lipid vesicles, cells stimulated with free flagellin from *S. typhimurium* were able to induce lysosomal damage and IL-1 α and IL-1 β secretion through a caspase-cathepsins-dependent manner, showing the ability of flagellin from *S. typhimurium* to activate cytosolic inflammasome and lysosomal pathways even in the absence of any delivery system. Moreover, LPS-primed bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs) stimulated with flagellin were able to induce IFN- γ and IL-17 production by antigen-specific T cells in response to OVA peptide (OVAp). Cytokine secretion by OVAp-transgenic CD4⁺ T cells seemed to be TLR5-independent but dependent on caspase-1/11, NLRC4 and IL-1 α , indicating that the improvement of the adaptive immune response induced by flagellin involves inflammasome/cathepsins-derived IL-1 signaling. Accordingly, preliminary results showed that flagellin was also able to elevate IgG responses to ovalbumin co-administrated, *in vivo*, in a caspase-1/11-NLRC4-dependent manner. Thus, our findings open new perspectives regarding the mechanisms that regulate inflammasome activation in response to flagellin and the generation of vaccine and therapeutic strategies based on inflammasomes.

Keywords: Flagellin. Inflammasomes. Lysosomes. IL-1 signaling. Adjuvancy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Moléculas que compõem os complexos inflamassomas	26
Figura 2. Classificação dos membros da família NLR	27
Figura 3. Inflamassomas melhor caracterizados até o momento	29
Figura 4. Representação esquemática da formação do complexo inflamassoma	30
Figura 5. Representação esquemática da estrutura da flagelina	42
Figura 6. O eixo NLRC4/ASC/Caspase-1/11 não é requerido para a indução de morte celular em resposta à flagelina	64
Figura 7. Diversas preparações de flagelinas citosólicas, mas não proteínas não relacionadas, induzem morte celular e secreção de IL-1 β ..	65
Figura 8. Macrófagos infectados com <i>S. typhimurium</i> sofrem morte celular dependente de flagelina, na presença ou ausência de caspase-1/11	68
Figura 9. A morte celular independente de caspase-1/11 induzida pela flagelina citosólica apresenta características morfológicas de apoptose.	73
Figura 10. A morte celular induzida pela flagelina citosólica não ativa a maquinaria apoptótica na ausência de caspase-1/11	75
Figura 11. Apenas flagelina citosólica induz perda da acidificação lisossomal e seus efeitos são independentes de NLRP3	80
Figura 12. Catepsinas lisossomais regulam a morte celular induzida pela flagelina	81
Figura 13. Catepsina B regula a produção de citocinas em resposta à flagelina	82
Figura 14. Os inflamassomas e a via lisossomal cooperam para as respostas do macrófago induzidas pela flagelina citosólica	83
Figura 15. FLiC-ST induz secreção de IL-1 β ativa por macrófagos	84
Figura 16. FLiC-ST induz dano no lisossoma e liberação do conteúdo lisossomal para o citosol celular	86
Figura 17. A produção de citocinas em resposta à flagelina ultrapura é regulada pela via lisossomal nos macrófagos peritoneais	88
Figura 18. Indução de resposta imune adaptativa por flagelina	90
Figura 19. Moléculas do inflamassoma participam da modulação do	

perfil de resposta imune humoral induzida pela flagelina	92
Figura 20. Caspase-1/11 e NLRC4, mas não TLR5 estão envolvidos na produção de IL-1 em resposta à flagelina	95
Figura 21. Caspase-1/11 e NLRC4, mas não TLR5 estão envolvidos na diferenciação de linfócitos T em resposta à flagelina	96
Figura 22. IL-1 α participa na diferenciação de linfócitos T em resposta à flagelina	97

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ActD - actinomicina D

AIM2 - do inglês, *Absent In Melanoma 2*

ANOVA - do inglês, *analysis of variance*

AO - do inglês, *acridine orange*

Apaf-1 - do inglês, *Apoptotic protease-activating factor-1*

ASC - do inglês, *Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*

BCG - do inglês, *Bacillus Calmette-Guérin*

BMDC - do inglês, *bone marrow-derived dendritic cells*

BMDM - do inglês, *bone marrow-derived macrophages*

CARD - do inglês, *caspase activating and recruitment domain*

CD - do inglês, *cluster of differentiation*

CFA - do inglês, Complete Freund's Adjuvant

C.S. - proteína do circumsporozoíta do *Plasmodium vivax*

CXCL 1 - do inglês, *C-X-C ligand 1*

CXCR2 - do inglês, *C-X-C chemokine receptor 2*

DAMP - do inglês, *Damage-associated molecular pattern*

DC - do inglês, *Dendritic Cells*

DMSO - dimetilsulfóxido

DNA – do inglês, *deoxyribonucleic acid*

DOTAP - N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium methyl-sulfate

EDTA - do inglês, *ethylenediamine tetraacetic acid*

ELISA - do inglês, *enzyme-linked immuno sorbent assay*

EtBr - do inglês, *ethidium bromide*

FLA-BSDot - flagelina nativa purificada de *B. subtilis* inserida no DOTAP

FLiCDot - flagelina nativa purificada de *S. typhimurium* inserida no DOTAP

FLiC-ST - flagelina nativa purificada de *S. typhimurium*

FLiC-STU - flagelina ultrapura nativa purificada de *S. typhimurium*

GM-CSF - do inglês, *granulocyte macrophage colony stimulating factor*

HA - hemaglutinina

HEPES - 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

HIV - do inglês, *Human Immunodeficiency Virus*

HMGB1 - do inglês, *high-mobility group box 1 protein*

ICE - do inglês, *IL-1 beta converting enzyme*

IFA - do inglês, Incomplete Freund's Adjuvant

IFN- γ - Interferon gama

Ig - Imunoglobulina

IL - Interleucina

i.p. - intraperitoneal

IPAF - do inglês, *ICE-protease-activating factor*

ISCOMs - do inglês, *immune stimulatory complexes*

LDH - do inglês, lactato desidrogenase

Leu-Leu-OMe - l-leucyl-l-leucine methyl ester

LMP - do inglês, *lysosomal membrane permeabilization*

LPS - Lipopolissacarídeo bacteriano

LRR - do inglês, *leucin rich repeat*

M-CSF - do inglês, *macrophage colony stimulating factor*

MDP - Muramil dipeptídeo

MHC - do inglês, *Major Histocompatibility Complex*

MOI - do inglês, *multiplicity of infection*

MPL - do inglês, *monophosphoryl Lipid A*

MTT - 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide

MyD88 – do inglês, *Myeloid differentiation factor 88*

NAIP - do inglês, *Neuronal apoptosis inhibitor protein*

NLR - do inglês, *Nod-like receptor*

NLRA - do inglês, *NLR containing the acidic transactivation domain (CIITA) domain*

NLRB - do inglês, *NLR containing the baculovirus inhibitory (BIR) domain*

NLRC - do inglês, *NLR containing the CARD domain*

NLRP - do inglês, *NLR containing the PYD domain*

NOD - do inglês, *Nucleotide-binding oligomerization domain*

NOD-LRR/NLR - do inglês, *Nucleotide-binding oligomerization domain – Leucin rich repeats*

O.D. - do inglês, *optical density*

OTI - TCR transgênico específico para o epítipo da ovalbumina restrito ao MHC classe I, SIINFEKL

OTII - TCR transgênico específico para o epítipo da ovalbumina restrito ao MHC classe II, pOVA 323-339

PAMP - do inglês, *Pathogen associated molecular pattern*

PBS - do inglês, *phosphate buffered saline*

PEC - do inglês, *peritoneal cavity*

PM - do inglês, *peritoneal macrophage*

PepVK210Dot - peptídeo da proteína CS do *P. vivax* inserido no DOTAP

PRR - do inglês, *Pathern Recognition Receptors*

PYHIN - do inglês, *pyrin e HIN domain-containing protein*

rFliCDot - flagelina recombinante de *S. typhimurium* produzida em uma cepa de *E. coli* (BL21DE) inserida no DOTAP

RFU - unidades relativas de fluorescência

ROS - do inglês, *reactive oxygen species*

rp24Dot - proteína recombinante p24 do vírus HIV produzida em uma cepa de *E. coli* (BL21DE) inserida no DOTAP

RPMI-1640 - meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute* - 1640

SFB - Soro fetal Bovino

SPF - do inglês, *specific-pathogen free*

ST - bactéria *S. typhimurium* selvagem

ST Δ Fli - bactéria *S. typhimurium* mutante, deficiente em flagelina

TCR - do inglês, *T cell receptor*

Th - do inglês, *T helper*

TLR - do inglês, *Toll-like Receptor*

TRIF - do inglês, *Toll-receptor-associated activator of interferon*

T3SS - do inglês, *Type III secretion system*

T4SS - do inglês, *Type IV secretion system*

UFC - Unidade Formadora de Colônia

WB - do inglês, *Western blotting*

WT - do inglês, *Wild type*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 Visão geral sobre o mecanismo de ação de adjuvantes vacinais	21
1.2 Ativação dos inflamassomas e suas consequências para a resposta imune	25
1.2.1 Formação e ativação dos inflamassomas	25
1.2.2 Breve histórico sobre as descobertas relativas à montagem e ativação do inflamassoma NAIP/NLRC4 em resposta à flagelina bacteriana	31
1.2.3 Mecanismos efetores mediados pelos inflamassomas	34
1.3 Propriedades adjuvantes dos agonistas de inflamassomas	40
1.3.1 A flagelina bacteriana como ferramenta vacinal	41
1.4 Justificativa	44
2 OBJETIVOS	46
2.1 Objetivo Geral	47
2.2 Objetivos Específicos	47
3 MATERIAL E MÉTODOS	48
3.1 Animais e cepas bacterianas	49
3.2 Flagelinas, peptídeos e outras proteínas utilizadas no estudo	49
3.3 Obtenção de macrófagos peritoneais	50
3.4 Obtenção de macrófagos e células dendríticas derivados da medula óssea	50
3.5 Transfecção de flagelinas, peptídeos e outras proteínas para o citosol celular	51
3.6 Tratamentos com inibidores	52
3.7 Detecção de citocinas por ELISA	52
3.8 Verificação da capacidade microbicida dos macrófagos.....	53
3.9 Ensaio de liberação de Lactato DeHidrogenase (LDH)	53
3.10 Marcação com laranja de acridina e brometo de etídeo	54
3.11 Ensaio fluorimétrico da atividade da caspase-7 e da caspase-9	55
3.12 Ensaio de atividade da caspase-1 e da catepsina B recombinantes...	55
3.13 Ensaio de Fragmentação do DNA	56

3.14 Western blotting (WB)	56
3.15 Avaliação de dano lisossomal	57
3.16 Ativação de linfócitos T <i>in vitro</i> por BMDCs.....	58
3.17 Regime de imunização de camundongos com ovalbumina e flagelina	58
3.18 Análise da resposta imune humoral	59
3.19 Análises Estatísticas	59
4 RESULTADOS	61
4.1 A inserção da flagelina bacteriana no citosol por meio de vesículas lipídicas induz morte celular de maneira independente do eixo Caspase- 1/11, NLRC4 e ASC	62
4.2 A morte celular induzida pela flagelina contribui para o controle da infecção por <i>S. typhimurium</i> , na presença ou na ausência de caspase-1	66
4.3 A morte celular independente de caspase-1/11 induzida pela flagelina, exibe características apoptóticas, mas não depende da atividade de caspases e mantém resultado inflamatório	69
4.4 Catepsinas lisossomais regulam a ativação do inflamassoma em resposta à flagelina citosólica	76
4.5 A flagelina purificada da bactéria <i>S. typhimurium</i> (FLiC-ST) induz secreção de IL-1 β ativa e perda de compartimentos lisossomais na ausência de vesículas de transfecção	84
4.6 A via dos inflamassomas parece estar envolvida na modulação do perfil da resposta imune celular e humoral induzida por flagelina de <i>S.</i> <i>Typhimurium</i>	88
5 DISCUSSÃO	98
6 CONCLUSÃO	112
REFERÊNCIAS	114
APÊNDICE A - Emerging concepts about NAIP/NLRC4 inflammasomes..	136
APÊNDICE B - Cytosolic flagellin-induced lysosomal pathway regulates inflammasome-dependent and -independent macrophage responses.....	148
APÊNDICE C - Evaluation of pyroptosis in macrophages using cytosolic delivery of purified flagellin	160

1.1 Visão geral sobre o mecanismo de ação de adjuvantes vacinais

A vacinação está entre as contribuições mais importantes para a saúde pública dos últimos 100 anos pela sua participação na redução do número de mortes por doenças infecciosas em todo o mundo (Levine, Levine, 1997). O uso da técnica de vacinação tem como objetivo induzir uma imunidade protetora de longa duração contra a doença resultante da exposição ao patógeno vivo, prevenindo assim doenças infecciosas clinicamente relevantes (Lambrecht et al., 2009). Uma das primeiras estratégias para induzir resposta imune adaptativa contra um agente infeccioso foi utilizada pelo médico inglês Edward Jenner após observar que pessoas que haviam tido contato com vacas contaminadas com um mal parecido com a varíola, tornaram-se imunes à doença humana. Assim, Jenner descobriu que a infecção com o análogo bovino da varíola, o qual chamou de *vacínia* (do latim, *vacca*), que causava a varíola bovina, fornecia imunidade protetora contra a varíola humana, sem o risco de causar doença. Jenner denominou o processo de vacinação e Pasteur ampliou o termo ao estímulo da proteção a outros agentes infecciosos (Ada, 2001).

Desta maneira surge a utilização de variantes patogênicas atenuadas dos organismos como vacinas, através da sua passagem em animais e microorganismos, o que permite a atenuação da sua virulência, mantendo a imunogenicidade. No entanto, em muitos casos, o uso de agentes patogênicos vivos pode não levar à uma vacina segura ou mesmo eficaz, como é o caso do vírus influenza, onde a infecção natural por si só não confere imunidade adequada a infecções posteriores (Coffman et al., 2010). Assim, outra abordagem utilizada para o desenvolvimento de vacinas consistiu no uso de componentes purificados destes organismos, como toxinas bacterianas e componentes da parede bacteriana ou do envelope viral.

Embora estas abordagens que compõem as chamadas primeira (organismos vivos atenuados) e segunda (componentes purificados) gerações de vacinas ainda sejam a base de muitas vacinas em uso, no começo deste terceiro século de vacinação, o advento de novas ferramentas da biologia molecular e da engenharia genética contribuiu para o desenvolvimento de modernas estratégias vacinais, tais como: rearranjo de genomas segmentados, proteínas recombinantes compostas de cepas atenuadas e genes de organismos patogênicos, vetores portadores de gene

exógenos, plasmídeos, vacinologia reversa, dentre outros (Plotkin, 2008). Entretanto, estas vacinas são, frequentemente, pouco imunogênicas e requerem componentes adicionais denominados adjuvantes, para ajudar a estimular resposta imune protetora. O objetivo dos adjuvantes (do latim, *adjuvare* que significa “ajudar”), é melhorar a magnitude da resposta imune a uma vacina, baseado no aumento do título de anticorpos e/ou no estímulo de células T efectoras, de modo que um microorganismo ou uma proteína ou polissacarídeo coadministrados, tornem-se mais imunogênicos (Coffman et al., 2010).

Adjuvantes de vacinas estão representados por diferentes classes de compostos como produtos microbianos, sais minerais, emulsões, micropartículas e lipossomas (Lambrecht et al., 2009). Os adjuvantes são misturados com o antígeno e, em geral, convertem antígenos proteicos solúveis em material particulado, o que ajuda a reter o antígeno no corpo e facilita sua ingestão por células apresentadoras de antígenos, como macrófagos e células dendríticas (DCs). Por exemplo, o antígeno pode ser absorvido por partículas do adjuvante (como o alumínio), ou particulado por emulsificação em óleos minerais, ou mesmo, incorporados em partículas coloidais de ISCOMs (do inglês, *immune stimulatory complexes*) (Alving et al., 1995; Kersten, Crommelin, 2003). Essa propriedade aumenta um pouco a imunogenicidade, porém, diversos estudos têm demonstrado que alguns destes adjuvantes que pareciam atuar primariamente como depósitos ou veículos de antígenos, na verdade, possuem propriedades imunoestimulatórias, ativando diretamente as células da imunidade inata. Além disso, com o objetivo de estimular o sistema imune, alguns adjuvantes são empregados em conjunto com extratos microbianos e produtos purificados de bactérias que possuem a capacidade de promover uma eficiente ativação da resposta imune inata, atuando sobre os macrófagos e DCs para que se tornem células apresentadoras de antígeno mais eficazes, capazes de dirigir uma potente resposta imune adaptativa (Maraskovsky et al., 2009; Marrack et al., 2009).

No entanto, os mecanismos responsáveis pelas propriedades imunoestimulatórias dos adjuvantes, ainda é um assunto bastante controverso. A maioria dos adjuvantes em uso foi desenvolvida de maneira empírica sem um claro entendimento sobre os mecanismos de ação celulares e moleculares envolvidos. Nesse contexto, a descoberta e caracterização dos receptores do tipo toll (*Toll-like Receptors*- TLRs) pareceu explicar o mecanismo através do qual essas moléculas

realizam sua atividade adjuvante. Os TLRs integram um grupo de receptores codificados pela linhagem germinativa, denominados receptores de reconhecimento de padrões (*Pattern Recognition Receptors*- PRRs) que reconhecem padrões moleculares que estão frequentemente associados a patógenos (*Pathogen associated molecular pattern* – PAMP) e que são distintos dos padrões apresentados por células próprias ou danos celulares (*Damage associated molecular pattern* – DAMP) (Kopp, Medzhitov, 2003).

Dessa maneira, muitos trabalhos têm demonstrado que a função adjuvante de uma forma geral resulta da habilidade destas estruturas em induzir produção de citocinas e maturação de DCs através da sinalização via TLR (Brewer, Alexander, 1997; De Becker et al., 2000; De Smedt et al., 1996; Medzhitov, 2001; Pasare, Medzhitov, 2005a; Shah et al., 2003; Yarovinsky et al., 2005). As DCs encontram-se amplamente distribuídas em diferentes tecidos periféricos, onde possuem um fenótipo imaturo, sendo especializadas na captação de antígenos por endocitose (Banchereau, Steinman, 1998; Hart, 1997; Inaba et al., 1993). Quando essas células se tornam ativadas, por exemplo, através do reconhecimento de PAMPs por TLRs, elas iniciam um processo de maturação e migram para a região paracortical de células T, no linfonodo, onde chegam como células maduras capazes de induzir a ativação e diferenciação de células TCD4⁺ e TCD8⁺ antígeno-específicas (Caux et al., 1994a; Cella et al., 1997a; Cella et al., 1997b; De Smedt et al., 1996; Inaba et al., 1993; Pure et al., 1990; Reis et al., 1993; Romani et al., 1989). Posteriormente, as células TCD4⁺ diferenciadas fornecerão a ajuda necessária para a troca de classe de células B e indução de células plasmáticas de longa duração, promovendo assim uma eficiente resposta imune humoral (Sornasse et al., 1992).

A excepcional capacidade das DCs em ativar os linfócitos T, reflete várias mudanças que ocorrem durante o processo de maturação e ativação destas células, incluindo: i) aumento da expressão de moléculas co-estimuladoras, como CD40, CD80 e CD86 (Caux et al., 1994b; Inaba et al., 1994), ii) liberação de citocinas como IL-12 (Cella et al., 1996; Koch et al., 1996), iii) resistência à imunossupressão mediada por IL-10 (Thurner et al., 1999) e iv) expressão de receptores de quimiocinas, como o CCR7, que leva as DCs às áreas de encontro com os linfócitos (Dieu et al., 1998; Sallusto et al., 1998; Tang, Cyster, 1999; Yanagihara et al., 1998). Importante, as DCs maduras aumentam a expressão de moléculas do MHC (do inglês, *Major Histocompatibility Complex*) de classe I ou classe II (MHC-I ou MHC-II)

na superfície celular e complexos funcionais compostos de MHC e peptídeos, que encaixam no TCR dos linfócitos T (Cella et al., 1997a; Pierre et al., 1997), levando à apresentação eficaz de peptídeos imunogênicos derivados do processamento dos antígenos previamente encontrados.

Tal habilidade da sinalização via TLR em promover resposta imune adquirida via maturação das DCs, tem levado ao desenvolvimento de estratégias vacinais utilizando ligantes naturais ou agonistas sintéticos dos TLRs como adjuvantes. Assim, diversos ligantes de TLRs têm recebido destaque na literatura como potenciais adjuvantes, como por exemplo: monofosforil lipídeo A (MPL) e lipopolissacarídeo (LPS) presentes na parede de bactérias gram-negativas (ligantes do TLR4), seqüências de DNA ricas em CpG não metilados, presentes em bactérias e vírus (ligante de TLR9), RNA de fita simples/ imidazoquinolins (ligantes de TLR7/8) e a flagelina presente em bactérias móveis (ligante de TLR5) (Diebold et al., 2004; Fletcher et al., 2006; Hammerbeck et al., 2007; Kline et al., 1999; Pasare, Medzhitov, 2005b; Sanders et al., 2006).

Entretanto, o papel dos TLRs na resposta de anticorpos induzida por adjuvantes vem sendo questionado. Recentes estudos demonstraram que os TLRs e as moléculas envolvidas nas suas vias de sinalização intracelular não são sempre requeridos para a resposta humoral induzida por alguns adjuvantes clássicos (Eisenbarth et al., 2008; Gavin et al., 2006; Li et al., 2007; Sanders et al., 2009). Nemazee e colaboradores demonstraram que a função adjuvante de pelo menos quatro adjuvantes clássicos: Alum, Adjuvante Completo de Freund (CFA), Adjuvante Incompleto de Freund (IFA) e “Ribi”, que contém monofosforil lipídio A, um potente ativador de TLR4, não são afetadas em animais deficientes em ambas as moléculas adaptadoras dos TLRs, MyD88 (*Myeloid differentiation factor 88*) e TRIF (*Toll-receptor-associated activator of interferon*) incapazes de transmitir sinais dos receptores TLRs (Gavin et al., 2006). Quando desafiados, esses animais montam uma robusta resposta de anticorpos contra antígeno dependente de linfócitos T administrado em conjunto com cada um desses conhecidos adjuvantes. Uma vez que a resposta imune humoral ocorre na ausência de sinalização via TLRs, é possível que sinais oriundos da imunidade inata não-mediados pelos mesmos, estejam envolvidos no aumento das respostas de anticorpos. Nesse sentido, uma nova família de receptores de ativação da imunidade inata vem sendo estudada e será apresentada nas sessões posteriores.

1.2 Ativação dos inflamassomas e suas consequências para a resposta imune

1.2.1 Formação e ativação dos inflamassomas

Recentemente, alguns PRRs que compõem um grupo de sensores citosólicos que formam os chamados complexos inflamassomas, têm sido implicados no mecanismo adjuvante independente de TLRs de alguns adjuvantes clássicos. Os complexos inflamassomas são compostos de maneira geral: 1) por uma proteína iniciadora pertencente a uma família de PRRs, podendo ser um sensor citosólico da família NOD-LRR (*Nucleotide-binding oligomerization domain – Leucin rich repeats – NLRs*), ou da família de sensores do tipo PYHIN (pyrin e *HIN domain-containing protein*); (2) por uma molécula adaptadora denominada ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase activating and recruitment domain (CARD)*) e 3) por moléculas efetoras, que são as proteases pro-caspase-1 ou pro-caspase-11 (correspondente a pro-caspase-4 em humanos) (Figura 1) (Bortoluci, Medzhitov, 2010; Broz, Monack, 2013; Broz et al., 2011).

Figura 1- Moléculas que compõem os complexos inflamassomas.

Os complexos inflamassomas em geral são formados por: um ou mais receptores PRRs das famílias NLR ou PYHIN, pela molécula adaptadora ASC e por caspases inflamatórias, que são as moléculas efetoras dos complexos formados. Adaptado de Strowing, Till et al. 2012.

O AIM2 (*Absent In Melanoma 2*) é o único membro da família PYHIN conhecido por formar inflamassomas. AIM2 responde à presença citosólica de DNA exógeno durante infecções bacterianas (Fernandes-Alnemri et al., 2010) ou virais (Rathinam et al., 2010). Em contrapartida, muitos membros da família NLR são bem conhecidos por formarem inflamassomas. Estas proteínas são formadas por três domínios: Um domínio central do tipo NBD ou NOD responsável pela oligomerização da proteína e comum a todos os membros, uma região C-terminal composta por sequências ricas em leucina, e uma porção N-terminal que é responsável pela especificidade das suas interações moleculares e, dessa maneira, pelas suas funções efetoras. Assim, de acordo com o seu domínio N-terminal, estas moléculas podem ser classificadas em NLRA (*NLRs containing the acidic transactivation domain (CIITA) domain*), NLRBs (*NLRs containing the baculovirus inhibitory (BIR) domain*), NLRCs (*NLRs containing the CARD domain*) e NLRPs (*NLRs containing the pyrin (PYD) domain*) (Ting et al., 2008a) (Figura 2).

Figura 2 - Classificação dos membros da família NLR.

A família NLR é composta de 22 membros que compartilham uma estrutura tripartida consistindo, da esquerda para a direita, em um domínio N-terminal, um domínio central do tipo NOD e um domínio C-terminal. De acordo com a natureza do domínio N-terminal, a família é subdividida em quatro sub-grupos NLRA, NLRB, NLRC, e NLRP (Zhong, Y. et al. 2013).

Juntamente com o inflamassoma formado pelo AIM2, os membros da família NLR: NLRP1, NLRP3 e NLRC4 formam os complexos melhor caracterizados (Figura 3). Em roedores, como camundongos e ratos, NLRP1 responde à presença citosólica da toxina letal do *Bacillus anthrax* (Faustin et al., 2007; Hellmich et al., 2012; Moayeri et al., 2010; Newman et al., 2010), enquanto o NLRP1 humano parece ser um sensor para muramil dipeptídeo (MDP), um componente do peptídeoglicano presente na parede de bactérias gram-positivas (Reubold et al., 2014). Além disso, a redução dos níveis de ATP citosólico, também foi reportado como ativador de NLRP1 (Hellmich et al., 2012).

Já o inflamassoma formado pelo NLRC4 responde a proteínas bacterianas presentes no citosol, como a flagelina (Franchi et al., 2006; Miao et al., 2006) ou as proteínas “needles” e “rod” do sistema de secreção bacteriano do tipo III (T3SS) (Kofoed, Vance, 2011; Lightfield et al., 2011; Zhao et al., 2011). A ativação de NLRC4, no entanto, requer sua associação com outro membro NLR da subfamília NAIP (*Neuronal apoptosis inhibitory protein*) (Kofoed, Vance, 2011; Zhao et al., 2011). Em resposta à flagelina, a ativação do inflamassoma NLRC4 requer a presença de NAIP5 ou NAIP6, enquanto NAIP1 e NAIP2 são responsáveis pela detecção das proteínas “needle” e “rod” do T3SS, respectivamente. Dessa maneira, as proteínas NAIP diretamente interagem com os agonistas e então recrutam

NLRC4 para formarem o complexo inflamassoma. O inflamassoma NAIP/NLRC4 é talvez o complexo inflamassoma mais estudado no que concerne a resistência à infecções. Seu envolvimento tem sido reportado no controle de infecções como *Salmonella typhimurium* (Mariathasan et al., 2004; Miao et al., 2010) *Legionella pneumophila* (Zamboni et al., 2006) *Pseudomonas aeruginosa* (Miao et al., 2008; Sutterwala et al., 2007), *Yersinia pestis* (Brodsky et al., 2010), *Shigella. flexneri* (Suzuki et al., 2007) e *Aeromonas veronii* (McCoy et al., 2010).

A proteína NLRP3, por sua vez, parece ser um sensor para uma ampla gama de estímulos de classes distintas, incluindo PAMPs e DAMPs (do inglês, *Damage-associated molecular pattern*). Já foram reportados com ativadores de NLRP3: dupla fita de RNA viral presente no citosol (Kanneganti et al., 2006), toxinas bacterianas formadoras de poro (Harder et al., 2009; Meixenberger et al., 2010; Ng et al., 2010), estruturas particuladas como os cristais de alum (Li et al., 2008) (Eisenbarth et al., 2008) e a sílica (Hornung et al., 2008) além de sinais oriundos de células danificadas como ácido úrico e o ATP (Spreafico et al., 2010). Uma vez que estas estruturas não são molecularmente correlacionadas, acredita-se que estes estímulos induzam vias intracelulares comuns, como produção de ROS (*Reactive oxygen species*) mitocondrial, ruptura lisossomal (no caso dos cristais) ou desbalanço iônico (como efluxo de potássio e influxo de Cálcio), que podem resultar em sinais intracelulares capazes de ativar NLRP3, diretamente, ou através de moléculas intermediárias ainda não caracterizadas (Tschopp, Schroder, 2010).

Figura 3 – Inflamassomas melhor caracterizados até o momento.

AIM2 responde à presença citosólica de DNA bacteriano. NLRP1 pode formar complexos com ASC, caspase-5 e caspase-1. Pouco se sabe sobre os agonistas que ativam este sensor. A toxina letal do bacillus Anthrax, MDP e diminuição do ATP citosólico já foram reportados. NAIP e NLRC4 formam juntos um inflamassoma e ativam a caspase-1 em resposta à flagelina bacteriana e às proteínas do complexo secretório T3SS. NLRP3, por sua vez, é ativado em resposta a uma ampla variedade de estímulos, incluindo PAMPs e DAMPs, sendo que o mecanismo exato pelo qual cada estímulo promove sua ativação ainda não está elucidado (Zhong, Y. et al. 2013).

As proteínas NLR são mantidas em um estado inibitório sob condições fisiológicas, devido ao arranjo conformacional do domínio LRR (domínio inibitório). Após perceberem a presença do agonista, estes sensores sofrem um rearranjo molecular que leva à homodimerização do sensor, através do seu domínio NBD. Dessa maneira, estas proteínas expõem seus domínios efetores permitindo interações heterodiméricas e a subsequente formação dos complexos oligoméricos. As proteínas que possuem o domínio efetor do tipo pyrin (PYD), como o NLRP3, recrutam a proteína adaptadora ASC, através de interações homotípicas PYD-PYD (Martinon et al., 2009; Schroder, Tschopp, 2010). ASC, por sua vez, contém um domínio C-terminal recrutador e ativador de caspase (CARD) que se liga e recruta a pró-caspase-1, via interações CARD-CARD (Broz et al., 2011; Martinon et al., 2007). Por outro lado, os sensores contendo domínio efetor do tipo CARD, como NLRC4, podem interagir diretamente com a pro-caspase-1 ou recrutarem o adaptador ASC, sendo capazes de formar, portanto, dois complexos inflamassomas distintos (Broz et al., 2011) (Figura 4).

Figura 4 – Representação esquemática da formação do complexo inflamassoma.

A presença de agonistas no citosol ou distúrbios intracelulares faz com que as moléculas de NLR saiam do estado inibitório para um estado ativado, devido à mudança na conformação do seu domínio LRR. Assim, são capazes de interagir com a molécula ASC através de interações homodiméricas PYD-PYD, ou, diretamente com a caspase-1, via interações CARD-CARD. Ocorre então a formação de um complexo macromolecular que permite a ativação da protease caspase-1 (Ting J. P.-Y. et al. Nat Rev Immunol. 2008).

A cisteíno-protease caspase-1 é expressa no citosol como um zimógeno inativo e a associação da pró-caspase-1 com o complexo inflamassoma permite o seu processamento e ativação (Martinon, Tschopp, 2007; Nicholson, 1999). Assim, após recrutamento para o interior da estrutura do inflamassoma, a pró-caspase-1 sofre ativação por auto-clivagem proteolítica tornando-se um heterodímero enzimaticamente ativo. Uma vez ativa, a caspase-1 medeia o processamento e ativação das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-18 que são geradas no citosol na forma de precursores inativos (Fantuzzi, Dinarello, 1999). Após clivagem pela caspase-1, essas citocinas se tornam biologicamente ativas e são liberadas para o meio extracelular. Além disso, a ativação de caspase-1 ou caspase-11 como resultado do engajamento de inflamassomas tem sido relacionada à indução de um processo de morte celular denominado de piroptose (Brennan, Cookson, 2000; Fink, Cookson, 2006; Kayagaki et al., 2011). Esta via de morte celular é exclusivamente dependente de caspase-1 e leva à rápida lise celular com liberação do conteúdo intracelular pró-inflamatório, que, juntamente com a liberação das citocinas IL-1 β e

IL-18 são responsáveis pela grande resposta inflamatória que acompanha este processo (Ting et al., 2008b).

1.2.2 Breve histórico sobre as descobertas relativas à montagem e ativação do inflamassoma NAIP/NLRC4 em resposta à flagelina bacteriana

O NLRC4 foi primeiramente descrito em 2001 como a proteína de mamíferos homóloga ao CED4 de *C. elegans*, cuja função era a de recrutar e ativar caspases através do seu domínio recrutador e ativador de caspases (CARD) (Geddes et al., 2001; Poyet et al., 2001). Devido a sua habilidade em ativar a caspase-1, previamente conhecida como “*interleukin-1-converting enzyme (ICE)*”, NLRC4 foi primeiramente chamado de IPAF (*ICE-protease-activating factor*). Embora o envolvimento do NLRC4 no controle de infecções já tivesse sido previamente reportado, a natureza dos seus agonistas permaneceu um mistério até o ano de 2006 quando foi demonstrado que o NLRC4 respondia à presença da flagelina bacteriana no citosol celular, o que contribuía para restringir a infecção por *S. typhimurium* (Franchi et al., 2006; Miao et al., 2006). Neste mesmo ano, estudos com *L. pneumophila* revelaram que outro membro da família NLR, o NAIP5, também era responsável pela detecção da flagelina citosólica, fato que contribuía para o controle da infecção (Molofsky et al., 2006; Ren et al., 2006).

A demonstração simultânea de que NAIP5 e NLRC4 desempenhavam papel no reconhecimento da flagelina, proporcionou a geração de um modelo que propunha a existência de dois inflamassomas distintos que pudessem reconhecer pequenas diferenças na estrutura da flagelina (Franchi et al., 2006; Ren et al., 2006). Com o advento do animal deficiente em NAIP5, Lightfield e colaboradores confirmaram o requerimento desta molécula para a ativação do complexo inflamassoma contendo NLRC4 em resposta à infecção com *L. pneumophila* de maneira dependente de flagelina (Lightfield et al., 2008). Entretanto, as respostas dos macrófagos mediadas por NLRC4 durante infecção com *S. typhimurium*, foram apenas parcialmente dependentes de NAIP5. Um trabalho subsequente do mesmo grupo revelou que o requerimento diferencial do NAIP5 em resposta às infecções por *S. typhimurium* e *L. pneumophila* não era devido à diferenças intrínsecas entre as duas flagelinas, uma vez que a ativação do inflamassoma NLRC4 frente à infecção com *L. pneumophila* expressando a flagelina de *S. typhimurium*

permaneceu sendo estritamente dependente de NAIP5 (Lightfield et al., 2011). Estes dados indicaram que outro agonista presente na *S. typhimurium* poderia ativar NLRC4, independente da presença de NAIP5. De fato, estes estudos confirmaram que o NLRC4 responde à presença da proteína PrgJ do sistema de secreção da *S. typhimurium*, independentemente de NAIP5, explicando desta maneira porque as respostas dos macrófagos mediadas por NLRC4 durante infecção com *S. typhimurium* eram apenas parcialmente dependentes de NAIP5.

A estrutura do inflamassoma formado por estes dois NLRs foi revelada apenas bem recentemente, quando dois grupos independentes propuseram um modelo para a montagem do complexo contendo NAIP5/NLRC4 (Kofoed, Vance, 2011; Zhao et al., 2011). Usando a transfecção dos componentes do inflamassoma e das moléculas microbianas em células HEK 293T seguido de ensaios bioquímicos, os autores demonstraram a habilidade das flagelinas de diferentes espécies bacterianas de se ligarem especificamente ao NAIP5. Essa interação foi dependente de três resíduos de leucina presentes na porção C-terminal da flagelina, confirmando dados anteriores (Lightfield et al., 2008). Ainda, após reconhecimento da flagelina, uma associação física entre NAIP5 e NLRC4 foi demonstrada, resultando na formação do complexo oligomérico. Experimentos de reconstituição usando variantes truncadas dos receptores demonstraram que os NAIPs estão upstream do NLRC4 e sugeriram que eles interagem via domínio NBD. Notadamente, NAIP6 funcionou de maneira similar ao NAIP5, induzindo oligomerização com NLRC4 após reconhecimento da flagelina, o que pode explicar a resposta de células deficientes em NAIP5 à altas concentrações de flagelina. Além disso, NAIP1 e NAIP2 também recrutaram NLRC4 em resposta às proteínas denominadas “needle” e “rod” presentes na estrutura do sistema de secreção do tipo III, respectivamente (Kofoed, Vance, 2011; Zhao et al., 2011).

Dessa maneira, estes dados demonstraram que as proteínas NAIPs são os sensores universais das flagelinas bacterianas e das proteínas do complexo secretório tipo III, enquanto o NLRC4 atua como adaptador do complexo, recrutando e ativando a caspase-1. É importante salientar que há apenas um NAIP funcional encontrado em humanos. Os primeiros estudos, utilizando a linhagem de monócitos humanos U937 sugeriram que o NAIP humano não era ativado pela flagelina, mas era capaz de detectar as proteínas needle dos sistemas de secreção tipo III, de maneira similar ao NAIP1 (Zhao, et al., 2011). Entretanto, um trabalho recente

demonstrou que macrófagos primários humanos são capazes de responder à flagelina (Kortmann et al., 2015). Os autores observaram que as linhagens de monócitos U937 e THP-1 não possuem o NAIP funcional para o reconhecimento da flagelina, o que explica a divergência com os dados obtidos previamente.

Apesar destas contribuições recentes para o entendimento da formação do inflamassoma NAIP/NLRC4, o requerimento molecular das proteínas bacterianas para a formação do complexo ainda requer maiores elucidações. Lightfield e colaboradores (2008) originariamente demonstraram que os 35 aminoácidos finais da porção C-terminal da molécula de flagelina era requerida para a ativação de NAIP5 (Lightfield et al., 2008). Além disso, a substituição de três resíduos de leucina por alaninas nesta região aboliu o potencial da flagelina em ativar NAIP5, fato também demonstrado por Zhao e colaboradores (2011). Entretanto, estes estudos foram baseados em construções contendo apenas o domínio C-terminal da estrutura da flagelina. Um estudo mais recente utilizando a flagelina inteira com ou sem esta região, demonstrou que embora os três resíduos de leucina sejam essenciais para a detecção da porção C-terminal, seu envolvimento é menos importante para o reconhecimento da flagelina inteira, uma vez que a flagelina inteira contendo a substituição as leucinas substituídas por alaninas ainda induz morte celular e formação do complexo inflamassoma, embora menos complexos sejam formados (Halff et al., 2012). De maneira interessante, embora a ausência da porção N-terminal não afete a habilidade da flagelina em interagir com NAIP5, construções contendo apenas este domínio também foram capazes de ativar NAIP/NLRC4. Dessa maneira, a interação molecular entre a flagelina e NAIP5/6 ainda requer maiores elucidações.

Além disso, embora a flagelina tenha sido encontrada dentro do complexo formado por NAIP/NLRC4, como demonstrado por imunoprecipitação do complexo e ensaios “*yeast two-hybrid*”, provendo a base para o modelo de interação direta entre NAIPs e flagelinas, ainda permanece em aberto a possibilidade de que distúrbios citosólicos induzidos pela presença das proteínas bacterianas no citosol, também possam contribuir para a ativação destes sensores, assim como é proposto para a ativação do inflamassoma NLRP3. De acordo com isso, um trabalho recente demonstrou que a fosforilação do NLRC4 na serina conservada 533, é crítica para ativação do inflamassoma após infecção com *S. typhimurium* e *L. pneumophila* ou transfecção de flagelina purificada (Qu et al., 2012). Um trabalho subsequente

demonstrou que a fosforilação da serina Ser533 do NLRC4 induzida pelas flagelinas de *S. Typhimurium* e *Y. enterocolitica*, ocorre independentemente de NAIP5, ASC e caspase-1, sugerindo que a detecção da flagelina pelo NAIP5 e a indução da fosforilação do NLRC4 em resposta à flagelina, são sinais independentes que convergem para a ativação do inflamassoma, uma vez que a caspase-1 não se ativa se um destes sinais falharem (Matusiak et al., 2015).

Apesar destas questões controversas, tem sido demonstrado até então em conformidade por diferentes grupos que a interação de NAIPs com seus ligantes e sua associação com NLRC4 induz mudanças conformacionais nestas moléculas que proporcionam sua oligomerização e ativação (Halff et al., 2012). Modelos preditos para a formação do inflamassoma NAIP/NLRC4 sugerem que estes complexos contêm um excesso de moléculas de NLRC4 para cada proteína NAIP e que as moléculas de NLRC4 sejam capazes de recrutarem e ativarem diretamente a caspase-1, via interações CARD-CARD, ou indiretamente, através das moléculas de ASC. Entretanto, foi demonstrado que apenas a associação da pro-caspase-1 com complexos contendo ASC, leva a sua clivagem auto-proteolítica, tornando-se um heterodímero enzimaticamente ativo capaz de processar as citocinas pro-IL-1 β e pro-IL-18 em citocinas maduras (Broz et al., 2011). Em contraste, os complexos que não contêm ASC ativam a caspase-1 sem auto-proteólise, o que é suficiente para a caspase-1 mediar ativação de substratos distintos, críticos para a indução de piroptose. Com base nestes dados, acredita-se que ambos os complexos, espacialmente distintos, sejam formados simultaneamente no citosol celular, após ativação de NAIP/NLRC4, levando à geração simultânea de citocinas inflamatórias e indução de morte do macrófago por piroptose (Broz et al., 2011).

1.2.3 Mecanismos efetores mediados pelos inflamassomas

Os mecanismos efetores mediados pela caspase-1, que foram melhor elucidados até o momento são a secreção das citocinas inflamatórias IL-1 β and IL-18 e a indução de piroptose (Franchi et al., 2012). O termo piroptose (do grego "*pyro*" significando fogo ou febre, e "*ptosis*" relacionado a uma "falha") foi cunhado em 2001 para descrever o processo de morte celular programada, porém, inflamatória, que ocorria com os macrófagos infectados com *S. typhimurium* (Cookson, Brennan, 2001). Os autores observaram que as mudanças morfológicas e

bioquímicas demonstradas pelas células mortas infectadas com *S. typhimurium* estavam mais relacionadas àquelas encontradas na necrose clássica do que às mudanças observadas durante apoptose, incluindo: 1) Fragmentação difusa do DNA na ausência de condensação da cromatina; 2) Perda precoce da integridade da membrana celular observada pela incorporação simultânea de anexina V com o corante impermeável iodeto de propídeo; 3) Liberação precoce da enzima citoplasmática Lactato Dehydrogenase (LDH), o que indica o extravasamento do conteúdo intracelular; e 4) Independência de qualquer caspase apoptótica (Brennan, Cookson, 2000). Embora as células morrendo por piroptose demonstrem características de necrose, com resultado inflamatório, os autores mostraram que este processo era altamente regulado pela caspase-1 ativa, uma vez que a adição do inibidor farmacológico da caspase-1 (z-YVAD-fmk) aboliu a morte do macrófago induzida por *S. typhimurium*.

A indução de piroptose por bactérias patogênicas depende de um sistema de secreção ativo que transloca proteínas bacterianas no citosol celular, como o sistema do tipo III (T3SS) de *S. typhimurium* e do tipo IV (T4SS) de *L. pneumophila* (Brennan, Cookson, 2000; Chen et al., 1996a; Franchi et al., 2006; Lundberg et al., 1999; Miao et al., 2006). Foi demonstrado que *L. pneumophila* (Amer et al., 2006) ou *P. aeruginosa* (Franchi et al., 2007; Miao et al., 2008) mutantes que perderam a expressão de flagelina falham em induzir ativação de caspase-1 e, dessa maneira, não são capazes de induzir piroptose e secreção de IL-1 β por macrófagos infectados. De acordo com isso, a transfecção de flagelina de *L. pneumophila* e *S. typhimurium* diretamente no citosol celular é suficiente para desencadear a formação de poros na membrana plasmática dependentes de caspase-1, com a subsequente morte por piroptose e secreção de IL-1 β (Fink, Cookson, 2006; Silveira, Zamboni, 2010). Além disso, infecção com a bactéria não flagelada *S. flexnerii* também induz piroptose mediada por NLRC4, em resposta ao componente rod do T3SS (Suzuki et al., 2007).

Embora os mecanismos moleculares que regulam a piroptose ainda não tenham sido completamente elucidados, o modelo de infecção com *S. typhimurium* tem nos trazido um importante conhecimento sobre este processo de morte celular. Enquanto a apoptose é mecanisticamente definida pelo requerimento de um subgrupo da família das caspases executoras, chamadas de caspases apoptóticas, como caspase-3, 6 e 9, a caspase-1 é a responsável pelas mudanças morfológicas

observadas na piroptose. De acordo com isso, sabe-se que a caspase-1 não está envolvida no processo de apoptose e camundongos deficientes em caspase-1 sofrem apoptose e se desenvolvem normalmente (Kuida et al., 1995; Li et al., 1995). Da mesma maneira, as caspases apoptóticas não estão envolvidas na piroptose e os seus substratos não sofrem proteólise durante a piroptose (Bergsbaken, Cookson, 2007; Brennan, Cookson, 2000; Chen et al., 1996b; Fink, Cookson, 2006).

A clivagem do DNA cromossomal, por exemplo, é um evento que frequentemente está associado à apoptose, onde ocorre a proteólise mediada por caspases do ICAD que libera a DNase CAD para o núcleo celular (Fink, Cookson, 2005). No núcleo, CAD cliva DNA entre nucleossomos, resultando nos fragmentos de DNA oligonucleossomais de aproximadamente 180pb, característicos da apoptose. Entretanto, o dano ao DNA também ocorre durante o processo de piroptose. Porém, na piroptose, não ocorre ativação de CAD. A clivagem de DNA durante a piroptose resulta da atividade de outra nuclease, ativada por caspase-1 e até hoje não identificada. Desta maneira, células sofrendo de piroptose não apresentam o padrão de fragmentação oligonucleossomal que é característica da apoptose, fato que pode ser utilizado para distinguir entre estes dois processos de morte celular (Bergsbaken, Cookson, 2007; Fink, Cookson, 2006; Lage et al., 2013).

Sabe-se que a lise celular durante a piroptose resulta de um processo finamente regulado pela atividade da caspase-1. Fink e Cookson (2006) demonstraram que a lise celular que ocorre durante a piroptose em macrófagos infectados com *S. typhimurium*, é um processo mediado pelas células hospedeiras que requer ativação de caspase-1 para gerar a formação de poros na membrana plasmática com um diâmetro funcional de 1.1 a 24nm. Mais recentemente, Silveira e Zamboni (2010) demonstraram que a formação de poros na membrana de células infectadas por *L. pneumophila* é um processo altamente regulado, dependente da atividade da caspase-1 a partir da ativação do inflamassoma NLRC4. Tem sido então proposto, que esses poros dissipam gradientes iônicos celulares, enquanto retêm constituintes citoplasmáticos maiores, levando à pressão osmótica líquida aumentada. Isso causa influxo de água, inchaço celular e posterior lise osmótica com liberação de conteúdo intracelular potencialmente inflamatório (Fink, Cookson, 2006; Silveira, Zamboni, 2010).

Há fortes evidências implicando a piroptose como um importante mecanismo de defesa do hospedeiro mediado por NAIP/NLRC4 que contribui para o *clearance*

de patógenos intracelulares, *in vitro*. A morte dos macrófagos infectados por piroptose parece correlacionar com a perda precoce do nicho intracelular de replicação bacteriana e alta carga bacteriana é recuperada dos macrófagos deficientes nos componentes do inflamassoma ou infectados com cepas bacterianas mutantes que falham em ativar o inflamassoma (revisado por (Bergsbaken et al., 2009; Bortoluci, Medzhitov, 2010; Lage et al., 2014)). Além disso, um estudo conduzido *in vivo* demonstrou que a lise dos macrófagos infectados mediada por flagelina e dependente de NLRC4, não apenas resulta na perda do nicho de replicação intracelular como também cria um ambiente inflamatório com recrutamento de células efectoras para o sítio de infecção, envolvidas no *clearance* (Miao et al., 2010). Embora os alvos das caspases-1/11 durante a piroptose permaneçam desconhecidos, os estudos envolvendo NAIP/NLRC4 fortemente contribuem para a idéia de que esta forma inflamatória de morte celular é um importante mecanismo efector da imunidade inata contra infecções.

As citocinas IL-1 β e IL-18 sofrem ativação pela caspase-1 e sua liberação acompanha o processo de piroptose. A IL-1 foi a primeira citocina identificada e tem sido relacionada a vários processos inflamatórios. Esta citocina desempenha um papel em virtualmente todas as células e órgãos, desde febre e resistência à microorganismos, até ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) (Dinarello, 2010; Dinarello, 2009; Gabay et al., 2010; Sims, Smith, 2010; Van der Meer et al., 1988). A citocina IL-18 foi primeiramente descrita em 1989 como um potente fator indutor de IFN- γ e é um importante componente da polarização de respostas T *helper* (Th)1 e M1 (Bastos et al., 2007; Nakanishi et al., 2001; Siegmund et al., 2001). Macrófagos, monócitos, linfócitos, queratinócitos, microglia, neutrófilos, células dendríticas e outras células são descritas como importantes fontes de IL-1 e IL-18 (Berda-Haddad et al., 2011; Carta et al., 2013; Dinarello, 2011; Mosley et al., 1987; Puren et al., 1999). As citocinas IL-18 e IL-1 β são processadas de maneira semelhante. Ambas são sintetizadas em uma forma inativa que requer processamento pela caspase-1 para tornarem-se citocinas biologicamente ativas (Dinarello, 1998; Martinon et al., 2002).

Embora amplamente estudadas, o mecanismo de liberação dessas citocinas não está completamente elucidado. Há algumas evidências de que o processo de formação de poros na membrana plasmática seja requerido para a liberação dessas citocinas. Foi demonstrado que a liberação de IL-1 β para o meio extracelular está

temporalmente relacionada com a formação de poros dependentes de caspase-1 na membrana de macrófagos durante infecção por *L. pneumophila* (Silveira, Zamboni, 2010). Além disso, foi demonstrado que a lise não é requerida para a liberação dessas citocinas uma vez que inibidores farmacológicos da lise celular não foram capazes de impedir a formação de poros nem a liberação dessas citocinas (Fink, Cookson, 2006). No entanto, mais recentemente, Cullen et al. (2015) demonstraram, utilizando um ensaio *single cell* que a IL-1 β secretada está associada apenas a células mortas (Cullen et al., 2015). Assim, a produção dessas citocinas de maneira concomitante ao processo de morte celular contribui para a resposta inflamatória elicitada pelas células que sofrem piroptose.

IL-1 β e IL-18 têm sido reportadas como importantes mediadores induzidos pelos inflamassomas no controle de infecções bacterianas, embora o mecanismo efetor preciso mediado pelas mesmas, ainda necessite de maiores elucidações (von Moltke et al., 2013). Camundongos deficientes em qualquer uma dessas citocinas infectados com *S. typhimurium*, apresentam números aumentados de bactéria nos órgãos infectados e morrem mais rapidamente que animais selvagens (Raupach et al., 2006). Foi demonstrado que mesmo após períodos extensos de infecção, o camundongo *knockout* para caspase-1 é incapaz de controlar a infecção por *Shigella* (Sansonetti et al., 2000). Com o uso de animais deficientes para IL-1 β e IL-18 demonstrou-se que a IL-1 β é a responsável pela intensidade da inflamação aguda observada pela infecção por *Shigella*, enquanto a IL-18 é a responsável por eliciar uma resposta antibacteriana efetiva.

Além disso, os efeitos da família IL-1 na ativação e diferenciação de linfócitos T são bem conhecidos (Ben-Sasson et al., 2009b) (Ben-Sasson et al., 2013a). A produção dos membros da família IL-1, especificamente, IL-1 β , IL-18 e IL-33, têm sido correlacionada ao estabelecimento de resposta imune adaptativa celular dirigida por linfócitos T CD4, em camundongos e humanos, sendo cada uma destas citocinas responsável pela diferenciação dos perfis de linfócitos Th17, Th1 e Th2, respectivamente (Chung et al., 2009; Dinarello, Wolff, 1993; Lasiglie et al., 2011) (Acosta-Rodriguez et al., 2007; Ohno et al., 2009).

Os linfócitos Th1 são uma fonte importante da citocina IFN- γ . Esta citocina desempenha um papel central na ativação de macrófagos, potencializando virtualmente todos os seus mecanismos microbicidas, como produção de intermediários reativos do oxigênio e nitrogênio e citocinas inflamatórias, e tem sido

implicada no controle de uma variedade de infecções bacterianas, fúngicas, virais e parasíticas (Mata-Espinosa, Hernandez-Pando, 2008). Além disso, o IFN- γ tem sido descrito como a citocina central da eficácia protetora da vacina BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*), a única vacina licenciada até o momento contra a tuberculose (Bergmann-Leitner, Leitner, 2014). Já as células Th17 (fontes de IL-17) têm sido implicadas na resposta protetora a bactérias extracelulares (Aujla et al., 2008; Chung et al., 2003), ao protozoário *Toxoplasma gondii* (Kelly et al., 2005) e a fungos (Huang et al., 2004). De acordo com isso, foi observado que a síndrome de hiper IgE, em humanos, onde ocorre um defeito no desenvolvimento de células produtoras de IL-17, leva a infecções recorrentes com bactérias extracelulares e fungos (Milner et al., 2008). Ainda, a produção de IL-17 também parece estar envolvida na indução de resposta imune protetora em camundongos vacinados com antígenos derivados de *M. tuberculosis* (Khader et al., 2007). Devido a sua grande capacidade de potencializar as respostas de linfócitos T, esta citocina vem sendo empregada como potencializadora de respostas a vacinas fracas e a via de sinalização da IL-1 tem sido considerada no desenvolvimento da nova geração de adjuvantes.

Além desses mecanismos classicamente descritos, outras funções efetoras, que podem operar de maneira independente das citocinas IL-1 β e IL-18 e da piroptose, têm sido relacionadas à atividade dos inflamassomas. Dentre elas, podemos citar: I) Indução da expressão de iNOS e produção de NO (Buzzo et al., 2010a). Essa via se mostrou um mecanismo efetor importante da imunidade inata, estando envolvida no controle da bactéria *L. pneumophila* (de maneira dependente do eixo NAIP5/NLRC4/caspase-1) e do protozoário *Trypanosoma cruzi* (de maneira dependente de NLRP3 e caspase-1) (Goncalves et al., 2013); II) Condução dos vacúolos contendo *L. pneumophila* para compartimentos lisossomais, o que permite a degradação do conteúdo vacuolar e, conseqüentemente, o controle da replicação bacteriana (Amer et al., 2006; Derre, Isberg, 2004; Fortier et al., 2007; Watarai et al., 2001). Esse processo é uma função efetora da caspase-1 através do processamento da caspase-7 (Akhter et al., 2009) ou abaixo da caspase-11 (Akhter et al., 2012); III) Biossíntese de mediadores lipídicos em resposta ao reconhecimento sistêmico de flagelina, levando à rápida morte do camundongo por perda do fluido vascular (von Moltke et al., 2012); IV) secreção ativa de DAMPs, como a alarmina IL-1 α e a proteína HMGB-1 (do inglês, *high-mobility group box 1 protein*) por mecanismos

ainda controversos (Fettelschoss et al., 2011; Gross et al., 2012; Keller et al., 2008; Lu et al., 2012; Nystrom et al., 2013).

1.3 Propriedades adjuvantes dos agonistas de inflamassomas

O inflamassoma NLRP3 parece estar envolvido em algumas propriedades de um dos adjuvantes mais bem estudados, o Alum. Diversos trabalhos demonstraram nos últimos anos, que os receptores TLRs através das proteínas adaptadoras MyD88 e TRIF, não são sempre requeridos para a indução de resposta imune humoral por Alum (Gavin et al., 2006; Li et al., 2007). A partir de então, muitos estudos observaram o envolvimento dos receptores NLRs na ativação do sistema imune induzida por Alum. Foi observado que partículas de alumínio formam cristais insolúveis que se agregam e são rapidamente fagocitados por macrófagos e DCs onde são capazes de estimular a produção de IL-1 β e IL-18, *in vitro* (Eisenbarth et al., 2008).

Utilizando camundongos deficientes em NLRP3 ou ASC demonstrou-se que, na ausência dessas moléculas, ocorre falha na liberação de tais citocinas por macrófagos e DCs após exposição à combinação Alum/LPS, *in vitro*, e redução na produção de IL1 β na cavidade peritoneal após injeção intraperitoneal de Alum, *in vivo* (Li et al., 2007; Kool et al., 2008). Eisenbarth e cols observaram ainda que camundongos deficientes em NLRP3, ASC ou caspase-1 possuem inflamação dependente de Th2 e produção de anticorpos IgG1 específicos para ovalbumina (OVA) significativamente diminuída após injeção intraperitoneal com ovalbumina/alum, em comparação com os animais selvagens. Em contrapartida, outros grupos observam apenas inibição parcial ou nenhuma inibição da imunidade celular e humoral na ausência dessas moléculas (Franchi, Nunez, 2008; Kool et al. 2008a).

Além disso, algumas moléculas de DAMPs que são ativadoras dos inflamassomas, também são empregadas como adjuvantes. O ácido úrico, produto da degradação de nucleotídeos, pode ser considerado um exemplo de adjuvante endógeno que é liberado do citosol de células danificadas (Shi et al., 2003). Os cristais de ácido úrico são capazes de ativar o inflamassoma NLRP3 (Martinon, Glimche, 2006), bem como interagir com CD14 e TLR2 (Liu-Bryan et al., 2005) e este parece ser um dos mecanismos de ação do Alum. O ácido úrico leva à

diferenciação de monócitos recrutados em DCs inflamatórias (Kool et al., 2008b) e é responsável pela indução de resposta imune humoral dependente de perfil Th2, em camundongos (Behrens et al., 2008). Outra proteína considerada um sinal de dano celular, o HMGB1, é uma proteína intracelular que se liga ao DNA e estabiliza nucleossomos. O HMGB1 foi primeiro identificado como um sinal de dano endógeno liberado por células necróticas com propriedades inflamatórias (Scaffidi et al., 2002) e estudos posteriores demonstraram sua função adjuvante (Lotze, Tracey, 2005). A adição de HMGB1 na imunização com antígenos solúveis aumentou a resposta de anticorpos a esses antígenos. Além disso, sobrenadantes de fibroblastos necróticos promoveram atividade adjuvante quando adicionados à imunização contra tumor, porém, tiveram sua ação diminuída para 50% quando um anticorpo neutralizante específico para HMGB1 foi utilizado ou quando foram utilizados fibroblastos deficientes em HMGB1 (Rovere-Querini et al., 2004).

1.3.1 A flagelina bacteriana como ferramenta vacinal

As sessões anteriores evidenciam a importância da ativação das células da imunidade inata por PRRs para a condução de uma resposta adaptativa eficaz. De acordo com isso, um agonista natural dos receptores TLR e NLR que vem sendo bastante investigado como adjuvante é a flagelina, a subunidade monomérica que polimeriza para formar o flagelo, estrutura presente em bactérias móveis. A flagelina é uma das poucas estruturas protéicas capazes de serem reconhecidas pelo sistema imune inato. Quando está presente no meio extracelular, a flagelina pode ser reconhecida pelo receptor transmembrânico TLR5 (Hayashi et al., 2001). Porém, esta proteína pode ser levada ao citosol através de sistemas de transporte presentes em bactérias virulentas, como o sistema de secreção do tipo III (T3SS) de *S. typhimurium* e do tipo IV (T4SS) de *L. pneumophila*, onde é capaz de induzir a formação do complexo inflamassoma NAIP/NLRC4 (Amer et al., 2006; Franchi et al., 2006; Zamboni et al., 2006; Lightfield et al., 2011; Kofoed et al., 2011; Zhao et al., 2011), levando à ativação da caspase-1. Notadamente, a ativação do inflamassoma pela flagelina citosólica ocorre independentemente da ativação do TLR5 e estes receptores reconhecem regiões distintas da flagelina. TLR5 interage especificamente com uma região presente no domínio D1 da proteína, enquanto as sequências de aminoácidos importantes para o reconhecimento de NAIP/NLRC4

encontram-se no domínio D0 da molécula (Hayashi et al., 2001; Lightfield et al., 2008) (Figura 5).

Figura 5 – Representação esquemática da estrutura da flagelina.

O receptor TLR5 e o inflamassoma NAIP5/NLRC4 interagem com domínios distintos da estrutura da flagelina (Adaptado de Half, E. 2012).

Os primeiros trabalhos que demonstraram a capacidade adjuvante da flagelina consistiam na inserção de sequências de peptídios heterólogos em sua estrutura, criando vacinas que foram efetivas em induzir resposta imune humoral na ausência de adjuvantes. Assim, foi demonstrado que a imunização de camundongos com a bactéria viva carregando o epítipo heterólogo da toxina colérica ou o epítipo da hemaglutinina (HA) do vírus influenza inseridos na flagelina foi capaz de induzir títulos de anticorpos contra a toxina e o epítipo viral, respectivamente (Newton et al., 1989). Além disso, a imunização com a flagelina recombinante isolada da bactéria também induziu altos títulos de anticorpos contra a HA, além de proteção do desafio com o vírus.

Utilizando esta abordagem, diversos trabalhos demonstraram as propriedades adjuvantes da flagelina no contexto de uma ampla variedade de vacinas recombinantes, utilizando antígenos de protozoários, virais e bacterianos, como *Schistosoma mansoni* (Ben-Yedidia et al., 1999), toxina colérica (Chauhan et al., 2005), vírus da influenza (Song et al., 2008; Adar et al., 2009), *Mycobacterium tuberculosis* (Le Moigne et al., 2008), *Plasmodium vivax* e *P. falciparum* (Bargieri et al., 2008). Nesses estudos, a imunização com flagelina foi capaz de ativar funções

do sistema imune inato, além de uma potente imunidade humoral e, em muitos casos, proteção de longa duração.

Ainda, foi demonstrado que a administração intranasal profilática de flagelina foi capaz de conferir proteção contra bactérias patogênicas respiratórias como *P. aeruginosa* (Yu et al., 2010) e *Streptococcus pneumonia* (Munoz et al., 2010). Notadamente, um trabalho recente demonstrou um efeito terapêutico potente da flagelina no combate à pneumonia (Porte et al., 2015). Foi observado que a administração de flagelina combinada à administração oral de antibióticos para tratamento de *S. pneumonia*, culminou na diminuição da carga bacteriana no pulmão e induziu proteção contra a disseminação bacteriana. Nestes três trabalhos, o efeito protetor da flagelina estava associado com o aumento na migração precoce de neutrófilos para as vias aéreas.

Estes trabalhos citados anteriormente, além de muitos outros, atribuem as propriedades adjuvantes da flagelina como resultado do seu reconhecimento por TLR5. Já foi demonstrado que a flagelina é capaz de induzir aumento na expressão de moléculas co-estimulatórias nas DCs, como CD80 e CD86, de MHC de classe II e CCR7, além da produção de citocinas, de maneira dependente de TLR5 (Means et al., 2003; Arimilli et al., 2008). Mais recentemente, utilizando uma flagelina conjugada à ovalbumina, foi demonstrado que a proliferação de células T específicas em resposta a um antígeno exógeno conjugado à flagelina é dependente da ativação de DCs via TLR5 (Bates et al., 2009). Entretanto, Sanders e colaboradores demonstraram que a ausência do receptor TLR5 não afetou substancialmente a habilidade da flagelina em promover resposta de anticorpos contra si própria, ou contra ovalbumina coadministrada durante protocolo de imunização (Sanders et al., 2009). Estes dados abrem espaço para um papel dos inflamassomas nas propriedades adjuvantes da flagelina.

De fato, esses autores mostraram que nem a ausência de TLR5, nem a ausência de NLRC4, influenciaram a habilidade da flagelina em promover resposta humoral contra si e contra a ovalbumina coadministrada. Entretanto, a perda simultânea da expressão de ambos os receptores, TLR5 e NLRC4, reduziu quase totalmente a resposta de anticorpos contra flagelina e praticamente aboliu a habilidade da flagelina em induzir resposta humoral para a ovalbumina, o que sugere papéis redundantes para estes receptores na habilidade imunoestimulatória da flagelina (Vijay-Kumar et al., 2010). No entanto, apesar do envolvimento do NLRC4,

que culmina na produção de IL-1 β e IL-18, não foi observada diferença estatística nos títulos de IgG específicos para flagelina em animais deficientes para a citocina IL-18 (Sanders et al., 2009) e para o receptor IL-1R1 (Sanders et al., 2008). Sendo assim, é provável que algum mecanismo adicional ao TLR5 e à produção dessas citocinas pelos inflamassomas contribua para o efeito adjuvante da flagelina, ainda que estas citocinas também possuam efeitos redundantes.

Portanto, apesar de bastante empregada na vacinação experimental, os mecanismos através dos quais a flagelina exerce suas funções adjuvantes, ainda são pouco conhecidos. Nesse sentido, a investigação das vias induzidas pelo reconhecimento da flagelina e suas consequências para a resposta imune pode promover importantes descobertas no campo.

1.4 Justificativa

De acordo com o que foi exposto anteriormente, a importância do eixo NAIP/NLRC4/caspase-1 em resposta à flagelina no controle de infecções e sua influência em processos inflamatórios e na ativação do sistema imune adquirido vem ganhando grande destaque na literatura, embora os mecanismos que orquestram sua ativação e função ainda não estejam bem elucidados. Uma vez que grande parte da literatura utiliza a infecção bacteriana ou proteínas recombinantes contendo apenas pedaços da molécula de flagelina como modelos experimentais, muitos dos mecanismos moleculares que regulam a ativação do inflamassoma e suas consequências para a resposta imune frente à flagelina como um agonista único e completo, ainda necessitam de maiores elucidações.

Na tentativa de verificar estes aspectos, nós investigamos a influência do reconhecimento intracelular da flagelina na ativação de macrófagos e regulação do processo de piroptose, utilizando para tanto uma abordagem bem estabelecida no nosso grupo (Buzzo et al., 2010a; Lage et al., 2013). Esta abordagem consiste na transfecção da flagelina purificada por meio de sua inserção em vesículas lipídicas chamadas de DOTAP. Esta é uma formulação lipossomal do lipídio catiônico DOTAP (N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium methyl-sulfate) (Roche Diagnostics, Penzberg, Wilhelm-Shongan, Germany), que permite a entrega de proteínas exógenas de carga negativa no citosol celular.

Esta ferramenta permite então a avaliação diferencial do reconhecimento extracelular da flagelina pelo TLR5 e intracelular pelos inflamassomas. Utilizando esta abordagem, dados prévios do nosso grupo demonstraram que a inserção da flagelina no citosol celular induz morte celular na ausência de caspase-1/11, ao contrário do que prevê a literatura, abrindo, assim, novas perspectivas em relação a vias citosólicas induzidas pela flagelina e ao envolvimento destas vias na ativação de mecanismos efetores induzidos por este agonista. Assim, a proposta inicial desta tese foi a de investigar detalhadamente as características morfológicas e moleculares dos processos de morte celular induzidos pela flagelina, e o potencial desse agonista em ativar a resposta imune.

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral desta tese foi investigar as bases moleculares que regulam a ativação dos inflamassomas em resposta à flagelina, bem como, o impacto destas vias na sua propriedade imunomoduladora.

2.2 Objetivos específicos

- I. Avaliar as características da morte celular induzida pela flagelina, sua regulação molecular e o impacto no controle da infecção por *S. Typhimurium* por macrófagos;
- II. Verificar as vias envolvidas na indução da resposta imune adaptativa por flagelina, no modelo de ativação de linfócitos TCD4⁺ transgênicos para ovalbumina (OTII).

3.1 Animais e cepas bacterianas

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade de São Paulo. Camundongos da linhagem C57BL/6 e *knockouts* para NLRC4, NLRP3, ASC e caspase-1/11, com 6-8 semanas de idade, mantidos em condições SPF (*Specific-pathogen free*), foram fornecidos pelo Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia (CEDEME) da Universidade Federal do Estado de São Paulo - UNIFESP. Camundongos *knockouts* para TLR5 e TLR2 e animais OTII (TCR transgênico específico para o epítipo da ovalbumina (OVA) restrito ao MHC classe II), com 6-8 semanas de idade, foram fornecidos pelo Biotério de camundongos isogênicos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo - USP. Nos experimentos realizados durante estágio no exterior, os camundongos C57BL/6 foram comprados da empresa Taconic Farms (Hudson, NY). As cepas de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. typhimurium*) LT2 foram originalmente obtidas do centro de estoque "Salmonella Genetic Stock Center" e gentilmente cedidas pelo prof. Luis Carlos de Souza Ferreira, do Departamento de Microbiologia, ICB-USP. As cepas obtidas incluem a cepa selvagem SGSC 1412, expressando flagelina (WT) e a cepa SGCS 2157, deficiente em flagelina (Δ Fli), e estas foram estocadas em meio Luria Bertani (LB), a -80 °C.

3.2 Flagelinas, peptídeos e outras proteínas utilizadas no estudo

As flagelinas nativas purificadas das bactérias *Bacillus subtilis* e *S. typhimurium*, de uso padrão ou a flagelina de *S. typhimurium* ultrapurificada por cromatografia de alta afinidade com anticorpo monoclonal anti-FliC (pureza >95%), foram adquiridas da empresa InvivoGen (San Diego, CA, USA), reconstituídas com água livre de endotoxina e estocadas a -20 °C. A flagelina recombinante da bactéria *S. typhimurium* utilizada *in vitro* e no protocolo de imunização, além da proteína do HIV, p24, foram produzidas no laboratório do prof. Luis Carlos de Souza Ferreira, da Universidade de São Paulo e gentilmente cedidas para a realização dos experimentos. As proteínas foram expressas em linhagem de *E. coli* (BL21 DE) e purificadas por cromatografia de afinidade, como previamente descrito (Bargieri et al., 2010; Bargieri et al., 2008). O peptídeo VK210 da proteína do circumsporozoíta

(C.S.) do *Plasmodium vivax* foi originalmente obtido da empresa GenScript (Piscataway, NJ, USA) e gentilmente cedido pelo prof. Maurício Martins Rodrigues.

3.3 Obtenção de macrófagos peritoneais

Os macrófagos peritoneais (PMs) foram obtidos por meio de lavado peritoneal realizado com 5 ml de PBS (do inglês, *phosphate buffered saline*) (1X) gelado, quatro dias após injeção intraperitoneal (i.p.) com solução de amido de batata (1%) (Sigma-Aldrich Aldrich, St. Louis, MO - USA) em PBS (1X) que foi administrada para o enriquecimento da população de macrófagos no peritônio. As células foram cultivadas em meio RPMI-1640 (meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute* – 1640) suplementado com 3% de soro fetal bovino (SFB) inativado (Sigma-Aldrich-Aldrich, St Louis, MO, EUA), 10 mM de HEPES, 1 mM de piruvato de sódio, 2 mM de L-glutamina e 100 unidades/ml de estreptomicina e penicilina (Invitrogen, Waltham, MA - USA) na concentração de 3×10^5 células/poço em placas de 96 poços (Corning, MA, EUA) ou 10^6 células/poço em placas de 24 poços exclusivamente para a realização dos experimentos de western blotting (WB) e fragmentação do DNA. As células permaneceram em cultura por 3-4 h para que a população de macrófagos fosse enriquecida por aderência. Após este período, as células não aderentes (linfócitos e hemácias) foram removidas por lavagem dos poços com meio RPMI-1640 morno e consideramos que, aproximadamente, metade das células totais plaqueadas permaneceram aderidas ($1,5 \times 10^5$ células/poço nas placas de 96 poços e 5×10^5 células/poço nas placas de 24 poços).

3.4 Obtenção de macrófagos e células dendríticas derivados da medula óssea

As células da medula óssea foram removidas dos fêmures dos animais através de lavado da medula utilizando 5 ml de meio RPMI 1640 incompleto com o auxílio de seringa de 5 ml e agulha de 24 G. A suspensão de células foi centrifugada a $300 \times g$, por 5 min e ressuspensa em meio completo para diferenciação. Para a obtenção de macrófagos derivados da medula óssea (BMDM), o meio consistiu em RPMI 1640 suplementado com penicilina (100 U/ml), streptomicina (100 µg/ml), 2-mercaptoetanol (50 µM), L-glutamina (2 mM), piruvato de sódio (1 mM), 10% de SFB e 30% de meio condicionado da cultura de células da linhagem de fibroblastos L929,

como fonte de M-CSF (do inglês, *macrophage colony stimulating factor*) previamente coletado. As células foram plaqueadas na concentração de 5×10^6 células por placa petri (Corning, MA, EUA), em 10 ml de meio para diferenciação, a 37°C e a 5% de CO₂, por 4 dias. Após esse período, foram acrescentados 10 ml de meio de diferenciação e as células foram incubadas até o 7° dia. Para a realização dos experimentos, os BMDMs foram retirados das placas utilizando PBS (1X) a 4°C, e cultivados em placas de 24 poços na concentração de 5×10^5 células/poço para a realização de WB ou avaliação de dano lisossomal por FACS.

Para a obtenção de células dendríticas (DCs) derivadas da medula óssea (BMDCs), as células da medula foram cultivadas na concentração de 10×10^6 células/placa petri em meio RPMI 1640 suplementado com penicilina (100 U/ml), streptomycina (100 µg/ml), 2-mercaptoetanol (50 µM), L-glutamina (2 mM), piruvato de sódio (1 mM), 10% de SFB e 20 ng/ml de rGM-CSF (do inglês, *granulocyte macrophage colony stimulating factor*) (R&D systems, Minneapolis, MN, EUA), por 4 dias. Após esse período, foram acrescentados 10 ml de meio para diferenciação e as células foram incubadas até o 7° dia, quando o sobrenadante (contendo as células de interesse) foi coletado para os experimentos de maturação e co-cultura. Para os estímulos *in vitro*, as DCs foram cultivadas em placas de 96 poços com fundo U (Corning, MA, EUA) (10^5 células/poço para a co-cultura e 3×10^5 células/poço para maturação somente), em meio RPMI completo, suplementado com 10% de SFB e foram primadas com LPS a 200 ng/ml por 3 horas antes do estímulo com flagelina como indicado nos resultados.

3.5 Transfecção de flagelinas, peptídeos e outras proteínas para o citosol celular

PMs ($1,5 \times 10^5$ células aderidas em placas de 96 poços) foram mantidos em cultura a 37 °C, sob atmosfera com 5% de CO₂, em meio RPMI-1640 suplementado conforme descrito acima. As células foram então cultivadas na presença das flagelinas purificadas de *B. subtilis* ou *S. typhimurium* na sua forma livre ou inserida no DOTAP (Roche Diagnostics, Penzberg, Wilhelm-Shongan, Germany), vesículas lipídicas catiônicas que permitem a liberação de proteínas exógenas no citosol celular (Simberg et al., 2004). A concentração das proteínas foi calculada a fim de

manter a mesma concentração molar. Dessa forma, 0,3, 1 ou 2×10^{-7} M correspondem a 1, 3 ou 6 $\mu\text{g/ml}$ da flagelina de *B. subtilis* e 1,8, 5,4 or 10,8 $\mu\text{g/ml}$ da flagelina de *S. typhimurium*. As proteínas VK210 e p24 também foram inseridas no DOTAP a uma concentração final de 0,38 $\mu\text{g/ml}$ e 2,75 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente, todas correspondentes a 10^{-7} M. O DOTAP foi usado de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, as proteínas purificadas foram adicionadas ao DOTAP (5 μL de DOTAP para cada 1 μg de proteína) na presença de uma solução de HBS (*HEPES-buffered saline*). A mistura foi homogeneizada gentilmente por 1 minuto e incubada à temperatura ambiente (TA) por 15 minutos a fim de estabilizar a formação dos complexos gerados espontaneamente. Após a incubação, o meio RPMI-1640 foi adicionado de acordo com os cálculos a fim de obter alíquotas com 200 μL (a uma concentração final de 0,3, 1 or 2×10^{-7} M) que foram adicionadas em cada poço contendo $1,5 \times 10^5$ macrófagos.

3.6 Tratamentos com inibidores

PMs foram cultivados na presença ou ausência do inibidor de pan-caspases Q-VD-fmk (20 μM), do inibidor da catepsina B, CA-074Me (25 μM), do inibidor da catepsina D, pepstatina A (25 μM) ou do inibidor da acidificação lisossomal bafilomicina A1 (20 nM), todos obtidos da empresa (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EUA). Os inibidores foram adicionados na cultura celular 1,5 h antes do estímulo. Para detecção de IL-1 β , BMDMs foram primadas com LPS (200 ng/ml) por 2 h, para indução das formas maduras dessas citocinas. Para avaliação do envolvimento das catepsinas na produção de citocinas, os macrófagos primados foram tratados ou não com CA-074Me ou pepstatina A (4, 20 or 100 μM) 1,5 h antes do estímulo. Para indução de apoptose, as células foram estimuladas com actinomicina D (ActD) (5 $\mu\text{g/ml}$).

3.7 Detecção de citocinas por ELISA

As citocinas IL-1 β e IL-1 α foram detectadas no sobrenadante das culturas por meio da técnica de ELISA (do inglês, *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) com o uso de kits obtidos da empresa BD (Becton Dickinson, Mountain View, CA, EUA), ou da empresa R&D System (Minneapolis, MN, EUA) de acordo com as instruções do

fabricante. As citocinas IFN- γ e IL-17 foram detectadas no sobrenadante das culturas por ELISA com o uso de kits obtidos da empresa e-bioscience (San Diego, CA, EUA).

3.8 Verificação da capacidade microbicida dos macrófagos

O método utilizado para verificar a capacidade microbicida de macrófagos frente à infecção por *S. typhimurium* (selvagem e mutante sem flagelina), *in vitro*, foi descrito por Franchi e col. (Franchi et al., 2006). Para serem utilizadas, as bactérias primeiramente foram descongeladas e semeadas em meio LB ágar por 1 dia para crescimento das colônias. Depois, uma das colônias foi recolhida e cultivada em meio LB líquido por 12 h sob agitação (200 rpm) a 37° C. Posteriormente, este caldo LB foi diluído 10 vezes, e, então, cultivado sob agitação por mais 4 h para obtenção das bactérias na fase exponencial, de acordo com a curva de crescimento padrão. As bactérias recuperadas na fase de crescimento exponencial (O.D._{600nm} de 0.55-0.75) foram utilizadas nos experimentos. Em resumo, macrófagos peritoneais provenientes de animais C57Bl/6 e *knockouts* para Caspase-1/11 foram incubados a 3×10^5 células por poço, em placa de 96 poços e estimulados ou não com *S. typhimurium* selvagem ou mutante (MOI 5:1, bactéria:macrófago), por 30 min a 37 °C. As placas contendo os macrófagos infectados foram centrifugadas a 1000 rpm por 10 min para permitir a mesma taxa de ingestão pelos macrófagos das bactérias selvagem e mutante, pois esta última não apresenta motilidade pela ausência de flagelo. Decorrido esse período de fagocitose, as culturas foram lavadas e incubadas com meio RPMI suplementado com gentamicina a 100 μ g/ml para eliminar o crescimento bacteriano extracelular. Após 1 h, o meio contendo gentamicina foi removido e deu-se início a contagem do tempo de infecção. Após 2, 6 e 24 h de infecção, as células foram lisadas com água estéril por 10 min, diluídas em meio LB e plaqueadas para determinação do número de colônias bacterianas. O número de unidades formadoras de colônias (UFC) contadas corresponde ao número de bactérias presentes nos macrófagos antes da lise celular.

3.9 Ensaio de liberação de Lactato DeHidrogenase (LDH)

O ensaio que quantifica a liberação da enzima citosólica Lactato

DeHidrogenase (LDH), indicativo de perda da integridade da membrana celular, é comumente utilizado para estimar o número de células não viáveis presentes em uma amostra. Utilizamos o Kit comercial da marca DOLES que realiza leitura colorimétrica no sobrenadante da cultura. Este ensaio é baseado na conversão de lactato em piruvato na presença de LDH com redução paralela de NAD em NADH. Brevemente, 50 µl do sobrenadante da amostra foi coletado e acrescido de 100 µl de solução de alúmen férrico e substrato, na proporção de 1 µl de alúmen férrico para 17 µl de Substrato, mantendo-se a 37 °C por 3 min. Após esse período, acrescenta-se 100 µl da solução de NAD e fenasina metasulfato, na concentração de 1 µl dessa solução para 20 µl de água destilada, mantendo-se a 37 °C por mais 5 min. A leitura foi realizada em espectrofotômetro de placa a 510 nm. Para a obtenção de um controle positivo, indicativo de lise máxima, foi utilizado controle com Triton 1%, e para um controle negativo, indicativo de lise mínima, o sobrenadante da cultura de macrófagos não estimulados ou tratados com a vesícula DOTAP sozinha. Dessa maneira, o cálculo da porcentagem de lise celular, diretamente proporcional à quantidade de LDH liberado no meio de cultura, foi realizado através da seguinte fórmula: $100 \times (\text{amostra} - \text{controle da amostra}) / (\text{controle positivo} - \text{controle negativo})$.

3.10 Marcação com laranja de acridina e brometo de etídeo

A viabilidade celular foi verificada por meio de marcação simultânea das células com os corantes laranja de acridina (*Acridine Orange* – AO) e brometo de etídeo (*Ethidium Bromide* – EtBr) (Sigma-Aldrich). Para tanto, o sobrenadante da cultura foi retirado e uma solução de PBS (1X) estéril contendo 50 µg/ml (v/v) de EtBr/AO foi adicionada à cultura celular. Desta forma, todas as células viáveis foram coradas com laranja de acridina enquanto apenas as células com poros ou ruptura total da membrana plasmática permitiram a difusão de Brometo de Etídeo para o interior do citosol. As imagens foram obtidas utilizando microscópio invertido de fluorescência e a porcentagem de células coradas com brometo de etídeo (que representam as células não viáveis), foi obtida com o auxílio do *software* ImageJ.

3.11 Ensaio fluorimétrico da atividade da caspase-7 e da caspase-9

A atividade da caspase-7 e da caspase-9 foi avaliada como descrito previamente (Brumatti et al., 2008). Brevemente, extratos celulares foram obtidos das culturas dos macrófagos estimulados com ActD (5 µg/ml) ou com FLA-BSDot (3 µg/ml), 4 h após estimulação. As células foram lavadas com PBS e recuperadas com o uso de tripsina 2mM (Gibco) em PBS. Quatro milhões de células foram lavadas com PBS estéril por centrifugação (250 x g, 5 min a 4 °C), e o *pellet* celular foi lisado com 50 µL de tampão de lise (150 mM NaCl, 20 mM Tris pH 7.5, 1% Triton X-100, 10 µg/ml leupeptina, 5 µg/ml aprotinina e 100 µM PMSF). Os lisados celulares foram incubados no gelo por 1 min seguido de 10 min de incubação a 4°C, e os sobrenadantes foram recolhidos após centrifugação a 15,000g por 15 min a 4 °C. 50 µL do lisado foi plaqueado em placa de 96 poços de fundo chato contendo 100 µL dos substratos fluorogênicos da caspase-7 (Ac-VDVAD-AFC, KAMIYA biomedical) ou da caspase-9 (Ac-LEHD-AFC, KAMIYA biomedical) a uma concentração molar final de 20 µM. O inibidor de pan-caspases z-VAD (R&D) e o inibidor específico da caspase-9 LEHD-FMK (KAMIYA biomedical) foram utilizados em amostras em duplicata como controle do ensaio de atividade das caspases. As amostras foram lidas em espectrofluorímetro (SpectroMax, GEMINI XS, Molecular Device, CA, USA) a 400 nm de excitação e 505 nm de emissão. Os resultados representam unidades relativas de fluorescência (RFU).

3.12 Ensaio de atividade da caspase-1 e da catepsina B recombinantes

A atividade da caspase-1 recombinante ativada (Sigma-Aldrich) e da catepsina B recombinante (Sigma-Aldrich) foi mensurada usando substratos fluorogênicos em um espectrofluorímetro F-7000 (Hitachi, Japan). A caspase-1 (0.1 unidades de enzima por reação) foi incubada em tampão HEPES a 50 mM (pH 7.4) com DTT (5 mM) usando o substrato Abz-YVADNQ-EDDnp (10 µM). A catepsina B (10 nM) foi avaliada em tampão de sódio acetato a 100 mM (pH 5.5) com DTT (5 mM) usando o substrato fluorogênico Z-FR-MCA (100 µM)(Sigma-Aldrich). As enzimas foram pré-incubadas por 5 min com o inibidor específico da catepsina B, o CA-074Me (com concentrações variando de 1 nM a 100 µM), a 37°C, antes da

adição dos substratos. A fluorescência foi medida por 20 min e os resultados estão representados em unidades relativas de fluorescência.

3.13 Fragmentação do DNA

PMs (5×10^5 células/poço) foram tratados ou não com Q-VD-fmk (20 μ M) por 1 h e estimulados com ActD (5 μ g/ml) por aproximadamente 12 h ou com DOTAP vazio ou FLA-BSDot (6 μ g/ml) por 3 h. Após estimulação, o sobrenadante e as células desaderidas após tripsinização foram coletados e centrifugados a 200 x g, a 4 °C por 5 min. As amostras foram ressuspensas em etanol 70% diluído em água livre de DNases e RNases para fixação. Uma vez fixada, a suspensão foi lavada duas vezes com PBS e centrifugada a 400 x g at 4°C por 5 min. Um tampão de extração de DNA foi adicionado durante a segunda lavagem. As células foram incubadas a TA por 5 min, centrifugadas a 400 x g, 4°C por 5 min e ressuspensas em uma solução de marcação de DNA contendo iodeto de propídio (PI). 200 μ g de RNase foi adicionada a cada amostra e as células foram incubadas a TA por 30 min. no escuro. As amostras foram então analisadas por citometria de fluxo a fim de determinar a incorporação de PI.

3.14 Western blotting (WB)

As amostras para detecção de IL-1 β ativa no sobrenadante da cultura celular foram obtidas de 1.5×10^6 BMDMs estimuladas com flagelina livre de *S. typhimurium* (6 μ g/ml) por 6 h. As proteínas presentes no sobrenadante foram concentradas por precipitação com metanol/clorofórmio como descrito previamente (Shenderov et al., 2014) e então ressuspendidas em tampão contendo SDS (10% SDS, 0.6 M DTT, 30% glicerol, 0.012% azul de bromofenol). Os lisados foram obtidos com o uso do tampão de lise celular NP-40 (150 mM NaCl, 20 mM Tris Hcl pH8.0, 1% Nonidet P-40 (NP-40), 10% Glicerol, 2 mM EDTA). Alternativamente, as amostras para detecção da caspase-3 no citosol celular foram obtidas de 1.5×10^6 PMs estimulados com FLA-BSDot (6 μ g/ml) por 3 h, diretamente no tampão de SDS. Ainda, nós avaliamos o escape da catepsina B dos lisossomas para o citosol por WB, utilizando para isso um ensaio de permeabilização diferencial das membranas

plasmáticas e lisossomais mediado por saponina como previamente descrito (Newman et al., 2009). Brevemente, 1.5×10^6 BMDMs foram estimulados com flagelina livre de *S. typhimurium* (6 µg/ml) por 6 h. Após o estímulo, lavamos os poços com PBS (1X) morno para retirar o excesso de SFB e depois adicionamos uma solução de saponina a 125 µg/ml (150 µl/poço). A placa ficou sob agitação por 10 min a 4°C. Após esse período, as amostras foram aliquotadas e centrifugadas por 10 min a 2000 rpm. O sobrenadante foi então transferido para outro tubo eppendorf e congelado a -20 °C. Antes da eletroforese, todas as amostras diluídas em tampão SDS foram aquecidas a 95 °C por 5 min. A transferência das proteínas para membranas de nitrocelulose (para IL-1β ativa ou catepsina B) ou PVDF (para as caspases apoptóticas) foi realizada usando Trans-Blot® Turbo™ Transfer System Bio-Rad de acordo com instruções do fabricante (Bio-rad, USA). As membranas foram bloqueadas com solução de bloqueio consistindo de 1% de leite diluído em 0.02% de PBS-Tween20. Western blots foram realizados usando os anticorpos: anti-β-actina (1:5000)(Sigma-Aldrich), anti-catepsina B (1:250) (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas), anti-IL-1β (1:1000) (R&D) e anti-caspase-3 (1:500) (Cell Signaling Technology, Danvers, MA).

3.15 Avaliação de dano lisossomal

A perda dos compartimentos lisossomais nas células viáveis foi avaliada por citometria de fluxo pelo uso de LysoTracker a fim de discriminar entre membranas lisossomais intactas e lisossomas danificados. LysoTracker foi utilizado em combinação com o kit *Ultraviolet fixable live/dead cell stain* (LifeTechnology, USA). Brevemente, BMDMs estimuladas com flagelina livre de *S. typhimurium* (6 µg/ml) por 6 h ou 24 h, foram marcadas com LysoTracker (150 nM) por 15 min at 37 °C. Então, as células foram desaderidas usando tripsina e lavadas por centrifugação a 2000 rpm por 5 min. Após isso, as células foram marcadas com o corante “live/dead” (1:1000) de acordo com as instruções do fabricante. As células foram então fixadas com paraformaldeído 1%. As amostras foram adquiridas em citômetro de fluxo LSRII (BD Bioscience). Os dados foram analisados utilizando FlowJo software (Tree Star).

3.16 Ativação de linfócitos T *in vitro* por BMDCs

BMDCs geradas como descrito no item 3.4 foram primadas com LPS (200 ng/ml) por 3 h e posteriormente estimuladas “*overnight*” (12-18 h) com flagelina ultrapura purificada da bactéria *S. typhimurium* (3 µg/ml). As células previamente estimuladas foram cultivadas por 2 h com 1-10 µg/ml do peptídeo da OVA restrito ao MHC-II, pOVA 323-339 (InvivoGen). Após 18 h de estímulo totais, adicionamos as células provenientes do baço de camundongos OT-II na proporção de 1 BMDC: 5 esplenócitos (10⁵ DCs para 5x10⁵ esplenócitos) e deixamos a co-cultura a 37°C e a 5% de CO₂ por 5 dias para que houvesse acúmulo de citocinas provenientes dos linfócitos específicos diferenciados que foram dosadas no sobrenadante da cultura por ELISA. Alternativamente, as DCs estimuladas “*overnight*” com flagelina foram marcadas com anticorpos específicos para CD11b, CD11c, CD86 e MHC-II (BD Bioscience) para análise da expressão de marcadores de superfície por citometria de fluxo. As amostras foram adquiridas em citômetro de fluxo Canto II (BD Bioscience). Os dados foram analisados utilizando FlowJo software.

3.17 Regime de imunização de camundongos com OVA e flagelina

Animais de seis a oito semanas de idade, do sexo feminino, foram imunizados em regime de *prime e boost* homólogo conforme descrito previamente (Vijay-Kumar et al., 2010). Cada animal foi imunizado com 50 µg de ovalbumina (OVA) (Sigma-Aldrich) sozinha, ou juntamente com flagelina recombinante de *S. typhimurium* (10 µg) em PBS (1X). Os camundongos foram imunizados duas vezes com um intervalo de 28 dias entre a primeira imunização e a segunda, sendo ambas as doses administradas pela via intraperitoneal (1 ml/peritônio). 42 dias após a primeira imunização, os camundongos foram sacrificados. Primeiramente, foram anestesiados com 100-200 µL/peritônio de uma solução de quetamina/xilazina (1 ml/2,5 ml) para 3,5 ml de PBS (1X). O sangue foi então coletado diretamente do coração dos animais para avaliação dos títulos de anticorpos específicos para OVA por ELISA. O material coletado foi mantido 4°C *overnight* para que se formassem as malhas de coagulação. No dia seguinte, os tubos foram centrifugados a 10 000 rcf por 10 min a 4° para a coleta do soro de cada amostra.

3.18 Análise da resposta imune humoral

O título de anticorpos séricos IgG específicos para OVA foi determinado por ELISA. Placas EIA/RIA de 96 poços (Costar, MN, EUA) foram sensibilizadas com OVA (40 µg/ml) em tampão carbonato pH 9,6, com 50 µL por poço. As placas foram mantidas a 4 °C “overnight”. Os poços foram lavados com PBS tween 0,05% três vezes antes de adicionarmos 100µL/poço de solução de bloqueio (Leite em pó desnatado 5% e BSA 2% - Sigma-Aldrich). A placa foi bloqueada por 2 h a 37 °C. Ao final do tempo de bloqueio desprezamos o sobrenadante dos poços e adicionamos o soro dos animais imunizados iniciando com uma diluição de 1:200 e seguindo uma diluição seriada até 1:25600 ou 1:51200. Após 1 h a 37 °C, lavamos os poços com PBS tween 0,05% cinco vezes e adicionamos o anticorpo secundário, goat anti mouse-IgG peroxidase (Sigma-Aldrich) na diluição de 1:5000 em 50µL/poço. Após 1 h a 37 °C, lavamos os poços com PBS tween 0,05% cinco vezes e adicionamos 100 µL/poço de solução de revelação de OPD 5% (Sigma-Aldrich) e água oxigenada 0,01% em tampão citrato pH 5. A solução de revelação foi deixada por 10 minutos e as placas guardadas no escuro. A reação foi cessada com a adição de 50µL/poço de ácido sulfúrico 4N e a placa foi lida em espectrofotômetro em comprimento de onda de 495nm. A determinação das sub-classes de IgG foi realizada com o uso de anticorpos específicos contra IgG1 e IgG2a de camundongos biotinilados (BD Pharmingen TM, USA) na diluição de 1:1000 em 50 µL/poço. Após 2 h a 37 °C, os poços foram lavados com PBS tween 0,05% cinco vezes e adicionamos 50µL/poço de solução contendo estreptoavidina conjugada a peroxidase (1:500) durante 1h. Após isso, os poços foram lavados e a reação foi revelada exatamente conforme descrito anteriormente. Para calcular o título de anticorpos dos animais imunizados, fizemos a diluição seriada até que a D.O. obtida caia entre 0,1-0,2. Assim, consideramos que o animal tem maior título de anticorpos quanto maior for a sua diluição com D.O. entre 0,1 e 0,2.

3.19 Análises Estatísticas

Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio de um *software* computacional chamado *Graphpad Prism*, da companhia *Graphpad Software Incorporation*, versão 3.02. Os testes one-way ou two-way ANOVA seguidos do teste

Bonferroni ou Student's T test foram utilizados. Valores de $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) e $p < 0.001$ (***) foram considerados estatisticamente significativos.

4.1 A inserção da flagelina bacteriana no citosol por meio de vesículas lipídicas induz morte celular de maneira independente do eixo Caspase-1/11, NLRC4 e ASC

Apesar de ser bem estabelecido na literatura que os efeitos induzidos pela flagelina são mediados pela caspase-1 (revisado por (Lage et al., 2014), nossos dados prévios demonstram que a introdução da flagelina purificada de *B. subtilis* diretamente no citosol celular por meio de vesículas lipídicas de transfecção (FLA-BSDot), mas não a flagelina em sua forma livre, é capaz de induzir morte celular de maneira independente desta protease. Como dito anteriormente, durante este período estes estudos foram ampliados e aprofundados.

Primeiramente, nós avaliamos o envolvimento do sensor NLRC4 e da proteína adaptadora ASC em resposta à flagelina. Uma vez que o inflamassoma NLRC4 possui um domínio CARD na sua porção efetora, tem sido descrito que para este sensor a molécula ASC só é requerida para a produção de citocinas, mas não para a indução de piroptose (Broz et al., 2011). De acordo com isso, observamos que a produção da citocina IL-1 β em resposta ao FLA-BSDot foi significativamente inibida na ausência de caspase-1/11, NLRC4 e ASC (Figura 6A e 6B), confirmando o requerimento destas moléculas para a secreção desta citocina em resposta à flagelina. Entretanto, apesar de macrófagos deficientes em NLRC4 e caspase-1/11 liberarem baixos níveis de LDH em tempos precoces de estimulação por FLA-BSDot (Figura 6C), nós demonstramos que estas células também sofrem morte celular, observada pela perda da marcação com o corante vital Laranja de acridina (do inglês, *Acridine Orange* - AO) em conjunto com a incorporação de Brometo de Etídio (do inglês, *Ethidium Bromide* - EtBr) um corante impermeável à membranas (Figura 6D e 6E), sugerindo que, embora o eixo NLRC4/caspase-1 seja estritamente requerido para a produção de IL-1 β em resposta à flagelina citosólica, a morte celular ocorre na ausência destas moléculas, ao contrário do que prevê a literatura atual.

É importante notar que na maior parte dos nossos experimentos, nós utilizamos a flagelina nativa purificada da bactéria *B. subtilis* obtida da empresa InvivoGen. A utilização da flagelina de *B. subtilis*, que é uma bactéria gram-positiva, se deu na tentativa de eliminar uma possível contaminação por LPS. Porém, a

parede celular de bactérias gram-positivas é rica em peptideoglicanos que são agonistas de TLR2. Logo, para descartar o envolvimento de contaminantes presentes na parede da bactéria, nós realizamos experimentos utilizando macrófagos provenientes de camundongos deficientes na molécula TLR2. Como mostrado na (Figura 7A), a produção de IL-1 β induzida pela flagelina citosólica foi completamente independente de TLR2, uma vez que níveis similares de IL-1 β foram observados nos macrófagos provenientes dos animais selvagens e deficientes nessa molécula, excluindo a possibilidade da interferência de ligantes de TLR2 nas respostas do macrófago induzidas pela flagelina citosólica.

Nós também demonstramos que a flagelina nativa de *S. typhimurium*, também obtida da empresa InvivoGen, mas não o peptídeo VK210 da proteína C.S. do *P. vivax*, induz o mesmo padrão de morte celular e produção de citocinas, observado com a flagelina purificada de *B. subtilis* quando inseridos no DOTAP (Figuras 7B e 7C), sugerindo um efeito específico da flagelina. Entretanto, a fim de excluir possíveis efeitos tóxicos não específicos das preparações das flagelinas nativas utilizadas, nós realizamos experimentos demonstrando que uma flagelina recombinante purificada produzida em uma cepa de *E. coli* (BL21DE) e inserida no DOTAP (rFliCDot) induz a mesma morte no macrófago estimulado (Figura 7B), e secreção de IL-1 β (Figura 7C), que aquela obtida com as flagelinas nativas. Em contraste, uma proteína recombinante não relacionada (p24 do HIV-1) produzida na mesma cepa de *E. coli* e purificada da mesma maneira que a rFliC não induz morte do macrófago (Figura 7B) e secreção de IL-1 β (Figura 7C). Todas as proteínas foram utilizadas em concentrações molares correspondentes. Além disso, a pureza das preparações das flagelinas utilizadas (nativas e recombinante) pode ser observada no gel de poliacrilamida da (Figura 7D). Dessa maneira, a inclusão dos experimentos utilizando uma proteína controle não relacionada, porém produzida da mesma maneira que a rFliC, indica que os resultados obtidos com ambas flagelinas nativas e recombinante, são fruto de um efeito específico da inserção da flagelina no DOTAP e não de um possível contaminante presente nas preparações de flagelina.

Figura 6. O eixo NLRC4/ASC/Caspase-1/11 não é requerido para a indução de morte celular em resposta à flagelina.

Macrófagos peritoneais (PMs) (10^5 células/poço) provenientes de animais C57BL/6 (*Wild type*) e deficientes em caspase-1/11, NLRC4 ou ASC foram estimulados com flagelina purificada de *B. subtilis* inserida no DOTAP (FLA-BSDot) (3 μ g/ml). A produção de IL-1 β foi determinada no sobrenadante das culturas por ELISA, nos tempos indicados (A) ou 6 h após estímulo (B). Os números representam a média $\pm$ SEM; n=2. ***p<0.001 quando comparados aos grupos *knockout*. (C) Os níveis de LDH foram quantificados no sobrenadante das culturas usando um kit de quantificação de LDH. Os números representam a média $\pm$ SEM; n=2. $^1p<0.05$, ** p<0.01 quando comparados ao grupo *Wild type*. (D) A citotoxicidade foi avaliada como porcentagem de células simples positivas para EtBr em fotografias de fluorescência, após coloração usando AO/EtBr. Os números representam a média $\pm$ SEM de pelo menos 7 imagens por tratamento. ***p<0.001 quando comparados ao grupo *wild type*. (E) Painel de fotografias representativas dos PMs estimulados com FLA-BSDot 6 h após o estímulo. PMs corados com AO (verde) mostram células viáveis em cada campo e com EtBr (vermelho) indicam células permeabilizadas. O painel direito indica a sobreposição das fotografias. As fotografias representam um aumento original de 400 x. Todos os dados da figura são representativos de quatro (células *wild type* versus *caspase-1/11 $^{-/-}$*) ou dois experimentos independentes.

Figura 7. Diversas preparações de flagelinas citosólicas, mas não proteínas não relacionadas, induzem morte celular e secreção de IL-1 β .

(A) Macrófagos peritoneais PMs (10^5 células/poço) derivados de animais C57BL/6 (*Wild type*) e deficientes em TLR2 foram estimulados com 3 μ g/ml de flagelina purificada da bactéria *B. subtilis* inserida no DOTAP (FLA-BSDot). Após 6 h de estímulo, os níveis de IL-1 β foram determinados nos sobrenadantes das culturas usando kit de ELISA. Os números representam média $\pm$ SEM; n=2. (B) A citotoxicidade foi avaliada após 6 h de estímulo nos PMs estimulados com flagelinas nativas purificadas de *B. subtilis* (3 μ g/ml) e *S. typhimurium* (5,4 μ g/ml), com o peptídeo não relacionado da proteína CS do *P. vivax* (0,38 μ g/ml), com flagelina recombinante de *S. typhimurium* (5,4 μ g/ml) ou a proteína recombinante p24 do HIV (2,75 μ g/ml) inseridas no DOTAP (FLA-BSDot, FLiCDot, PepVK210Dot, rFLiCDot e rp24Dot, respectivamente). Todas as concentrações das proteínas equivalem à concentração molar de 10^{-7} M. Foram consideradas mortas, as células positivas somente para brometo de etídio (EtBr) em fotografias de fluorescência após marcação com laranja de acridina (AO) e EtBr. Os dados estão representados como média $\pm$ SEM de pelo menos 7 imagens com aumento original x 400 por tratamento. Os dados são representativos de 2 experimentos independentes. (C) Os níveis de IL-1 β foram determinados no sobrenadante das culturas de macrófagos *wild type* após 6 h de estímulo usando kit de ELISA. Os dados são representados pela média $\pm$ SEM; n=2 e são representativos de 2 experimentos independentes. (D) Gel SDS-PAGE para flagelina nativa de *B. subtilis* ou *S. typhimurium* (esquerda) e flagelina recombinante de *S. typhimurium* (direita) indicam a pureza das preparações das flagelinas.

4.2 A morte celular induzida pela flagelina contribui para o controle da infecção por *S. typhimurium*, na presença ou na ausência de caspase-1

A piroptose tem sido descrita como um importante mecanismo de controle de infecções (Miao et al., 2010). Entretanto, uma vez que a flagelina citosólica foi capaz de induzir morte celular na ausência de caspase-1, o próximo passo foi investigar a contribuição deste processo para o controle da bactéria *S. typhimurium*. Para isso, nós avaliamos a indução de morte celular em macrófagos *Wild type* (WT) e caspase-1/11^{-/-} infectados com *S. typhimurium* selvagem (ST) ou com a cepa *S. typhimurium* mutante, deficiente em flagelina (ST Δ Fli). É importante notar que as placas foram centrifugadas a 1200 rpm por 10 min a fim de permitir a mesma taxa de ingestão de ambas as cepas de *S. typhimurium* pelos macrófagos, superando a ausência de flagelo na cepa ST Δ Fli, como previamente descrito (Franchi et al., 2006).

De fato, em tempos precoces de infecção com a cepa ST, uma elevada frequência de morte celular é observada na cultura de macrófagos selvagens em comparação com os macrófagos caspase-1/11^{-/-} (Figura 8A). Esta indução de morte celular dependente de caspase-1 que ocorre precocemente, parece se correlacionar com a presença de flagelina, uma vez que a taxa de morte celular observada nos macrófagos WT é bastante inferior quando estes são infectados com a bactéria mutante, ST Δ Fli (Figuras 8B e 8C). De fato, o processo de morte celular precoce induzido por flagelina e dependente de caspase-1, correlacionou com um menor número de CFU encontrado nos macrófagos WT em comparação com os deficientes em caspase-1/11 (Figura 8C), confirmando o papel da rápida morte celular dependente de caspase-1 no controle da infecção.

No entanto, embora em uma cinética mais atrasada, os macrófagos deficientes em caspase-1/11 também sofrem morte celular induzida por flagelina durante infecção com *S. typhimurium* (Figuras 8A-C), conforme previamente demonstrado com a flagelina citosólica purificada. Além disso, a presença da flagelina também conferiu proteção aos macrófagos de uma maneira independente de caspase-1/11, uma vez que um número significativamente maior de CFU foi encontrado nos macrófagos caspase-1/11^{-/-} infectados com a cepa ST Δ Fli em relação às células infectadas com a cepa ST (Figura 8D). De fato, a adição de flagelina inserida no DOTAP durante a infecção com a cepa ST Δ Fli, resultou em um

aumento dos níveis de morte celular (Figura 8E), o que se correlacionou temporalmente com a redução da infecção (Figura 8F), tanto nos macrófagos selvagens quanto nos deficientes em caspase-1/11. Dessa maneira, juntos, estes dados indicam que tanto a morte celular precoce dependente de caspase-1, quanto a morte celular tardia independente do inflamassoma, são induzidas por flagelina durante a infecção por *S. typhimurium* e podem ser consideradas mecanismos efetores que contribuem para o controle bacteriano pelos macrófagos infectados.

Figura 8. Macrófagos infectados com *S. typhimurium* sofrem morte celular dependente de flagelina, na presença ou ausência de caspase-1/11.

(A) A citotoxicidade foi avaliada nos macrófagos peritoneais PMs (3×10^5 células/poço) *wild type* e deficientes em caspase-1/11 infectados com a cepa de *S. typhimurium* selvagem 1412 (St WTfli) ou com a cepa mutante 2157 (St Δfli) (MOI 5:1), como porcentagem de células positivas somente para brometo de etídio (EtBr) em fotografias de fluorescência de acordo com a coloração com laranja de acridina (AO)/EtBr. Os números representam a média $\pm$ SEM; $n=3$. *** $p<0.001$ quando comparados ao grupo caspase-1/11^{-/-}. Os dados são representativos de três experimentos independentes. (B) Fotografias representativas de PMs estimulados por 3 h. PMs corados com laranja de acridina (verdes) mostram as células viáveis de cada campo, e PMs corados somente com EtBr em vermelho indicam células mortas. As fotografias representam tamanho original $\times 400$. (C) A citotoxicidade foi avaliada como porcentagem de células positivas somente para EtBr em fotografias de fluorescência de acordo com a coloração com AO/EtBr dos PMs estimulados com St WTfli às 3 h de infecção. *** $p<0.001$ quando comparados ao grupo infectado com a cepa St Δfli. $***p<0.001$ quando comparados ao grupo WT. Os dados são representativos de três experimentos independentes. (D) Unidades formadoras de colônias (CFUs) recuperadas de PMs infectados com St WTfli ou St Δfli (MOI 5:1) por 3 h. *** $p<0.001$ quando comparados ao grupo infectado com St Δfli. Os dados são representativos de três experimentos independentes. (E) A citotoxicidade foi avaliada como

porcentagem de células positivas somente para EtBr em fotografias de fluorescência de acordo com a coloração com AO/EtBr dos PMs estimulados com a cepa St Δ FliC (MOI 5:1) às 3 h de infecção, tratados concomitantemente com flagelina de *S. typhimurium* inserida no DOTAP (FliCDot) (símbolos abertos) ou não (símbolos fechados). Os dados são representativos de dois experimentos independentes. (F) Os números representam as CFUs recuperadas dos PMs infectados com a cepa Δ FliC St (MOI 5:1), na presença (símbolos abertos) ou ausência de FliCDot (símbolos fechados). Os números representam a média $\pm$ SEM; n=3. Os dados são representativos de dois experimentos independentes.

4.3 A morte celular independente de caspase-1/11 induzida pela flagelina, exibe características apoptóticas, mas não depende da atividade de caspases e mantém resultado inflamatório

A seguir, nosso próximo passo foi avaliar detalhadamente, as características morfológicas e bioquímicas dos processos de morte celular induzidos pela flagelina. Primeiramente, nós observamos que 1 h após estimulação com FLA-BSDot as células dos animais C57BL/6 (*wild type*) se tornam permeáveis ao brometo de etídio (EtBr) antes de perderem a marcação para laranja de acridina (AO), exibindo dupla marcação nuclear (Figura 9A), um indicativo da formação de poros na membrana plasmática (McGahon et al., 1995; Silveira, Zamboni, 2010). Em contraste, essa dupla marcação nuclear com AO/EtBr não foi observada em tempos precoces nos macrófagos deficientes em caspase-1/11 (Figura 9A). Ainda, lâminas coradas com giemsa mostraram que a maioria dos macrófagos *wild type* pareciam estar inchados em comparação com às células caspase-1/11^{-/-} que, ao contrário, apresentavam volume celular reduzido (Figura 9B).

Além disso, imagens de contraste de fase extraídas da filmagem destas células demonstram que os macrófagos WT parecem inchar e explodir ao longo do tempo de cultura, resultando no acúmulo de debris celulares (Figura 10A, painel esquerdo). Em contraste, embora algumas células apresentem morfologia similar àquela observada na cultura WT, a maioria das células deficientes em caspase-1/11 estimuladas com flagelina citosólica parecem morrer apresentando algumas características semelhantes às encontradas em células apoptóticas, que incluem redução do volume celular (Figuras 10B e 10C, painel direito) e formação de projeções da membrana que remetem aos blebs apoptóticos (Figura 10C, painel direito). Dessa maneira, enquanto os macrófagos WT apresentam características de morte celular necrótica, as células deficientes em caspase-1/11 estimuladas com FLA-BSDot se assemelham morfológicamente a células que são estimuladas com

um indutor clássico de apoptose, a actinomicina D (ActD) (Figura 9C).

Para determinar se os macrófagos estimulados com flagelina citosólica sofrem um desvio para o programa apoptótico de morte celular na ausência de NLRC4 e caspase-1/11, nós comparamos a morte celular independente de caspase-1 induzida pela flagelina com a apoptose clássica induzida por ActD. É importante salientar que o tratamento com ActD induziu a mesma frequência de morte celular (Figura 9D, barras pretas) e núcleos hipodiplóides (Figura 9E, painel do meio e Figura 9F, barras pretas) nos macrófagos WT e caspase-1/11^{-/-}, demonstrando que a ausência de caspase-1/11 não confere, por si só, um desvio basal para o programa apoptótico de morte celular. Ainda, a frequência de núcleos hipodiplóides observada 3 h após estimulação com flagelina associada ao DOTAP, é drasticamente reduzida na ausência de caspase-1/11 (Figura 10B), demonstrando o envolvimento da caspase-1 na fragmentação do DNA que ocorre em resposta à flagelina citosólica, conforme previamente descrito para a piroptose (Bergsbaken, Cookson, 2007; Fink, Cookson, 2006; Lage et al., 2013).

Entretanto, ao compararmos o requerimento bioquímico destes processos de morte celular, nós observamos uma diminuição da proteína pro-caspase-3 em associação ao surgimento da caspase-3 clivada (17/19 kDa), ou seja, da sua forma ativa, apenas em resposta ao tratamento com ActD, tanto nos macrófagos WT, quanto nas células caspase-1/11^{-/-} e NLRC4^{-/-}, mas não em resposta ao FLA-BSDot (Figura 10C). O envolvimento da flagelina citosólica na ativação da caspase-7 e da caspase-9 também foi investigado utilizando um ensaio fluorimétrico com os substratos destas caspases. Nós observamos que os macrófagos WT ou caspase-1/11^{-/-} estimulados com ActD exibiram ativação tanto da caspase-7 (Figura 10D), quanto da caspase-9 (Figura 10E), que foram abolidas pela adição de z-VAD-fmk and LEHD-fmk (inibidores de pan-caspase e da caspase-9, respectivamente). Em contraste, a ativação das caspases 7 e 9 não foi observada em resposta à flagelina (Figuras 10D e 10E), sugerindo que a maquinaria apoptótica não está envolvida na morte celular induzida por flagelina.

De acordo com isso, tanto a perda da coloração com AO (Figura 9B, barras brancas) quanto a formação de núcleos hipodiplóides (Figura 9C, painéis direitos e Figura 9D, barras brancas) induzidos por ActD, foram drasticamente inibidos na presença de Q-VD-fmk, um inibidor de pan-caspase. Entretanto, a presença de Q-

VD-fmk não interferiu com a morte celular nos macrófagos caspase-1/11^{-/-} (Figura 10F) e NLRC4^{-/-} (Figura 10G), estimulados com flagelina, conforme observado pela marcação com AO/EtBr. Dessa maneira, apesar de apresentar características morfológicas semelhantes às da apoptose, a ausência da ativação de caspases apoptóticas, bem como, o fato de que a perda destas caspases não interfere com a indução morte celular, indicam que as células caspase-1/11^{-/-} não sofrem um desvio para o programa clássico de morte apoptótica em resposta à flagelina.

Além disso, quase 40% das células caspase-1/11^{-/-} estimuladas com flagelina citosólica, já estavam permeáveis ao corante EtBr às 3 h após estimulação com flagelina (Figura 10H), caracterizando uma perda rápida da integridade da membrana plasmática, ao contrário de células sofrendo morte apoptótica, que permaneceram impermeáveis ao corante, mesmo após 12 h de estímulo, quando já eram negativas para marcação com AO (Figura 10H), indicando que estas células já haviam morrido, mas ainda não haviam perdido a integridade da membrana plasmática. Ainda, mesmo em níveis inferiores aos observados nas células WT, macrófagos caspase-1/11^{-/-} estimulados com flagelina liberaram uma quantidade considerável da citocina IL-1 α (Figura 10I), que é um conhecido sinal de dano celular com propriedades pró-inflamatórias que pode ser liberado por células necróticas (Eigenbrod et al., 2008). Em contraste, a morte celular apoptótica induzida por ActD não resulta na liberação desta alarmina, mesmo após 24 h de estímulo (Figura 10I), quando quase todas as células já haviam morrido, consistente com a idéia de que as células apoptóticas retêm estas moléculas no interior dos corpos apoptóticos. Em conjunto, estes dados demonstram que a morte celular induzida por flagelina é independente de caspase-1/11 mantém o mesmo resultado inflamatório da piroptose, ambas sendo caracterizadas pela perda precoce da integridade da membrana celular e pela liberação do conteúdo intracelular inflamatório, corroborando com a idéia de que a flagelina não ativa a maquinaria clássica da apoptose na ausência de caspase-1/11.

Esses dados descrevem um novo processo de morte celular inflamatório induzido pela inserção da flagelina bacteriana no citosol celular que acontece independente de caspases e que preserva características necróticas observadas na presença de caspase-1, como a liberação de IL-1 α , uma importante citocina inflamatória (Eigenbrod et al., 2008). Dessa maneira, o dano celular concomitante à

liberação de IL-1 α pode ser uma importante consequência da morte celular induzida pela flagelina citosólica contribuindo para o ambiente inflamatório no sítio de infecção. Além disso, a potencial contribuição deste fator na atividade adjuvante da flagelina será avaliada em blocos posteriores.

Figura 9. A morte celular independente de caspase-1/11 induzida pela flagelina citosólica apresenta características morfológicas de apoptose.

(A) Macrófagos peritoneais (PMs) (10^5 células/poço) estimulados com FLA-BSDot ($3 \mu\text{g/ml}$), foram corados com AO/EtBr e exibiram dupla marcação nuclear, indicativo da formação de poros na membrana de células viáveis. Macrófagos corados em verde com laranja de acridina (AO) mostram as células viáveis de cada campo enquanto células coradas somente com brometo de etídio (EtBr), em vermelho, indicam as células mortas. As fotografias representam tamanho original x 400. (B) PMs estimulados com FLA-BSDot foram corados com Giemsa para visualização da morfologia celular. (C) Fotografias representativas de campo claro de PMs selvagens (*wild type*) ou deficientes em caspase-1/11 estimulados com actinomicina D (ActD) ($5 \mu\text{g/ml}$) por 12 h. As fotografias representam tamanho original x 400. (D) A citotoxicidade foi avaliada como porcentagem das células negativas para AO em fotografias de fluorescência de acordo com a marcação para AO/EtBr de PMs selvagens (*wild type*) ou deficientes em caspase-1/11 estimulados com actD às 12h. Alternativamente, PMs (5×10^5 células/poço) foram tratadas com inibidor de pan-caspases Q-VD-fmk ($20 \mu\text{M}$), 1 h antes do estímulo com ActD. Os dados representam média $\pm$ SEM; $n=10$. (E)(F) A porcentagem de núcleos

hipodiploides foi avaliada por citometria de fluxo de acordo com a incorporação de iodeto de propídio (PI) nas células tratadas com ActD. Para todos os painéis *** $p < 0.001$ quando comparados aos grupos pré-tratados e $p < 0.001$ quando comparados ao grupo controle.

Figura 10. A morte celular induzida pela flagelina citosólica não ativa a maquinaria apoptótica na ausência de caspase-1/11.

(A) Fotografias representativas de campo claro de macrófagos peritoneais (PMs) selvagens (10^5 células/poço) (*wild type*) ou deficientes em caspase-1/11 estimulados com FLA-BSDot (3

µg/ml) durante 3,5 h de estímulo. As fotografias representam tamanho original x 400 e são representativas de três experimentos independentes. (B) A porcentagem de núcleos hipodiploides foi avaliada nas células (5×10^5 células/poço) por citometria de fluxo de acordo com a incorporação de iodeto de propídio (PI), 3 h após estímulo com FLA-BSDot ou DOTAP vazio. Os dados representam média $\pm$ SEM; n=3. ***p<0.001 quando comparados ao grupo controle. (C) Análise por western blot de ativação da caspase-3 em macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs) (5×10^5 células/poço) de animais selvagens ou deficientes nas moléculas caspase-1/11 e NLRC4 estimulados com actinomicina D (ActD) (5 µg/ml) ou FLA-BSDot (6 µg/ml), às 6 h. A ativação da caspase-3 foi considerada pela diminuição da banda correspondente à pro-caspase-3 (35 kDa) em conjunto com o surgimento da banda de caspase-3 ativa 17/19 kDa. (D)(E) Ensaio fluorimétrico de atividade das caspases-7 (D) e caspase-9 (E) em PMs estimulados com FLA-BSDot (3 µg/ml) ou ActD (5 µg/ml) às 4 h de estímulo. Os extratos celulares foram incubados com os substratos fluorimétricos destas caspases, na presença dos inibidores específicos e são representados por unidades de fluorescência relativas (RFU). Os dados representam média $\pm$ SEM; n=3. (F)(G) A citotoxicidade foi avaliada como porcentagem das células negativas para AO e positivas para EtBr em fotografias de fluorescência de acordo com a marcação para AO/EtBr de PMs selvagens (*wild type*) ou deficientes em caspase-1/11 estimulados com FLA-BSDot (3 µg/ml). As células foram tratadas ou não com Q-VD-fmk (20 µM) 1 h antes do estímulo. Os dados representam média $\pm$ SEM; n=3. (H) A citotoxicidade foi avaliada nos BMDMs estimulados com FLA-BSDot (6 µg/ml) ou ActD (5 µg/ml) conforme descrito anteriormente. Os dados representam média $\pm$ SEM de, pelo menos, 5 imagens de cada tratamento. ***p<0.001 quando comparados ao grupo estimulado com ActD. (I) Os níveis de IL-1 α foram determinados no sobrenadante das culturas de PMs estimulados com FLA-BSDot (3 µg/ml) ou ActD (5 µg/ml) por ELISA. ***p<0.001 quando comparados ao grupo *knockout*. Os dados representam dois experimentos independentes.

4.4 Catepsinas lisossomais regulam a ativação do inflamassoma em resposta à flagelina citosólica

Devido às características peculiares demonstradas pelas células deficientes em caspase-1/11 após estimulação com FLA-BSDot, nós investigamos o envolvimento de mecanismos alternativos de morte celular. O processo de permeabilização da membrana lisossomal, chamado de LMP (do inglês, *Lysosomal membrane permeabilization*) que pode ser induzido por uma variedade de estímulos, ativa um programa de morte celular independente da maquinaria apoptótica clássica (Guicciardi et al., 2004; Hitomi et al., 2008; Kreuzaler et al., 2011). Este tipo peculiar de morte celular induz uma aparência mista subapoptótica ou necrótica (Boya, Kroemer, 2008), similar ao que é observado nas células caspase-1/11^{-/-} estimuladas com FLA-BSDot.

Para investigar a habilidade da flagelina citosólica em induzir perda da acidez lisossomal, uma característica de dano lisossomal, nós analisamos os macrófagos de acordo com o padrão de coloração após uso do corante AO. Assim, nós observamos um grande número de *spots* com coloração verde tanto nas células WT,

quanto nas células deficientes em caspase-1 após estimulação com flagelina citosólica (Figura 11A e Figura 12A), mas não com o DOTAP sozinho ou meio de cultura (Figura 11A). Uma vez que o surgimento de fluorescência verde difusa indica ruptura dos lisossomas previamente cheios de AO, que se dispersou difusamente pelo citoplasma (Averette et al., 2009; Boya, Kroemer, 2008; Nascimento et al., 2007), nossos dados indicam que a inserção da flagelina nos macrófagos induz perda da integridade da membrana lisossomal, com liberação do conteúdo lisossomal para o citosol. Ainda, o mesmo padrão de coloração foi observado com a transfecção da flagelina de *S. typhimurium* inserida no DOTAP (FLiCDot), mas não com outras proteínas, como VK210 e rp24 também inseridas no DOTAP (Figura 11A). Estes dados indicam que diferentes preparações de flagelinas no DOTAP induzem dano lisossomal, em contraste com o que é observado com a transfecção de outras proteínas não relacionadas.

Estes resultados indicam o envolvimento de proteases lisossomais na morte celular induzida pela flagelina citosólica. Na tentativa de inibir a atividade das proteases lisossomais de maneira geral e inespecífica, nós utilizamos a bafilomicina A1. A bafilomicina é um macrolídeo que inibe especificamente um tipo vacuolar de H^+ -ATPase (V-ATPase), prevenindo, desta forma, a acidificação lisossomal, necessária para a ativação prévia das proteínas lisossomais. Dessa maneira, verificamos que a adição prévia de Bafilomicina A1 na cultura, aboliu a morte celular induzida pela flagelina citosólica nos macrófagos caspase-1/11^{-/-} (Figura 12B). A presença deste inibidor na cultura inibiu ainda significativamente a morte celular nos macrófagos WT o que sugere o envolvimento de uma via lisossomal, tanto na piroptose induzida pela flagelina (morte na presença de caspase-1) quanto na ausência desta protease. É importante notar que, apesar de dano lisossomal e liberação de catepsina B serem eventos até então correlacionados com a ativação do inflamassoma NLRP3 em resposta a agentes particulados (Dostert et al., 2009; Hornung et al., 2008), macrófagos deficientes em NLRP3 estimulados com flagelina citosólica exibiram frequência de morte celular (Figura 11B) e liberação de IL-1 α (Figura 11C) comparadas aos macrófagos WT, descartando a participação do NLRP3 na morte celular inflamatória mediada por dano lisossomal induzida pela inserção da flagelina no citosol celular.

Sendo assim, nós avaliamos o envolvimento das proteases lisossomais mais

abundantes, as catepsinas B e D, na morte do macrófago induzida por flagelina, através da adição de inibidores seletivos para estas catepsinas, CA-074Me e pepstatina A, respectivamente. Nós observamos que, embora a presença isolada de cada inibidor na cultura celular não tenha afetado a morte celular induzida por flagelina (Figura 12C e 12D), a adição simultânea dos inibidores inibiu significativamente a morte celular em ambos os macrófagos WT e caspase-1/11^{-/-}, indicando um papel redundante para as catepsinas B e D no processo de morte celular induzido pela flagelina (Figura 12E). Além disso, a presença de CA-074Me, também reduziu a produção das citocinas IL-1 β e IL-1 α proveniente dos macrófagos WT para níveis similares aos obtidos após estimulação das células deficientes em caspase-1/11 (Figura 13A e Figura 13B). Em contraste, a presença de pepstatina A não afetou a produção de IL-1 β (Fig. 13C) ou IL-1 α (Fig. 13D) em resposta ao FLA-BSDot, sugerindo que a catepsina B deve regular majoritariamente as atividades da caspase-1 ou sua ativação em resposta à flagelina. Dessa maneira, nossos dados indicam um papel crucial para as catepsinas lisossomais na regulação das respostas do macrófago dependentes (produção de citocinas) ou independentes de caspase-1 (morte celular) em resposta à flagelina citosólica.

Na realização destes experimentos, para a inibição da atividade da catepsina B nós utilizamos o inibidor CA-074Me, que é amplamente utilizado como um inibidor seletivo de catepsina B (Duncan et al., 2009; Hentze et al., 2003; Hornung et al., 2008). No entanto, uma vez que foi demonstrado que os inibidores de caspases podem interagir com a catepsina B, inibindo assim a sua atividade, (Schotte et al., 1998), nós precisávamos descartar a possibilidade de que a ação do CA-074Me nas respostas caspase-1-dependentes fosse resultante de um efeito não específico desta droga através da inibição direta da caspase-1. Para testar a possibilidade de reatividade cruzada entre o CA-074Me e a caspase-1 nós realizamos um ensaio bioquímico *cell free* em colaboração com o aluno Marcelo Y. Icimoto, da Biofísica da UNIFESP, a fim de avaliar o efeito direto do CA-074Me na atividade de uma caspase-1 recombinante. Como pode ser observado na (Figura 13E), o CA-074Me não foi capaz de inibir diretamente a atividade da caspase-1, enquanto que inibiu a atividade da catepsina B, de maneira dose-dependente, descartando um efeito não específico do CA-074Me diretamente sobre a caspase-1 e, desta forma, confirmando que as catepsinas lisossomais participam da regulação das respostas dos

macrófagos dependentes de caspase-1 induzidas pela flagelina citosólica.

Sendo assim, os dados apresentados até aqui descrevem uma nova forma de morte celular induzida através da inserção da flagelina em vesículas lipídicas, que não requer NLRC4, ASC ou caspase-1/11, mas é regulada pelas catepsinas lisossomais B e D, e se caracteriza pela rápida perda da integridade da membrana plasmática e secreção de IL-1 α pelos macrófagos estimulados. Ainda, esta via lisossomal que ocorre de maneira simultânea, porém, independente da ativação direta do inflamassoma NAIP/NLRC4, regula as respostas do macrófago dependentes deste inflamassoma, como a secreção de IL-1 β e IL-1 α e a piroptose. Sendo assim, estes dados sugerem uma cooperação entre a ativação dos inflamassomas e a via lisossomal em resposta à flagelina (Figura 14). Assim, nossos resultados fornecem ferramentas para o entendimento dos mecanismos que coordenam a ativação e morte dos macrófagos em resposta à flagelina e sua significância biológica para a imunidade inata na resistência à infecções bacterianas e abrem novas perspectivas em relação ao envolvimento da via lisossomal nos mecanismos efetores induzidos por flagelina, como, por exemplo, em sua função adjuvante, o que será abordado nas próximas sessões.

Figura 11: Apenas flagelina citosólica induz perda da acidificação lisossomal e seus efeitos são independentes de NLRP3.

(A) Micrografias de fluorescência representativas de macrófagos peritoneais (PMs) (10^5 células/poço) derivados de animais C57BL/6 corados com laranja de acridina após estimulação com flagelina citosólica de *B. subtilis* ($3 \mu\text{g/ml}$) ou *S. typhimurium* ($5,4 \mu\text{g/ml}$), com o peptídeo não relacionado da proteína CS do *P. vivax* ($0,38 \mu\text{g/ml}$), ou com proteína recombinante p24 ($2,75 \mu\text{g/ml}$) inseridas no DOTAP (FLA-BSDot, FLiCDot, PepVK210Dot ou rp24Dot, respectivamente). A elevada fluorescência verde citoplasmática difusa é um indicativo da perda da acidez lisossomal. As micrografias representam um tamanho original x 400 e foram ampliadas. (B) A citotoxicidade foi avaliada como porcentagem das células negativas para laranja de acridina e positivas para brometo de etídio em fotografias de fluorescência de acordo com a marcação para AO/EtBr de PMs selvagens (wild type) ou deficientes em NLRP3 estimulados com FLA-BSDot ($3 \mu\text{g/ml}$), às 6 h de estímulo. Os dados representam a média $\pm$ SEM; $n=6$. (C) Os níveis da citocina IL-1 α foram determinados no sobrenadante de PMs selvagens (wild type) ou deficientes em NLRP3 estimulados com FLA-BSDot ($3 \mu\text{g/ml}$), após 6 h com o uso de kit de ELISA. Os números representam média $\pm$ SEM; $n=2$.

Figura 12: Catepsinas lisossomais regulam a morte celular induzida pela flagelina.

(A) Micrografias de fluorescência representativas de macrófagos peritoneais (PMs) (10^5 células/poço) derivados de animais C57BL/6 (*wild type*) ou deficientes em caspase-1 corados com laranja de acridina (AO) e brometo de etídio (EtBr), após estimulação com flagelina citosólica de *B. subtilis* (3 $\mu\text{g/ml}$). As micrografias representam um tamanho original x 400. (B)(C)(D)(E) A citotoxicidade foi avaliada como porcentagem das células negativas para AO e positivas para EtBr em fotografias de fluorescência de acordo com a marcação para AO/EtBr de PMs selvagens (*wild type*) ou deficientes em caspase-1/11 estimulados com FLA-BSDot (3 $\mu\text{g/ml}$). As células foram pré-tratadas ou não com o inibidor de acidificação lisossomal, bafilomicina A1 (20 nM) (B), com o inibidor seletivo da catepsina B, CA-074Me (25 μM) (C), com o inibidor seletivo da catepsina D, pepstatina A (25 μM) (D), ou com ambos (E), 1,5 h antes do estímulo. Os dados representam a média $\pm$ SEM de pelo menos 15 imagens por tratamento. *** $p < 0,001$ quando comparados aos grupos não tratados. Os dados são representativos de dois experimentos independentes.

Figura 13: Catepsina B regula a produção de citocinas em resposta à flagelina.

Os níveis das citocinas IL-1 β (A)(C) ou IL-1 α (B)(D) foram determinados no sobrenadante de macrófagos peritoneais (PMs) (10^5 células/poço) selvagens (*wild type*) ou deficientes em caspase-1/11 estimulados com FLA-BSDot (3 μ g/ml), após 6 h, com o uso de kits de ELISA. As células foram pré-tratadas ou não com o inibidor seletivo da catepsina B, CA-074Me (25 μ M) (A)(B) ou com o inibidor seletivo da catepsina D, pepstatina A (25 μ M) (C)(D), nas concentrações indicadas na figura, 1,5 h antes do estímulo. Os números representam média $\pm$ SEM; n=2. Os dados obtidos em (A)(B) são representativos de dois experimentos independentes. Os dados obtidos em (C)(D) representam a média de dois experimentos independentes. Os números representam média $\pm$ SEM; n=4. * p <0.05, * p <0.01, *** p <0,001 quando comparados aos grupos não tratados. (E) Catepsina B e caspase-1 recombinantes foram pré-tratados com CA-074Me e sua atividade enzimática foi medida por fluorescência e representada como média $\pm$ SEM; n=3.

Figura 14. Os inflamassomas e a via lisossomal cooperam para as respostas do macrófago induzidas pela flagelina citosólica.

A flagelina bacteriana inserida no citosol dos macrófagos via sistema de secreção bacteriano T3SS/T4SS ou por meio de vesículas lipídicas pode induzir ativação de ambos: complexo NAIP5/NLRC4 (A) e a via lisossomal (B). Apesar da sua ligação direta ao complexo NAIP5/NLRC4, a inserção da flagelina no citosol deve induzir ruptura lisossomal ou permeabilização gradual da membrana do lisossoma (LMP) o que permite a liberação das catepsinas lisossomais para o citosol. A ativação do inflamassoma resulta em piroptose e secreção de IL-1 β e IL-1 α . Entretanto, estas respostas dos inflamassomas também são reguladas pela via lisossomal, onde a catepsina B parece se destacar, uma vez que está envolvida na produção das citocinas IL-1 β e IL-1 α mediadas pela caspase-1 (C). Por outro lado, o dano lisossomal, por si só, resulta na indução de morte celular inflamatória independente do inflamassoma.

4.5 A flagelina purificada da bactéria *S. typhimurium* (FLiC-ST) induz secreção de IL-1 β ativa e perda de compartimentos lisossomais na ausência de vesículas de transfecção

Conforme exposto nas sessões anteriores, nossos dados sugerem que o distúrbio lisossomal induzido pela inserção da flagelina no citosol leva à liberação da cathepsina B que então coopera com o inflamassoma para a produção das citocinas IL-1 β e IL-1 α . Como dito anteriormente, nós utilizamos neste estudo, a flagelina nativa purificada da bactéria gram-positiva *B. subtilis* inserida em vesículas lipídicas catiônicas (DOTAP), que permitem o carregamento de proteínas exógenas para o citosol celular. Entretanto, dados preliminares do nosso grupo, sugeriam que a flagelina purificada de *S. typhimurium* (FLiC-ST), em contraste com a flagelina de *B. subtilis*, seria capaz de alcançar o citosol celular na ausência de vesículas de transfecção. FLiC-ST foi capaz de induzir permeabilização da membrana do macrófago com liberação de LDH, assim como a produção de IL-1 β , observada por ELISA, em níveis similares aos encontrados quando a mesma flagelina foi inserida no DOTAP (dados não mostrados). De maneira interessante, nós também observamos por *western blotting* (Figura 15A), que a FLiC-ST induz produção de IL-1 β ativa no sobrenadante de macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs) na ausência de qualquer sistema de entrega.

Figura 15. FLiC-ST induz secreção de IL-1 β ativa por macrófagos.

BMDMs de animais C57BL/6 (5×10^5 células/poço) foram primados com LPS (200 ng/ml) por 3 h. As células foram então estimuladas com flagelina de *S. typhimurium* (6 μ g/ml) por 6 h (A). A produção de IL-1 β foi quantificada no sobrenadante da cultura celular por *western blotting*, de acordo com o surgimento da banda ativa desta citocina (17kDa).

De acordo com estes dados, Vijay-Kumar e cols. demonstraram a presença da flagelina de *S. typhimurium* no citosol de macrófagos J774A.1, por fluorescência

e por imunoblotting (Vijay-Kumar et al., 2010). De fato, a maioria dos trabalhos utiliza a flagelina bacteriana purificada de *S. typhimurium* como imunógeno, sendo esta amplamente estudada como adjuvante (Adar et al., 2009; Bargieri et al., 2008; Ben-Yedidia et al., 1999; Chauhan et al., 2005; Le Moigne et al., 2008; Newton et al., 1989; Song et al., 2008). Além disso, recentemente têm sido investigado o requerimento do inflamassoma para a produção de anticorpos induzidos pela administração desta flagelina, corroborando com a idéia de que esta possui a habilidade de alcançar o citosol celular *in vivo* (Lopez-Yglesias et al., 2014; Sanders et al., 2009; Vijay-Kumar et al., 2010).

Tendo em vista os dados obtidos e as questões expostas acima, nós utilizamos a flagelina de *S. typhimurium* para avaliação da indução da via lisossomal na ausência de sistemas de transfecção, a fim de posteriormente avaliar o envolvimento desta via na sua função adjuvante, eliminando desta maneira a interferência do DOTAP neste processo. Para investigar se o tratamento com FLiC-ST pode induzir dano lisossomal, nós tratamos BMDMs com flagelina durante 6 ou 24 h e coramos as células com lysotracker que é um marcador para lisossomas intactos. Dessa maneira, células sofrendo perda de compartimentos lisossomais irão marcar menos para o lysotracker do que células com lisossomas não danificados. Nós utilizamos ainda como controle positivo um peptídeo lisossomotrópico, conhecido por se acumular nos lisossomas causando dano lisossomal (Leu-Leu-OMe). Nós observamos que, de maneira similar ao Leu-Leu-OMe, a FLiC-ST foi capaz de induzir perda lisossomal após 6 h de estímulo, a qual foi ainda mais evidente após 24 h (Figura 16A e 16B), indicando que a flagelina de *S. typhimurium* pode induzir perda lisossomal diretamente sem nenhum sistema de entrega de proteínas exógenas.

Além disso, a fim de detectar mais especificamente se a perda lisossomal induzida pelo tratamento com flagelina culmina na translocação das proteases lisossomais do interior dos lisossomas para o citosol celular, nós utilizamos uma técnica que consiste em realizar uma permeabilização seletiva da membrana plasmática em detrimento da membrana lisossomal. Neste caso, esta metodologia consistiu na utilização de uma solução de saponina, a uma determinada concentração que permite a ruptura da membrana plasmática, porém mantém a integridade da membrana lisossomal. Assim, isolamos o conteúdo citosólico (na ausência de lisossomas) para avaliar a presença citosólica da catepsina B, enzima

associada com dano lisossomal e ativação do inflamassoma. Como demonstrado na Figura 16C, FLiC-ST foi capaz de aumentar a presença da catepsina B no citosol celular, indicando a habilidade desta flagelina em induzir dano lisossomal na ausência de métodos de transfecção, de acordo com os dados obtidos com lysotracker.

Figura 16. FLiC-ST induz dano no lisossoma e liberação do conteúdo lisossomal para o citosol celular.

BMDMs de C57BL/6 (5×10^5 células/poço) foram estimulados com flagelina de *S. typhimurium* (6 µg/ml) por 6 h (A)(B)(C) ou por 24 h (A)(B) ou estimulados com o peptídeo lisossomotrópico Leu-Leu-OMe (2 mM) por 20 min, como controle positivo de dano lisossomal (A)(B). Após estimulação, BMDMs foram marcados com LysoTracker (150 nM) e com o corante celular para marcação de células vivas e mortas, *live/dead*, e então fixados com paraformaldeído a 1%. As amostras foram adquiridas em citômetro de fluxo LSR II (BD Bioscience). Os dados foram analisados com o auxílio do software FlowJo. As barras representam a quantificação da intensidade média de fluorescência obtida em A (B). Alternativamente, as células foram submetidas a uma permeabilização diferencial das membranas plasmáticas e lisossomais mediada por saponina e o conteúdo citosólico foi analisado por *western blotting* para acessar a presença da catepsina B pré-ativada no citosol celular (25KDa) (C).

Uma vez que a flagelina de *S. typhimurium* foi capaz de induzir secreção de

IL-1 β e perda dos compartimentos lisossomais na ausência de metodologias de transfecção, o nosso próximo passo foi avaliar o envolvimento da catepsina B na produção de IL-1 nos macrófagos peritoneais, com o uso do inibidor seletivo, CA-074Me. Ainda, para eliminar a interferência de possíveis contaminantes oriundos do processo de extração da flagelina, nós passamos a utilizar a flagelina ultrapura extraída de *S. typhimurium* (FLiC-STU), também obtida da empresa InvivoGen. No entanto, por ser obtida após uma etapa adicional de purificação utilizando cromatografia de alta afinidade com anticorpo monoclonal anti-FliC, a sua pureza é considerada máxima (>95%), de acordo com a empresa.

Nós observamos que a FLiC-STU foi igualmente capaz de induzir produção das citocinas IL-1 β (Figura 17A) e IL-1 α (Figura 17B) por MPs. Ainda, a presença de CA-074Me diminuiu consideravelmente a produção de ambas as citocinas pelos macrófagos estimulados em resposta à flagelina ultrapura, confirmando o papel da catepsina B na secreção de IL-1 em resposta à flagelina livre, conforme observado anteriormente com as outras preparações de flagelina. Nesse sentido, estes dados confirmam que a flagelina bacteriana induz múltiplas vias intracelulares, mesmo na ausência de vesículas de transfecção, que culminam na produção de citocinas pelos macrófagos, podendo, dessa maneira, impactar as suas propriedades imunológicas.

Figura 17. A produção de citocinas em resposta à flagelina ultrapura é regulada pela via lisossomal nos macrófagos peritoneais.

PMs (3×10^5 células/poço) de camundongos C57BL/6 foram tratados ou não com o inibidor seletivo da catepsina B CA-074Me (30 ou 60 μ M) por 1 h e meia antes da adição do estímulo. As células foram então primadas com LPS (200 ng/ml) por 3 h e posteriormente estimuladas com flagelina ultrapura de *S. Typhimurium* (3 μ g/ml) por 6 h, na presença ou ausência de CA-074Me. A produção das citocinas IL-1 β (A) e IL-1 α (B) foi quantificada nos sobrenadantes das culturas por ELISA. Os números representam as médias $\pm$ SEM ($n = 2$). Foram considerados significativos *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ após aplicação de Two way ANOVA.

4.6 A via dos inflamassomas parece estar envolvida na modulação do perfil da resposta imune celular e humoral induzida por flagelina de *S. typhimurium*

Uma vez que a flagelina de *S. typhimurium* administrada na ausência de vesículas de transfecção foi capaz de induzir dano lisossomal e ativação dos inflamassomas, culminando na produção das citocinas IL-1 β e IL-1 α , nós investigamos sua habilidade em induzir resposta imune adaptativa. Tendo em vista a importância das DCs para este processo, primeiramente, nós realizamos ensaio de apresentação de antígenos, *in vitro*, consistindo na co-cultura de BMDCs previamente estimuladas com flagelina e pulsadas com o peptídeo da ovalbumina (OVA) restrito ao MHC-II (pOVA 323-339) com esplenócitos de animais transgênicos OT-II (cujo repertório de linfócitos TCD4 é específico para o reconhecimento deste peptídeo via MHC-II). Após o quinto dia de co-cultura, nós observamos que as BMDCs estimuladas previamente com flagelina foram capazes de induzir a diferenciação dos linfócitos OTII para células produtoras tanto de IFN- γ quanto de IL-

17 (Figura 18A e 18B) ao contrário de DCs primadas com LPS e pulsadas com OVA na ausência de flagelina, indicando a habilidade deste agonista na diferenciação de linfócitos T específicos para ambos os perfis Th1 e Th17.

Para análise do potencial da flagelina em induzir resposta imune humoral, nós utilizamos o modelo de imunização com ovalbumina, em um regime de “prime e boost” homólogo, conforme descrito previamente (Vijay-Kumar et al., 2010), no qual 50 µg de OVA foram administrados na presença ou não de flagelina recombinante de *S. typhimurium* (10 µg) por via intraperitoneal em camundongos C57BL/6, de acordo com o esquema da figura 18C. Camundongos imunizados intraperitonealmente com OVA na presença de flagelina produziram títulos de anticorpos IgG totais específicos para OVA maiores do que os camundongos que receberam a proteína OVA sozinha, demonstrando o efeito adjuvante da flagelina na resposta humoral à outra proteína (Figura 18D). A fim de determinar a qualidade desta resposta, nós avaliamos as subclasses de IgG produzidas quando os camundongos são imunizados com OVA coadministrada ou não com flagelina. Apesar das diferenças não significativas, foi observada uma tendência dos animais imunizados com a OVA na presença de flagelina produzirem níveis mais elevados de anticorpos IgG1 e, em menor escala, de anticorpos IgG2a, quando comparados com a administração de OVA na ausência da flagelina (Figura 18D).

Figura 18. Indução de resposta imune adaptativa por flagelina.

BMDCs de animais C57BL/6 (10^5 células/poço) foram primadas com LPS (200 ng/ml por 3h) e então cultivadas por 18 h com flagelina ultrapura de *S. typhimurium* (3 μ g/ml). Após esse período, as células foram pulsadas com o peptídeo da ovalbumina restrito ao MHC-II (1 μ g/ml) por 2 h antes da adição de esplenócitos de camundongos OT-II (5×10^5 células/poço). Após 5 dias de co-cultura, a produção de IFN- γ (A) e IL-17 (B) foi quantificada no sobrenadante das culturas por ELISA. Os números representam as médias $\pm$ SD (n=3). Foi considerado significativo *p<0,05 após aplicação de Student's T test. O Protocolo de prime e boost homólogo adotado para os experimentos de imunização dos animais com OVA e flagelina está representado em (C). A produção de anticorpos séricos IgG totais e das sub-classes IgG1 e IgG2a específicos para OVA foram detectados no soro por ELISA 42 dias após o prime (D). Dados representativos de 3 experimentos.

Uma vez que, tanto o receptor TLR5 quanto o eixo NLRC4/caspase-1/catepsinas podem estar envolvidos no reconhecimento da flagelina na ausência de vesículas de transfecção (Hayashi et al., 2001; Lightfield et al., 2008; Lightfield et al., 2011; Smith et al., 2003; Zhao et al., 2011), o próximo passo foi investigar o envolvimento diferencial dessas vias na resposta imune celular e humoral induzida pela flagelina.

Inicialmente, nós analisamos o envolvimento de TLR5, NLRC4 e caspase-1/11 na indução de resposta imune humoral, através da imunização de camundongos *knockouts* para essas moléculas com ovalbumina coadministrada ou não com flagelina, conforme descrito anteriormente. Nós observamos que a capacidade da flagelina em elevar a produção de IgG anti-OVA total no soro dos animais imunizados ocorre de maneira independente de TLR5 e do eixo NLRC4/caspase-1 (Figura 19A), sugerindo um papel redundante para estas vias. Entretanto, embora a ausência do inflamassoma não tenha afetado a produção de anticorpos totais IgG anti-OVA induzidos pela coadministração de flagelina, a ausência destas moléculas, mas não de TLR5, parece modular o padrão de resposta de subclasses de IgG, uma vez que os animais deficientes na via do inflamassoma apresentam uma tendência a terem os títulos de IgG1 diminuídos enquanto apresentam um aumento no perfil de anticorpos do tipo IgG2a (Figuras 19B e 19C), ao contrário do que é observado para os animais *wild type* (Figura 19D). Estes dados indicam a capacidade da flagelina de *S. typhimurium* em alcançar o citosol celular *in vivo*, e sugerem que o seu reconhecimento intracelular pelos inflamassomas contribui para a modulação do perfil da resposta imune humoral, enquanto o reconhecimento da flagelina por TLR5 parece não participar da modulação das subclasses de IgG.

Figura 19: Moléculas do inflamassoma participam da modulação do perfil de resposta imune humoral induzida pela flagelina.

Camundongos deficientes em TLR5, NLRC4 e caspase-1 foram imunizados segundo protocolo de prime e boost (28º dia) homólogo com OVA coadministrada ou não com flagelina e a produção de anticorpos séricos foi avaliada no 42º dia após o prime. (A) Produção de anticorpos séricos IgG totais específicos para ovalbumina detectados por ELISA 42 dias após o prime. (B)(C) Produção de anticorpos séricos das sub-classes IgG1 e IgG2a, específicos para OVA detectados por ELISA 42 dias após o prime, respectivamente.

Com relação à indução da resposta imune celular, durante ensaio de co-cultura, nós observamos que a flagelina induz produção de IL-1 β e IL-1 α de maneira dependente de caspase-1 (Figura 20A e 20B) e NLRC4 (Figura 20C e 20D), confirmando sua habilidade em ativar o inflamassoma nas DCs, assim como previamente mostrado para os MPs e BMDMs. Importante, apesar do seu reconhecimento extracelular pelo TLR5, a produção de IL-1 β em resposta a flagelina foi independente deste receptor (Figura 20E). Ainda, a protease caspase-1 parece estar envolvida na capacidade da flagelina em induzir aumento da expressão das moléculas de MHC-II na superfície das BMDCs (Figura 20F), dado que também demonstra uma tendência em ocorrer de maneira similar na ausência de NLRC4 (Figura 20G). Dessa maneira, estes dados sugerem o envolvimento do inflamassoma na capacidade adjuvante da flagelina.

De fato, tanto a produção de IFN- γ quanto de IL-17 estavam diminuídas no sobrenadante das co-culturas quando os linfócitos foram cultivados com DCs deficientes em caspase-1/11 (Figura 21A e 21B). Ainda, a produção de IL-17 também se mostrou dependente da molécula NLRC4 (Figura 21C), mas não do receptor TLR5 (Figura 21D), consistente com o envolvimento de mecanismos dependentes do inflamassoma na capacidade da flagelina em induzir a diferenciação de linfócitos T específicos.

Finalmente, para avaliar a influência de citocinas inflamatórias reguladas pelas vias citosólicas induzidas pela flagelina, verificamos a capacidade de DCs provenientes de animais deficientes em IL-1 α na indução da produção de IFN- γ e IL-17 por linfócitos T. As Figuras 22A e 22B mostram que DCs de animais deficientes em IL-1 α estimuladas com flagelina apresentam deficiência na indução da produção de IFN- γ e IL-17 pelos linfócitos T no modelo de OVA. Uma vez que as DCs deficientes em IL-1 α também apresentam produção de IL-1 β reduzida em resposta à flagelina (dados não mostrados), a participação relativa das citocinas IL-1 α e IL-1 β para o processo de diferenciação de linfócitos T está sendo avaliada com a inibição particular destas citocinas através da adição de anticorpos específicos na co-cultura. Juntos, estes dados sugerem o envolvimento de IL-1 β e IL-1 α , na capacidade da flagelina em induzir a diferenciação de linfócitos para os perfis Th1 e Th17. Uma vez que a produção destas citocinas em resposta à flagelina requer a ativação dos inflamassomas e da via lisossomal, estes dados sugerem o envolvimento destas

vias neste processo.

Juntos, nossos dados mostram que a ativação individual das vias provenientes do reconhecimento extracelular da flagelina pelo TLR5 e intracelular pelo inflamassoma NAIP5/NLRC4, resulta em respostas efetoras redundantes e não redundantes, ambas contribuindo para uma eficiente condução da resposta imune adaptativa, evidenciando assim o potencial da flagelina como modelo para o desenvolvimento de estratégias vacinais profiláticas ou terapêuticas baseadas nos inflamassomas.

Figura 20. Caspase-1/11 e NLRC4, mas não TLR5 estão envolvidos na produção de IL-1 em resposta à flagelina.

BMDCs (10^5 células/poço) de animais C57BL/6 ou deficientes em caspase-1/11, NLRC4 e TLR5 foram primadas com LPS (200 ng/ml por 3h) e então cultivadas por 18 h com flagelina ultrapura de *S. typhimurium* (3 μ g/ml). Após esse período, a produção de IL-1 β (A)(C)(E) e IL-1 α (B)(D) foi quantificada no sobrenadante das culturas por ELISA. Os números representam as médias $\pm$ SD (n = 3). Dados representativos de 3 experimentos. As células de animais C57BL/6 ou deficientes em caspase-1/11 e NLRC4 estimuladas como descrito anteriormente, foram marcadas com anticorpos específicos e levadas ao citômetro de fluxo para análise da expressão dos marcadores de superfície. O aumento da expressão de moléculas MHC-II induzido pela flagelina está representado em (F)(G) pela razão entre: Células primadas e estimuladas com flagelina/Células que foram somente primadas. Os números representam as médias $\pm$ SD (n = 3). Foram considerados significativos ***p<0.001, **p<0.01 e *p<0,05; após aplicação de Two way ANOVA ou One way ANOVA.

Figura 21. Caspase-1/11 e NLRC4, mas não TLR5 estão envolvidos na diferenciação de linfócitos T em resposta à flagelina.

BMDCs (10^5 células/poço) de animais C57BL/6 ou deficientes em caspase-1/11, NLRC4 e TLR5 foram primadas com LPS (200 ng/ml por 3h) e então cultivadas por 18 h com flagelina ultrapura de *S. typhimurium* (3 µg/ml). Após esse período, as células foram pulsadas com o peptídeo da ovalbumina restrito ao MHC-II (1 µg/ml) por 2 h antes da adição de esplenócitos de camundongos OT-II (5×10^5 células/poço). Após 5 dias de co-cultura, a produção de IFN- γ (A) e IL-17 (B)(C)(D) foi quantificada no sobrenadante das culturas por ELISA. Os números representam as médias $\pm$ SD (n = 3). Dados representativos de 3 experimentos. Foram considerados significativos ***p<0.001, **p<0.01 e *p<0,05; após aplicação de Two way ANOVA ou One way ANOVA.

Figura 22. IL-1 α participa na diferenciação de linfócitos T em resposta à flagelina.

BMDCs (10^5 células/poço) de animais C57BL/6 ou deficientes em IL-1 α foram primadas com LPS (200 ng/ml por 3h) e então cultivadas por 18 h com flagelina ultrapura de *S. typhimurium* (3 μ g/ml). Após esse período, as células foram pulsadas com o peptídeo da ovalbumina restrito ao MHC-II (1 μ g/ml) por 2 h antes da adição de esplenócitos de camundongos OT-II (5×10^5 células/poço). Após 5 dias de co-cultura, a produção de IFN- γ (A) e IL-17 (B) foi quantificada no sobrenadante das culturas por ELISA. Os números representam as médias $\pm$ SD (n = 3). Dados representativos de 3 experimentos. Foram considerados significativos ***p<0.001, **p<0.01 e *p<0,05; após aplicação de Two way ANOVA ou One way ANOVA.

O estudo da resposta de macrófagos e DCs à flagelina purificada utilizando diferentes abordagens experimentais permitiu a identificação de novas bases moleculares que regulam a ativação dos inflamassomas em resposta a este agonista. Mais especificamente, os dados apresentados nesta tese demonstram, pela primeira vez, o envolvimento de proteases lisossomais na secreção das citocinas IL-1 β e IL-1 α em resposta à flagelina, que são completa e parcialmente reguladas pela atividade da caspase-1, respectivamente. Interessante, nosso trabalho demonstrou que a produção destas citocinas em resposta à flagelina regula a indução de resposta imune adaptativa de perfil Th1 e Th17. Além disso, nós também observamos a importância relativa do reconhecimento da flagelina pelo TLR5 e pelo eixo NLRC4/caspase-1 na produção de anticorpos em modelo de imunização com ovalbumina, evidenciando o caráter redundante da resposta imunológica a este agonista, e, ao mesmo tempo, o requerimento diferencial destas vias para o direcionamento do perfil da resposta imune humoral.

Nossas primeiras observações com a inserção da flagelina purificada de *B. Subtilis* no citosol celular via DOTAP (FLA-BSDot) nos permitiram verificar que o dano lisossomal pode induzir um processo de morte celular que acontece independente de caspases (Figura 6 e Figura 10), mas que preserva características necróticas observadas na presença da caspase-1 (Figura 10). É bem estabelecido que a indução de dano lisossomal moderado, com a liberação lenta e gradual das hidrolases lisossomais para o citosol, culmina em morte celular apoptótica controlada por catepsinas (Boya, Kroemer, 2008). Uma vez no citosol, as catepsinas B e D podem induzir apoptose de maneira sinérgica por simultaneamente clivarem a proteína pro-apoptótica Bid, e os membros anti-apoptóticos da família Bcl-2, como Bcl-2, Bcl-xL, Ncl-1 e XIAP (Foghsgaard et al., 2001; Kagedal et al., 2001a; Kagedal et al., 2001b; Repnik, Turk, 2010; Yamashima, 2000). De acordo com isso, a morfologia inicial observada em resposta ao FLA-BSDot na ausência de caspase-1/11, que se caracteriza pelo encolhimento celular e formação de blebs na membrana (Figuras 9 e 10), poderia ser resultado da ativação da maquinaria apoptótica pelas catepsinas lisossomais no citosol. Entretanto, diferente das células apoptóticas, os macrófagos deficientes em caspase-1/11 sofrem rápida perda da integridade da membrana plasmática, o que é mais consistente com uma indução massiva de permeabilidade da membrana lisossomal e a consequente perda da integridade dessa organela (Boya, Kroemer, 2008). Neste caso, a morte celular

mediada por dano lisossomal, comumente resulta em um processo necrótico descontrolado, na ausência de ativação completa do programa apoptótico de morte celular, onde os macrófagos exibem características mistas de apoptose e necrose, consistente com as nossas observações.

Sendo assim, no nosso modelo, a via lisossomal desempenha um papel central na indução da morte celular, uma vez que a inibição prévia da acidificação lisossomal pela bafilomicina A1, ou a inibição conjunta das catepsinas lisossomais mais abundantes, as catepsinas B e D, mas não a ausência de caspase-1/11, suprime a indução de morte celular (Figura 12). Neste caso, uma vez que a morte celular ocorre menos pronunciadamente e com características iniciais distintas na presença de caspase-1/11, é possível que estas caspases inflamatórias sejam fatores acessórios/catalíticos deste processo. Isto reproduz o que ocorre durante a apoptose, particularmente após estímulos que induzem a via intrínseca, onde as caspases efetoras da apoptose, as caspases-3, -6 e -7, também não são requeridas para a indução de morte celular, porém, são essenciais para imprimir as características típicas da apoptose, como a exibição da anexina V na face externa da membrana, a degradação do DNA e a inativação de DAMPs, nas células que já estão destinadas a morrer (Amarante-Mendes et al., 1998; Kroemer, Martin, 2005; Pereira, Amarante-Mendes, 2011). Da mesma forma, nossos dados propõem que a morte celular induzida pela inserção da flagelina no citosol não seja regulada pela caspase-1, mas sim, que esta protease é a responsável por imprimir características específicas a estas células que já estão destinadas a morrer, como a formação de poros na membrana plasmática (que, neste caso, seria um importante acelerador do processo de inchaço e lise osmótica) e o processamento e liberação das citocinas inflamatórias IL-1 β e IL-18.

Além disso, a própria formação de poros mediados pela caspase-1 na membrana celular, também pode atuar como “alça positiva” para a mobilização dos lisossomas. De acordo com isso, foi descrito que durante a piroptose, as células podem sofrer um processo ativo de exocitose de compartimentos lisossomais mediado pela caspase-1 (Bergsbaken et al., 2011). Os autores demonstraram que a formação desses poros durante infecção com *S. typhimurium* promove influxo de cálcio extracelular, crítico para o processo de exportação dos lisossomas, culminando em perda dos compartimentos lisossomais e liberação das enzimas do interior dos lisossomas para o meio extracelular. Ainda, este processo foi capaz de

aumentar a natureza antimicrobiana da piroptose, *in vitro*, uma vez que as moléculas liberadas mantiveram a atividade microbicida no meio extracelular, atuando diretamente nas bactérias do meio.

De acordo com isso, nós também demonstramos a relevância biológica da morte celular induzida pela flagelina no modelo de infecção por *S. typhimurium*. Nós observamos que a presença da flagelina se correlacionou com a indução de morte celular e com a diminuição da carga bacteriana encontrada nas culturas celulares, como descrito anteriormente por vários autores (revisado por ((Bergsbaken et al., 2009; Bortoluci, Medzhitov, 2010; Lage et al., 2014)). Entretanto, uma vez que esta correlação também ocorreu nos macrófagos deficientes em caspase-1/11, estes dados sugerem que o dano lisossomal induzido pela flagelina que regula a morte celular independente de inflamassoma possa estar mediando esse processo.

Ainda, tem sido proposto que os lisossomas abrigam moléculas potencialmente inflamatórias quando encontradas no meio extracelular, como HMGB-1 e Hsp70 (Blott, Griffiths, 2002; Gardella et al., 2002; Mambula, Calderwood, 2006). Assim, estes achados corroboram a idéia de que processos de morte celular possam participar como mecanismos efetores das células da imunidade inata, não apenas por destruir o nicho de replicação bacteriana, mas também pela liberação concomitante de citocinas inflamatórias, moléculas com atividade antimicrobiana, além do conteúdo citosólico potencialmente inflamatório, que funcionam como amplificadores da resposta. Neste sentido, os lisossomas dos macrófagos infectados contêm produtos de degradação de bactérias e a sua fusão com a membrana celular poderia ser ainda um mecanismo amplificador do processo de apresentação de antígenos pelas células vizinhas, levando à ativação robusta da imunidade adaptativa.

Nossos achados mostram ainda que a via lisossomal induzida por diferentes preparações de flagelina (FLA-BSDot, FLiCDot, FLiC-ST e FLiC-STU) coopera com o NLRC4 para a ativação da caspase-1 e, conseqüentemente, para a produção das citocinas, IL-1 β e IL-1 α , uma vez que estas são inibidas na presença de CA-074Me. O CA-074Me é o derivado permeável a membranas do composto CA-074. Embora já tenha sido demonstrado que este composto é mais seletivo para a catepsina B do que a forma CA-074Me, uma vez no citosol celular, o CA-074Me é rapidamente convertido na forma CA-074 pela ação de esterases intracelulares (Buttle et al., 1992). Além disso, ambos possuem o potencial de inibir a catepsina L sob condições

redutoras, *in vivo* (Montaser et al., 2002). Porém, diferentemente da catepsina B, a catepsina L apresenta atividade instável em pH neutro, tendo, portanto, sua função inibida no ambiente citosólico (Turk et al., 1993; Turk et al., 2012). Sendo assim, embora o CA-074Me tenha o potencial de inibir outras catepsinas, sua ação *in vitro*, tem sido de fato atribuída à inibição da atividade da catepsina B no citosol celular (Hook et al., 2012). Ainda, apesar de ter sido sugerido um papel para o CA-074Me na inibição de outros alvos intracelulares em adição à inibição potencial das enzimas lisossomais (Ewald et al., 2008), nós nos certificamos de que a caspase-1 não é um alvo molecular do CA-074Me (Figura 13), e, portanto, a inibição das citocinas em resposta à flagelina não se deve a uma atividade inespecífica do CA-074Me sobre a caspase-1.

Além disso, nós demonstramos que a vesícula DOTAP vazia não induz morte nos macrófagos estimulados, liberação de citocinas, ou qualquer sinal de dano lisossomal na concentração utilizada (Figuras 6,11,12,13). Em contraste com o que foi observado com as flagelinas (recombinantes e nativas) de *S. typhimurium*, a estimulação com uma proteína não relacionada purificada da mesma maneira que a flagelina recombinante de *S. typhimurium* e inserida no DOTAP na mesma concentração molar (i.e. proteína p24 do HIV, produzida em uma cepa de *E. coli* (BL21DE)) não induziu morte do macrófago, secreção de IL-1 β e ruptura lisossomal, sugerindo um efeito particular para a flagelina inserida no DOTAP (Figura 7). Entretanto, ainda com todos esses controles experimentais, não podemos deixar de considerar que as diferentes preparações de flagelina no DOTAP induzam vias intracelulares distintas que culminem na liberação de catepsinas para o citosol celular e na ativação do inflamassoma, especialmente levando em consideração que o mecanismo pelo qual o DOTAP libera seu conteúdo no interior das células ainda não é um consenso na literatura. Acredita-se que estas vesículas possam fundir com a membrana plasmática celular, liberando desta maneira o seu conteúdo diretamente no citosol (Buzzo et al., 2010b; Franchi et al., 2006; Lage et al., 2013; Walker et al., 1992) Porém, tem sido proposto que estas vesículas possam se fundir com compartimentos endo-lisossomais levando à liberação do seu conteúdo nos lisossomas, o que culmina em dano lisossomal (Hafez et al., 2001). Além disso, já foi descrito que o DOTAP sozinho possui alguma atividade desestabilizadora no lisossoma (Wattiaux et al., 1997).

De fato, dados não mostrados realizados com BMDMs primados com LPS e estimulados com DOTAP (uso equivalente à 6 µg/ml de proteína) em meio otimizado e livre de SFB (OPTIMEN) revelaram a presença de produção de IL-1β e caspase-1 ativas no sobrenadante das culturas celulares, embora em níveis consideravelmente inferiores se comparados à preparação de flagelina inserida no DOTAP. Adicionalmente, nesse sistema de cultura, a ovalbumina também foi capaz de induzir a ativação de caspase-1 e secreção de IL-1β quando inserida no DOTAP, respostas que foram inibidas com adição de CA-074Me, indicando que estas vesículas ao serem preenchidas com outra proteína não-relacionada, podem ainda induzir desordem citoplasmática que resultam na ativação dos inflamassomas, embora a flagelina potencialize consideravelmente este processo. No entanto, nesses casos, a presença do pré-tratamento com LPS e a ausência do SFB foram diferenciais em relação aos experimentos realizados com os PMs, fatores que poderiam contribuir para tornar os ensaios mais sensíveis à detecção de baixos níveis de IL-1β ou propiciar a maior sensibilidade dos macrófagos à ação do DOTAP.

Ainda que o DOTAP facilite a entrega da flagelina para o citosol celular e que possa potencializar os efeitos da flagelina, constituindo dessa forma uma importante ferramenta para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas baseadas nesse agonista, como descrito para outros modelos (Korsholm et al., 2012; Schwendener, 2014) o fato é que a flagelina purificada da bactéria *S. typhimurium* conserva as suas propriedades de ativar os inflamassomas e a via lisossomal na ausência de sistemas de carreamento (Figuras 15,16 e 17).

Não por acaso, a flagelina purificada desta bactéria é comumente usada como imunógeno, sendo amplamente aplicada como adjuvante experimental (Adar et al., 2009; Bargieri et al., 2008; Ben-Yedidia et al., 1999; Chauhan et al., 2005; Le Moigne et al., 2008; Newton et al., 1989; Song et al., 2008). De acordo com os nossos dados, Vijay-Kumar e cols. demonstraram a presença da flagelina de *S. typhimurium* no citosol de macrófagos J774A.1, por fluorescência e por imunoblotting (Vijay-Kumar et al., 2010). Além disso, o requerimento do inflamassoma para a produção de anticorpos induzidos pela administração desta flagelina, observado na Figura 18 e na Figura 22, e corroborado por outros estudos (Lopez-Yglesias et al., 2014; Sanders et al., 2009; Vijay-Kumar et al., 2010) confirmam o fato de que a flagelina de *S. typhimurium* possui a habilidade de alcançar o citosol celular também *in vivo*.

É interessante notar que, de maneira distinta da flagelina de *S. typhimurium*, a flagelina purificada de *B. subtilis* não é capaz de alcançar o citosol celular na ausência de vesículas de transfecção (Lage et al., 2013). Ainda, nós utilizamos um outro sistema de carregamento de proteínas exógenas para o citosol celular, que consiste na liberação da flagelina de *L. pneumophila* (FlaA) para o citosol por meio de sua fusão com o domínio N-terminal do fator letal do *Bacillus anthracis* (LFn), denominada LFn-FlaA. Esta proteína recombinante é colocada em solução com o chamado “Antígeno protetor” (PA) que é capaz de mediar a translocação de LFn para o citosol após endocitose levando consigo a flagelina (von Moltke et al., 2012). Nós observamos que a produção de IL-1 β induzida por LFn-FlaA não foi inibida pelo CA-074Me, indicando que a translocação da flagelina de *Legionella* para o citosol com o auxílio de outra técnica não reproduz o perfil de produção de IL-1 β de maneira dependente de catepsinas (dados não mostrados).

Essas observações nos retornam a uma questão surgida durante o desenvolvimento da tese de mestrado: a de que as diferentes flagelinas bacterianas, apesar de possuírem o domínio conservado de ligação ao NAIP5/6, podem exibir propriedades físico-químicas distintas, diferindo nas respostas induzidas. Por exemplo, a flagelina de *B. subtilis* possui 275 aminoácidos em toda a sua estrutura linear, enquanto a flagelina da *S. typhimurium* possui 495 aminoácidos. Esta diferença no tamanho da proteína e na natureza dos aminoácidos que a compõem pode conferir uma mudança de conformação quaternária e de carga elétrica, permitindo que tenham interações particulares com determinadas moléculas celulares, apesar da habilidade comum a ambas em ativarem os receptores NAIP.

No entanto, o mecanismo pelo qual a flagelina de *S. typhimurium* alcança o citosol celular ainda precisa ser elucidado. Dados preliminares do nosso grupo, utilizando um sistema *cell free* baseado em filmes de Langmuir, obtidos em colaboração com o Prof. Dr. Luciano Caseli, do Departamento de Ciências Biológicas da UNIFESP, mostraram que a flagelina de *S. typhimurium* é capaz de interagir com fosfolípides da membrana plasmática e romper suas cabeças polares (dados não mostrados). Essa habilidade particular em interagir com membranas, por exemplo, pode conferir a esta flagelina a capacidade de induzir dano na membrana lisossomal diretamente. Ainda, a própria entrada da flagelina pode levar a distúrbios citoplasmáticos, como mobilização de íons, p.e., que poderiam contribuir para a sua habilidade única em induzir ativação da via lisossomal e dos inflamassomas.

Curiosamente, a indução de dano lisossomal acompanhado de liberação de catepsinas é um evento até o momento associado com a ativação de outro complexo inflamassoma, o NLRP3, mas não do inflamassoma NAIP/NLRC4. É bem estabelecido que a fagocitose de estruturas cristalinas como o MSU, a sílica e a hemozoína levam ao rompimento do lisossoma seguido de perda das catepsinas B pré-ativadas para o citosol celular, o que culmina em ativação do inflamassoma NLRP3 (Eisenbarth et al., 2008; Hentze et al., 2003; Hornung et al., 2008; Li et al., 2008). Nestes casos, embora o mecanismo preciso pelo qual o inflamassoma é ativado em resposta a catepsina B ainda seja pouco compreendido, a sua inibição abole a produção de IL-1 β e IL-18. De fato, embora não esteja envolvido com a morte celular induzida pela flagelina citosólica (Figura 11), dados do nosso grupo demonstram que a produção de IL-1 β induzida por flagelina é parcialmente inibida nas células deficientes em NLRP3 (dados não mostrados), indicando um papel para este inflamassoma na produção de IL-1 β em resposta à flagelina.

Uma vez que a flagelina não é classicamente considerada um estímulo ativador de NLRP3, estes dados indicam novas diretrizes para a ativação deste inflamassoma e abrem a possibilidade de uma interação entre as moléculas NLRP3 e NLRC4, uma vez que ambos cooperam concomitantemente para a resposta do macrófago à flagelina. De acordo com esta hipótese, foi recentemente demonstrado o recrutamento de ambas as moléculas NLRP3 e NLRC4 para o mesmo complexo inflamassoma em resposta à infecção com *S. typhimurium*. Os autores demonstraram que *S. typhimurium* ativa simultaneamente ambos NLRP3 e NLRC4 e que estas duas moléculas se co-localizam no citosol dos macrófagos infectados no mesmo foco de ASC. Ainda, tanto NLRP3 quanto NLRC4 são requeridos para o processamento da citocina IL-1 β pelas células infectadas e para a regulação da carga bacteriana, *in vivo* (Man et al., 2014). Assim, nossos dados abrem a possibilidade do envolvimento do inflamassoma NLRP3 nas vias induzidas por flagelina, o que é atualmente alvo de investigações do nosso grupo.

Contudo, é interessante notar que a produção de IL-1 β em resposta à flagelina é abolida na ausência de NLRC4, sugerindo que esse inflamassoma estaria *upstream* da ativação do NLRP3. Além disso, estes dados abrem a possibilidade de que o distúrbio citosólico induzido pela flagelina leve à indução de vias intracelulares distintas que contribuem para a ativação do próprio NLRC4, de maneira

independente da sua interação molecular com o NAIP5/6 e do envolvimento parcial do inflamassoma NLRP3. Os nossos dados vão de encontro com trabalhos recentes mostrando que a fosforilação do NLRC4, uma etapa crítica para a ativação do inflamassoma NAIP/NLRC4, ocorre independente da presença do NAIP, corroborando com a idéia de que a flagelina possa induzir inúmeros outros sinais de maneira independente da sua ligação física com o receptor NAIP, que são essenciais para a ativação deste complexo inflamassoma (Matusiak et al., 2015; Qu et al., 2012).

Nossos dados demonstram que o potencial da flagelina em induzir diferenciação de linfócitos T específicos, *in vitro*, ocorre de maneira dependente do inflamassoma NLRC4/caspase-1 e da sinalização da IL-1 α (Figuras 21 e 22). Embora não seja possível verificar diretamente o envolvimento das catepsinas neste processo, uma vez que sua inibição poderia afetar o programa de apresentação de antígenos das DCs (Rudensky, Beers, 2006), considerando-se que a produção de IL-1 α em resposta à flagelina é parcialmente regulada pela ativação do inflamassoma e pela catepsina B podemos inferir que a via lisossomal está envolvida na capacidade da flagelina em induzir diferenciação de linfócitos T, *in vitro*.

As citocinas IL-1 β e IL-1 α possuem muitos pontos em comum: 1) são sintetizadas no citoplasma e secretadas por uma via não convencional, através de um mecanismo independente do Complexo de Golgi e do Retículo Endoplasmático; 2) são liberadas simultaneamente por diversos estímulos e 3) agem no mesmo receptor IL-1R1 (revisado por (Dinarello, 2009; Sims, Smith, 2010)). Neste contexto, a caspase-1 é a responsável não só pela clivagem da IL-1 β , mas também pela liberação da IL-1 β ativa para o meio extracelular por mecanismos ainda controversos (Dinarello, 1998; Fantuzzi, Dinarello, 1999; Keller et al., 2008; Monteleone et al., 2015; Silveira, Zamboni, 2010). Em contrapartida, a pro-IL-1 α não é um substrato direto da caspase-1 e não requer processamento para a sua ligação ao receptor IL-1R1 (Dinarello, 1998) embora a sua clivagem por calpaínas (Gross et al., 2012) e granzima B (Afonina et al., 2011) já tenha sido reportada, o que parece potencializar os seus efeitos. Entretanto, em resposta a diferentes preparações de flagelinas (livres ou inseridas no DOTAP), a produção de IL-1 α estava inibida na ausência de caspase-1/11 ou após tratamento prévio com CA-074Me (Figuras 10, 13, 17 e 20), adicionando o envolvimento das catepsinas nas outras atividades da caspase-1, além da clivagem direta da citocina IL-1 β .

De acordo com os nossos dados, tem sido demonstrado que as células dos animais *knockouts* para caspase-1 liberam quantidades inferiores de IL-1 α , além da sua incapacidade em secretar IL-1 β . Assim, apesar de não ser um substrato da caspase-1, tem sido sugerido um papel para os inflamassomas na secreção de IL-1 α . Dentre os mecanismos ativos mediados pelos inflamassomas independentes de morte celular, já foi reportado o transporte ativo de IL-1 α por meio de sua interação física com a caspase-1 ou com a IL-1 β , que funcionariam então como moléculas carreadoras, mediando a secreção não convencional de proteínas citoplasmáticas que não são secretadas pelo Golgi (Fettelschoss et al., 2011; Gross et al., 2012; Keller et al., 2008); Em contrapartida, um trabalho recente propõe que a liberação da citocina IL-1 β ocorre somente de maneira passiva, após ruptura da membrana plasmática durante o processo necrótico de morte celular (Cullen et al., 2015), sugerindo o mesmo mecanismo para a IL-1 α produzida concomitantemente. Entretanto, ao contrário do que é observado para a maioria dos agonistas dos inflamassomas, incluindo o estímulo com FLA-BSDot, que são indutores potentes de morte celular, a flagelina livre não parece induzir níveis significativos de morte (dados não mostrados), sugerindo mecanismos ativos de liberação para as citocinas IL-1 β e IL-1 α .

Ainda, uma vez que na ausência de caspase-1 a produção de IL-1 α está sempre inibida, mas nunca abolida, sugere-se mecanismos alternativos independentes de caspase-1 para a secreção de IL-1 α , ao contrário da citocina IL-1 β . De acordo com isso, a sílica e o MSU induziram processamento e secreção de IL-1 α de maneira independente do inflamassoma NLRP3, porém, dependente de fagocitose, maturação lisossomal e da atividade das catepsinas lisossomais, indicando que uma via alternativa pode ser ativada. De fato, os autores observaram que a simples abertura de canais de Ca⁺⁺ foi suficiente para induzir clivagem e secreção de IL-1 α independente dos inflamassomas e dependente de calpaínas (Gross et al., 2012).

Uma vez que a IL-1 α e a IL-1 β são produzidas em resposta aos mesmos estímulos e agem no mesmo receptor, na maioria dos casos em que se observa inflamação dependente do receptor IL-1R1, torna-se difícil discriminar o envolvimento particular de cada citocina. Entretanto, alguns trabalhos mostram a importância diferencial da produção de IL-1 α na inflamação. Uma vez no meio extracelular, essa citocina atua como um potente sinal inflamatório, induzindo

secreção de CXCL1 (do inglês, C-X-C *ligand* 1) por células mesoteliais e recrutamento de neutrófilos via CXCR2 (do inglês, C-X-C *chemokine receptor* 2) (Eigenbrod et al., 2008). Além disso, durante modelo de peritonite induzida por MSU, a secreção de IL-1 α , se mostrou igualmente ou mais importante que a secreção de IL-1 β para a indução da produção de IL-6 e para o recrutamento de neutrófilos (Gross et al., 2012). Assim, além do seu envolvimento na inflamação, os nossos dados adicionam um possível papel para esta citocina na indução de resposta imune adaptativa. Entretanto, considerando-se que as DCs deficientes em IL-1 α , também liberaram quantidades inferiores de IL-1 β em resposta à flagelina (dados não mostrados), investigações futuras serão necessárias para discriminar o papel individual destas citocinas na geração de resposta imune adaptativa.

De maneira interessante a estimulação de DCs com flagelina foi capaz de induzir a geração tanto de linfócitos T produtores de IFN- γ quanto de IL-17 (Figura 18). Sabe-se que a geração do perfil Th1 de linfócitos está classicamente associada à produção de IL-12 pelas APCs (Trinchieri et al., 1992), enquanto diversas citocinas já foram implicadas na diferenciação e manutenção do perfil Th17, como IL-23, TGF- β , IL-6 e IL-1 β (Acosta-Rodriguez et al., 2007; Manel et al., 2008; Volpe et al., 2008). Nos nossos experimentos, além da produção de IL-1 β e IL-1 α , nós também observamos a produção da citocina IL-6 pelas DCs estimuladas com flagelina (dados não mostrados). Entretanto, a produção de IL-6 se manteve inalterada na ausência do inflamassoma ou de IL-1 α , onde a produção de IL-17 pelos linfócitos T está diminuída (Figuras 21 e 22), corroborando com o papel principal da sinalização da IL-1 na diferenciação de células produtoras de IL-17 em resposta à flagelina. Contudo, é possível que um efeito sinérgico entre estas citocinas desempenhem um papel importante. De acordo com isso, foi demonstrado que a diferenciação de linfócitos Th17, *in vivo*, parece ser dependente da expressão do receptor IL1R1 nas células T, que por sua vez foi mediada pela citocina IL-6 (Chung et al., 2009).

Apesar do envolvimento da citocina IL-12 na diferenciação de células Th1 ser classicamente descrito, não foi possível quantificar a produção de IL-12 nas culturas de DCs estimuladas com flagelina. Dentre as citocinas derivadas dos inflamassomas, enquanto a IL-1 β tem sido implicada na geração de células Th17, a citocina IL-18 tem sido mais correlacionada com o perfil Th1 e produção de IFN- γ (Blom, Poulsen, 2012; Nakanishi et al., 2001). Apesar de não quantificarmos a citocina IL-18, nós observamos que a sinalização da IL-1 também parece estar

envolvida na capacidade da flagelina em induzir a geração de células T produtoras de IFN- γ , uma vez que a ausência de IL-1 α ou de caspase-1 exerce um impacto na produção desta citocina pelos linfócitos T (Figuras 21 e 22). De acordo com os nossos achados, foi demonstrado que a administração de IL-1 β aumenta a frequência de células TCD4 produtoras de IL-17 e de IFN- γ e de células TCD8 produtoras de IFN- γ que expressam granzima B em resposta à OVA (Ben-Sasson et al., 2013; Ben-Sasson et al., 2009).

Nos nossos experimentos, uma importante questão a ser abordada é se a diferenciação das células T é mediada por um efeito autócrino da IL-1 sobre as DCs, ou se é um efeito parácrino desta citocina, atuando diretamente sobre os linfócitos T. Nesse sentido, foi demonstrado que a sinalização via IL-1 nas células T é requerida para a diferenciação Th17 de precursores *naïve* mediada por DCs e é responsável por regular a expressão de IRF4 e ROR γ t nos linfócitos Th17 (Chung et al., 2009). Também foi mostrado durante ensaio de imunização, que células TCD4 de camundongos OT-II sofrem expansão celular e adquirem a capacidade de produzir IL-17 em resposta à OVA, após administração de IL-1 β recombinante, mesmo quando transferidas para animais IL1R $^{-/-}$, corroborando com a idéia de que a família IL-1 pode atuar como fator de diferenciação de linfócitos T por agir diretamente nestas células (Ben-Sasson et al., 2011; Ben-Sasson et al., 2009; Ben-Sasson et al., 2013). De maneira interessante, os autores testaram diversas outras citocinas, como IL-1 α , TNF α , IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, IL-18, e IL-33, e, dentre elas, somente a IL-1 α reproduziu o efeito visto com a administração de IL-1 β , sendo ambas mais potentes que a administração de LPS (Ben-Sasson et al., 2011; Ben-Sasson et al., 2013). Neste cenário, os nossos dados indicam o envolvimento adicional da citocina IL-1 α na polarização do perfil de linfócitos T produtores de IFN- γ e IL-17 em resposta à flagelina.

Curiosamente, embora esteja claro o papel da IL-1 como adjuvante na geração dos perfis Th1 e Th17, a utilização de flagelina recombinante solúvel em vários modelos experimentais, é mais correlacionada na literatura com uma resposta de perfil Th2, acompanhada da produção de IL-4 e, predominantemente, de anticorpos da subclasse IgG1 (Bargieri et al., 2008; Cunningham et al., 2004; Honko et al., 2006; Lee et al., 2006). Apesar das diferenças não significativas, nós observamos uma tendência dos animais imunizados com a OVA na presença de flagelina produzirem níveis mais elevados de anticorpos IgG1 e, em menor escala,

de anticorpos IgG2a, quando comparados com a administração de OVA na ausência da flagelina (Figura 18), sugerindo que a flagelina tem o potencial de induzir diferentes subclasses de anticorpos. Interessante, nós também observamos que a ausência de NLRC4 ou caspase-1, mas não de TLR5, parece modular o padrão de resposta de subclasses de IgG para um balanço mais IgG2a (Figura 19), sugerindo que o reconhecimento intracelular da flagelina pelos inflamassomas (e, por conseguinte, a produção de IL-1) pode contribuir para a indução de uma resposta preferencialmente IgG1. De acordo com isso, a administração de IL-1 β *in vivo* durante *priming* de células TCD4 não só aumentou a proporção de células Th17 dentre as células respondedoras, como também promoveu a expansão de células produtoras de IFN- γ e de IL-4, no baço e no linfonodo dos animais imunizados, acompanhado de um aumento dos níveis de IgGE e IgG1 no soro dos animais (Ben-Sasson et al., 2009), sugerindo, de fato, a habilidade da flagelina em ativar múltiplas vias que culminam na indução concomitante de diferentes perfis de resposta imune adaptativa celular e humoral.

De maneira interessante, embora o reconhecimento da flagelina pelo receptor TLR5 tenha sido correlacionado com o aumento na expressão de moléculas co-estimulatórias nas DCs, com a produção de citocinas e quimiocinas, além da proliferação de células T específicas em resposta a um antígeno exógeno conjugado à flagelina (Arimilli et al., 2008; Bates et al., 2009; Means et al., 2003; Sanders et al., 2009), a ativação da caspase-1 e produção de IL-1 β procede normalmente nas DCs deficientes em TLR5 (Figura 20), conforme anteriormente demonstrado durante infecção com *S. typhimurium* (Miao et al., 2006). Isto se refletiu na produção de IL-17 pelos linfócitos co-cultivados com as DCs, que permaneceu intacta na ausência de TLR5 (Figura 21). De acordo com isso, a ausência de TLR5 também não impactou o perfil de anticorpos induzido pela flagelina, indicando que o reconhecimento da flagelina pelo TLR5 e pelo NAIP/NLRC4 nas APCs culmina em respostas não redundantes que se somam para uma resposta adaptativa robusta.

Em contrapartida, a ativação individual destes sensores parece promover vias que são suficientes para a produção de anticorpos totais induzidos pela imunização com flagelina, uma vez que a ausência do receptor TLR5 ou de NLRC4, não afetou substancialmente a habilidade da flagelina em promover resposta de anticorpos contra ovalbumina coadministrada (Figura 19). De acordo com isso foi demonstrado com o uso de animais duplo *knockouts* que somente a perda da expressão de

ambos os receptores, TLR5 e NLRC4, simultaneamente, é capaz de reduzir drasticamente a resposta de anticorpos contra flagelina e a habilidade da flagelina em induzir resposta humoral para a ovalbumina (Vijay-Kumar et al., 2010). Entretanto, não foi observada diferença significativa nos títulos de anticorpos IgG específicos para flagelina em animais deficientes para a citocina IL-18 (Sanders et al., 2009) e para o receptor IL-1R (Sanders et al., 2008). Além disso, a habilidade da flagelina em funcionar como adjuvante no animal MyD88 *knockout*, no qual a sinalização via TLR5, IL-1 β , IL-1 α e IL-18 está ausente, é reduzida, porém não abolida, sugerindo ainda algum mecanismo adicional ao TLR5 e à produção destas citocinas pelos inflamassomas que leve à produção de anticorpos induzida por flagelina.

Juntos, os dados contidos nesta tese deixam claro a diversidade dos mecanismos envolvidos na ativação do sistema imune induzida pela flagelina citosólica e o seu potencial como modelo para o desenvolvimento de estratégias vacinais. Tendo em vista que a identificação dos mecanismos moleculares envolvidos na ativação do sistema imune por adjuvantes microbianos é pertinente, pois permite o desenvolvimento de estratégias que aumentem a eficácia e diminuam os efeitos indesejados das vacinas, nós esperamos ter contribuído para o entendimento básico das vias que orquestram a condução da imunidade adaptativa a partir da resposta imune inata induzida pela flagelina.

Utilizando diferentes abordagens experimentais com a flagelina bacteriana purificada foi possível identificar novas bases moleculares que regulam a ativação dos inflamassomas em resposta a este agonista, bem como, as suas consequências para a resposta imune. Os dados contidos nesta tese demonstram o envolvimento de catepsinas lisossomais nos mecanismos efetores mediados pelo inflamassoma em resposta à flagelina, que incluem a indução de morte celular inflamatória com atividade microbicida e a produção das citocinas inflamatórias IL-1 β e IL-1 α . Estas citocinas, por sua vez, parecem estar envolvidas no direcionamento da resposta imune celular, *in vitro* (modulação para os perfis Th1 e Th17) e humoral (produção de anticorpos da subclasse IgG1), induzidas pela flagelina.

REFERÊNCIAS*

Acosta-Rodriguez EV, Napolitani G, Lanzavecchia A, Sallusto F. Interleukins 1 β and 6 but not transforming growth factor- β are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nature Immunology*. 2007;8(9):942-9.

Ada G. Vaccines and vaccination. *The New England Journal of Medicine*. 2001;345(14):1042-53.

Adar Y, Singer Y, Levi R, Tzehoval E, Perk S, Banet-Noach C, Nagar S, Arnon R, Ben-Yedidia T. A universal epitope-based influenza vaccine and its efficacy against H5N1. *Vaccine*. 2009;27(15):2099-107.

Afonina IS, Tynan GA, Logue SE, Cullen SP, Bots M, Luthi AU, Reeves EP, McElvaney NG, Medema JP, Lavelle EC, Martin SJ. Granzyme B-dependent proteolysis acts as a switch to enhance the proinflammatory activity of IL-1 α . *Molecular Cell*. 2011;44(2):265-78.

Akhter A, Caution K, Abu Khweek A, Tazi M, Abdulrahman BA, Abdelaziz DH, Voss OH, Doseff AI, Hassan H, Azad AK, Schlesinger LS, Wewers MD, Gavrilin MA, Amer AO. Caspase-11 promotes the fusion of phagosomes harboring pathogenic bacteria with lysosomes by modulating actin polymerization. *Immunity*. 2012;37(1):35-47.

Akhter A, Gavrilin MA, Frantz L, Washington S, Ditty C, Limoli D, Day C, Sarkar A, Newland C, Butchar J, Marsh CB, Wewers MD, Tridandapani S, Kanneganti TD, Amer AO. Caspase-7 activation by the Nlrp4/lpaf inflammasome restricts *Legionella pneumophila* infection. *PLoS Pathogen*. 2009;5(4):e1000361.

Alving CR, Koulchin V, Glenn GM, Rao M. Liposomes as carriers of peptide antigens: induction of antibodies and cytotoxic T lymphocytes to conjugated and unconjugated peptides. *Immunological Reviews*. 1995;145:5-31.

Amarante-Mendes GP, Finucane DM, Martin SJ, Cotter TG, Salvesen GS, Green DR. Anti-apoptotic oncogenes prevent caspase-dependent and independent commitment for cell death. *Cell Death and Differentiation*. 1998;5(4):298-306.

Amer A, Franchi L, Kanneganti TD, Body-Malapel M, Ozoren N, Brady G, Meshinchi S, Jagirdar R, Gewirtz A, Akira S, Nunez G. Regulation of *Legionella* phagosome maturation and infection through flagellin and host Ipaf. *The Journal of Biological Chemistry*. 2006;281(46):35217-23.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

Arimilli S, Johnson JB, Clark KM, Graff AH, Alexander-Miller MA, Mizel SB, Parks GD. Engineered expression of the TLR5 ligand flagellin enhances paramyxovirus activation of human dendritic cell function. *Journal of Virology*. 2008;82(22):10975-85.

Aujla SJ, Chan YR, Zheng M, Fei M, Askew DJ, Pociask DA, Reinhart TA, McAllister F, Edeal J, Gaus K, Husain S, Kreindler JL, Dubin PJ, Pilewski JM, Myerburg MM, Mason CA, Iwakura Y, Kolls JK. IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nature Medicine*. 2008;14(3):275-81.

Averette KM, Pratt MR, Yang Y, Bassilian S, Whitelegge JP, Loo JA, Muir TW, Bradley KA. Anthrax lethal toxin induced lysosomal membrane permeabilization and cytosolic cathepsin release is Nlrp1b/Nalp1b-dependent. *PloS One*. 2009;4(11):e7913.

Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998;392(6673):245-52.

Bargieri DY, Rosa DS, Braga CJ, Carvalho BO, Costa FT, Espindola NM, Vaz AJ, Soares IS, Ferreira LC, Rodrigues MM. New malaria vaccine candidates based on the *Plasmodium vivax* Merozoite Surface Protein-1 and the TLR-5 agonist *Salmonella Typhimurium* FliC flagellin. *Vaccine*. 2008;26(48):6132-42.

Bargieri DY, Leite JA, Lopes SC, Sbrogio-Almeida ME, Braga CJ, Ferreira LC, Soares IS, Costa FT, Rodrigues MM. Immunogenic properties of a recombinant fusion protein containing the C-terminal 19 kDa of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 and the innate immunity agonist FliC flagellin of *Salmonella typhimurium*. *Vaccine*. 2010;28(16):2818-26.

Bastos KR, Barboza R, Sardinha L, Russo M, Alvarez JM, Lima MR. Role of endogenous IFN-gamma in macrophage programming induced by IL-12 and IL-18. *Journal of Interferon & Cytokine Research : The Official Journal of The International Society for Interferon and Cytokine Research*. 2007;27(5):399-410.

Bates JT, Uematsu S, Akira S, Mizel SB. Direct stimulation of *tlr5*^{+/+} CD11c⁺ cells is necessary for the adjuvant activity of flagellin. *Journal of Immunology*. 2009;182(12):7539-47.

Behrens MD, Wagner WM, Krco CJ, Erskine CL, Kalli KR, Krempski J, Gad EA, Disis ML, Knutson KL. The endogenous danger signal, crystalline uric acid, signals for enhanced antibody immunity. *Blood*. 2008;111(3):1472-9.

Ben-Sasson SZ, Hu-Li J, Quiel J, Cauchetaux S, Ratner M, Shapira I, Dinarello CA, Paul WE. IL-1 acts directly on CD4 T cells to enhance their antigen-driven expansion and differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(17):7119-24.

Ben-Sasson SZ, Caucheteux S, Crank M, Hu-Li J, Paul WE. IL-1 acts on T cells to enhance the magnitude of in vivo immune responses. *Cytokine*. 2011;56(1):122-5.

Ben-Sasson SZ, Hogg A, Hu-Li J, Wingfield P, Chen X, Crank M, Caucheteux S, Ratner-Hurevich M, Berzofsky JA, Nir-Paz R, Paul WE. IL-1 enhances expansion, effector function, tissue localization, and memory response of antigen-specific CD8 T cells. *The Journal of Experimental Medicine*. 2013;210(3):491-502.

Ben-Sasson SZ, Wang K, Cohen J, Paul WE. IL-1 β strikingly enhances antigen-driven CD4 and CD8 T-cell responses. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 2013;78:117-24.

Ben-Yedidia T, Tarrab-Hazdai R, Schechtman D, Arnon R. Intranasal administration of synthetic recombinant peptide-based vaccine protects mice from infection by *Schistosoma mansoni*. *Infection and Immunity*. 1999;67(9):4360-6.

Berda-Haddad Y, Robert S, Salers P, Zekraoui L, Farnarier C, Dinarello CA, Dignat-George F, Kaplanski G. Sterile inflammation of endothelial cell-derived apoptotic bodies is mediated by interleukin-1 α . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(51):20684-9.

Bergmann-Leitner ES, Leitner WW. Adjuvants in the Driver's Seat: How Magnitude, Type, Fine Specificity and Longevity of Immune Responses Are Driven by Distinct Classes of Immune Potentiators. *Vaccine*. 2014;2(2):252-96.

Bergsbaken T, Cookson BT. Macrophage activation redirects yersinia-infected host cell death from apoptosis to caspase-1-dependent pyroptosis. *PLoS Pathogens*. 2007;3(11):e161.

Bergsbaken T, Fink SL, Cookson BT. Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nature Reviews Microbiology*. 2009;7(2):99-109.

Bergsbaken T, Fink SL, den Hartigh AB, Loomis WP, Cookson BT. Coordinated host responses during pyroptosis: caspase-1-dependent lysosome exocytosis and inflammatory cytokine maturation. *Journal of Immunology*. 2011;187(5):2748-54.

Blom L, Poulsen LK. IL-1 family members IL-18 and IL-33 upregulate the inflammatory potential of differentiated human Th1 and Th2 cultures. *Journal of Immunology*. 2012;189(9):4331-7.

Blott EJ, Griffiths GM. Secretory lysosomes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2002;3(2):122-31.

Bortoluci KR, Medzhitov R. Control of infection by pyroptosis and autophagy: role of TLR and NLR. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2010.

Boya P, Kroemer G. Lysosomal membrane permeabilization in cell death. *Oncogene*.

2008;27(50):6434-51.

Brennan MA, Cookson BT. Salmonella induces macrophage death by caspase-1-dependent necrosis. *Molecular Microbiology*. 2000;38(1):31-40.

Brewer JM, Alexander J. Cytokines and the mechanisms of action of vaccine adjuvants. *Cytokines, Cellular & Molecular Therapy*. 1997;3(4):233-46.

Brodsky IE, Palm NW, Sadanand S, Ryndak MB, Sutterwala FS, Flavell RA, Bliska JB, Medzhitov R. A Yersinia effector protein promotes virulence by preventing inflammasome recognition of the type III secretion system. *Cell Host & Microbe*. 2010;7(5):376-87.

Broz P, von Moltke J, Jones JW, Vance RE, Monack DM. Differential requirement for Caspase-1 autoproteolysis in pathogen-induced cell death and cytokine processing. *Cell Host & Microbe*. 2011;8(6):471-83.

Broz P, Monack DM. Noncanonical inflammasomes: caspase-11 activation and effector mechanisms. *PLoS Pathogens*. 2013;9(2):e1003144.

Brumatti G, Yon M, Castro FA, Bueno-da-Silva AE, Jacysyn JF, Brunner T, Amarante-Mendes GP. Conversion of CD95 (Fas) Type II into Type I signaling by sub-lethal doses of cycloheximide. *Experimental Cell Research*. 2008;314(3):554-63.

Buttle DJ, Murata M, Knight CG, Barrett AJ. CA074 methyl ester: a proinhibitor for intracellular cathepsin B. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1992;299(2):377-80.

Buzzo CL, Campopiano JC, Massis LM, Lage SL, Cassado AA, Leme-Souza R, Cunha LD, Russo M, Zamboni DS, Amarante-Mendes GP, Bortoluci KR. A novel pathway for inducible nitric-oxide synthase activation through inflammasomes. *The Journal of Biological Chemistry*. 2010;285(42):32087-95.

Carta S, Lavieri R, Rubartelli A. Different Members of the IL-1 Family Come Out in Different Ways: DAMPs vs. Cytokines? *Frontiers in Immunology*. 2013;4:123.

Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, Dubois B, Van Kooten C, Durand I, Banchereau J. Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *The Journal of Experimental Medicine*. 1994a;180(4):1263-72.

Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Azuma M, Okumura K, Lanier LL, Banchereau J. B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine*. 1994b;180(5):1841-7.

Cella M, Scheidegger D, Palmer-Lehmann K, Lane P, Lanzavecchia A, Alber G. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12

and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *The Journal of Experimental Medicine*. 1996;184(2):747-52.

Cella M, Engering A, Pinet V, Pieters J, Lanzavecchia A. Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature*. 1997a;388(6644):782-7.

Cella M, Sallusto F, Lanzavecchia A. Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Current Opinion in Immunology*. 1997b;9(1):10-6.

Chauhan N, Kumar R, Badhai J, Preet A, Yadava PK. Immunogenicity of cholera toxin B epitope inserted in *Salmonella* flagellin expressed on bacteria and administered as DNA vaccine. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2005;276(1-2):1-6.

Chen LM, Kaniga K, Galan JE. *Salmonella* spp. are cytotoxic for cultured macrophages. *Molecular Microbiology*. 1996a;21(5):1101-15.

Chen Y, Smith MR, Thirumalai K, Zychlinsky A. A bacterial invasin induces macrophage apoptosis by binding directly to ICE. *The EMBO Journal*. 1996b;15(15):3853-60.

Chung DR, Kasper DL, Panzo RJ, Chitnis T, Grusby MJ, Sayegh MH, Tzianabos AO. CD4⁺ T cells mediate abscess formation in intra-abdominal sepsis by an IL-17-dependent mechanism. *Journal of Immunology*. 2003;170(4):1958-63.

Chung Y, Chang SH, Martinez GJ, Yang XO, Nurieva R, Kang HS, Ma L, Watowich SS, Jetten AM, Tian Q, Dong C. Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling. *Immunity*. 2009;30(4):576-87.

Coffman RL, Sher A, Seder RA. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity*. 2010;33(4):492-503.

Cookson BT, Brennan MA. Pro-inflammatory programmed cell death. *Trends in Microbiology*. 2001;9(3):113-4.

Cullen SP, Kearney CJ, Clancy DM, Martin SJ. Diverse Activators of the NLRP3 Inflammasome Promote IL-1 β Secretion by Triggering Necrosis. *Cell Reports*. 2015;11(10):1535-48.

Cunningham AF, Khan M, Ball J, Toellner KM, Serre K, Mohr E, MacLennan IC. Responses to the soluble flagellar protein FliC are Th2, while those to FliC on *Salmonella* are Th1. *European Journal of Immunology*. 2004;34(11):2986-95.

De Becker G, Moulin V, Pajak B, Bruck C, Francotte M, Thiriart C, Urbain J, Moser M. The adjuvant monophosphoryl lipid A increases the function of antigen-presenting cells. *International Immunology*. 2000;12(6):807-15.

De Smedt T, Pajak B, Muraille E, Lespagnard L, Heinen E, De Baetselier P, Urbain J, Leo O, Moser M. Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide in vivo. *The Journal of Experimental Medicine*. 1996;184(4):1413-24.

Derre I, Isberg RR. Macrophages from mice with the restrictive Lgn1 allele exhibit multifactorial resistance to *Legionella pneumophila*. *Infection and Immunity*. 2004;72(11):6221-9.

Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis e Sousa C. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science*. 2004;303(5663):1529-31.

Dieu MC, Vanbervliet B, Vicari A, Bridon JM, Oldham E, Ait-Yahia S, Briere F, Zlotnik A, Lebecque S, Caux C. Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *The Journal of Experimental Medicine*. 1998;188(2):373-86.

Dinarello CA, Wolff SM. The role of interleukin-1 in disease. *The New England Journal of Medicine*. 1993;328(2):106-13.

Dinarello CA. Interleukin-1 beta, interleukin-18, and the interleukin-1 beta converting enzyme. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1998;856:1-11.

Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annual Review of Immunology*. 2009;27:519-50.

Dinarello CA. Anti-inflammatory Agents: Present and Future. *Cell*. 2010;140(6):935-50.

Dinarello CA. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood*. 2011;117(14):3720-32.

Dostert C, Guarda G, Romero JF, Menu P, Gross O, Tardivel A, Suva ML, Stehle JC, Kopf M, Stamenkovic I, Corradin G, Tschopp J. Malarial hemozoin is a Nalp3 inflammasome activating danger signal. *PloS One*. 2009;4(8):e6510.

Duncan JA, Gao X, Huang MT, O'Connor BP, Thomas CE, Willingham SB, Bergstralh DT, Jarvis GA, Sparling PF, Ting JP. *Neisseria gonorrhoeae* activates the proteinase cathepsin B to mediate the signaling activities of the NLRP3 and ASC-containing inflammasome. *Journal of Immunology*. 2009;182(10):6460-9.

Eigenbrod T, Park JH, Harder J, Iwakura Y, Nunez G. Cutting edge: critical role for mesothelial cells in necrosis-induced inflammation through the recognition of IL-1 alpha released from dying cells. *Journal of Immunology*. 2008;181(12):8194-8.

Eisenbarth SC, Colegio OR, O'Connor W, Sutterwala FS, Flavell RA. Crucial role for

the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature*. 2008;453(7198):1122-6.

Ewald SE, Lee BL, Lau L, Wickliffe KE, Shi GP, Chapman HA, Barton GM. The ectodomain of Toll-like receptor 9 is cleaved to generate a functional receptor. *Nature*. 2008;456(7222):658-62.

Fantuzzi G, Dinarello CA. Interleukin-18 and interleukin-1 beta: two cytokine substrates for ICE (caspase-1). *Journal of Clinical Immunology*. 1999;19(1):1-11.

Faustin B, Lartigue L, Bruey JM, Luciano F, Sergienko E, Bailly-Maitre B, Volkmann N, Hanein D, Rouiller I, Reed JC. Reconstituted NALP1 inflammasome reveals two-step mechanism of caspase-1 activation. *Molecular Cell*. 2007;25(5):713-24.

Fernandes-Alnemri T, Yu JW, Juliana C, Solorzano L, Kang S, Wu J, Datta P, McCormick M, Huang L, McDermott E, Eisenlohr L, Landel CP, Alnemri ES. The AIM2 inflammasome is critical for innate immunity to *Francisella tularensis*. *Nature Immunology*. 2010;11(5):385-93.

Fettelschoss A, Kistowska M, LeibundGut-Landmann S, Beer HD, Johansen P, Senti G, Contassot E, Bachmann MF, French LE, Oxenius A, Kundig TM. Inflammasome activation and IL-1beta target IL-1alpha for secretion as opposed to surface expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011;108(44):18055-60.

Fink SL, Cookson BT. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infection and Immunity*. 2005;73(4):1907-16.

Fink SL, Cookson BT. Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages. *Cell Microbiol*. 2006;8(11):1812-25.

Fletcher S, Steffy K, Averett D. Masked oral prodrugs of toll-like receptor 7 agonists: a new approach for the treatment of infectious disease. *Current Opinion in Investigational Drugs*. 2006;7(8):702-8.

Foghsgaard L, Wissing D, Mauch D, Lademann U, Bastholm L, Boes M, Elling F, Leist M, Jaattela M. Cathepsin B acts as a dominant execution protease in tumor cell apoptosis induced by tumor necrosis factor. *The Journal of Cell Biology*. 2001;153(5):999-1010.

Fortier A, de Chastellier C, Balor S, Gros P. Birc1e/Naip5 rapidly antagonizes modulation of phagosome maturation by *Legionella pneumophila*. *Cell Microbiology*. 2007;9(4):910-23.

Franchi L, Amer A, Body-Malapel M, Kanneganti TD, Ozoren N, Jagirdar R, Inohara N, Vandenabeele P, Bertin J, Coyle A, Grant EP, Nunez G. Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1beta in salmonella-infected

macrophages. *Nature Immunology*. 2006;7(6):576-82.

Franchi L, Stoolman J, Kanneganti TD, Verma A, Ramphal R, Nunez G. Critical role for Ipaf in *Pseudomonas aeruginosa*-induced caspase-1 activation. *European Journal of Immunology*. 2007;37(11):3030-9.

Franchi L, Núñez G. The Nlrp3 inflammasome is critical for aluminium hydroxide-mediated IL-1 β secretion but dispensable for adjuvant activity. *European Journal of Immunology*. 2008;38(8):2085-9.

Franchi L, Munoz-Planillo R, Nunez G. Sensing and reacting to microbes through the inflammasomes. *Nature Immunology*. 2012;13(4):325-32.

Gabay C, Lamacchia C, Palmer G. IL-1 pathways in inflammation and human diseases. *Nature Reviews Rheumatology*. 2010;6(4):232-41.

Gardella S, Andrei C, Ferrera D, Lotti LV, Torrisi MR, Bianchi ME, Rubartelli A. The nuclear protein HMGB1 is secreted by monocytes via a non-classical, vesicle-mediated secretory pathway. *EMBO Reports*. 2002;3(10):995-1001.

Gavin AL, Hoebe K, Duong B, Ota T, Martin C, Beutler B, Nemazee D. Adjuvant-enhanced antibody responses in the absence of toll-like receptor signaling. *Science*. 2006;314(5807):1936-8.

Geddes BJ, Wang L, Huang WJ, Lavellee M, Manji GA, Brown M, Jurman M, Cao J, Morgenstern J, Merriam S, Glucksmann MA, DiStefano PS, Bertin J. Human CARD12 is a novel CED4/Apaf-1 family member that induces apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2001;284(1):77-82.

Goncalves VM, Matteucci KC, Buzzo CL, Miollo BH, Ferrante D, Torrecilhas AC, Rodrigues MM, Alvarez JM, Bortoluci KR. NLRP3 controls *Trypanosoma cruzi* infection through a caspase-1-dependent IL-1R-independent NO production. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2013;7(10):e2469.

Gross O, Yazdi AS, Thomas CJ, Masin M, Heinz LX, Guarda G, Quadroni M, Drexler SK, Tschopp J. Inflammasome activators induce interleukin-1 α secretion via distinct pathways with differential requirement for the protease function of caspase-1. *Immunity*. 2012;36(3):388-400.

Guicciardi ME, Leist M, Gores GJ. Lysosomes in cell death. *Oncogene*. 2004;23(16):2881-90.

Hafez IM, Maurer N, Cullis PR. On the mechanism whereby cationic lipids promote intracellular delivery of polynucleic acids. *Gene Therapy*. 2001;8(15):1188-96.

Halff EF, Diebolder CA, Versteeg M, Schouten A, Brondijk TH, Huizinga EG. Formation and structure of a NAIP5-NLRC4 inflammasome induced by direct

interactions with conserved N- and C-terminal regions of flagellin. *The Journal of Biological Chemistry*. 2012;287(46):38460-72.

Hammerbeck DM, Burleson GR, Schuller CJ, Vasilakos JP, Tomai M, Egging E, Cochran FR, Woulfe S, Miller RL. Administration of a dual toll-like receptor 7 and toll-like receptor 8 agonist protects against influenza in rats. *Antiviral Research*. 2007;73(1):1-11.

Harder J, Franchi L, Munoz-Planillo R, Park JH, Reimer T, Nunez G. Activation of the Nlrp3 inflammasome by *Streptococcus pyogenes* requires streptolysin O and NF-kappa B activation but proceeds independently of TLR signaling and P2X7 receptor. *Journal Immunology*. 2009;183(9):5823-9.

Hart DN. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood*. 1997;90(9):3245-87.

Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM, Aderem A. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*. 2001;410(6832):1099-103.

Hellmich KA, Levinsohn JL, Fattah R, Newman ZL, Maier N, Sastalla I, Liu S, Leppla SH, Moayeri M. Anthrax lethal factor cleaves mouse nlrp1b in both toxin-sensitive and toxin-resistant macrophages. *PloS One*. 2012;7(11):e49741.

Hentze H, Lin XY, Choi MS, Porter AG. Critical role for cathepsin B in mediating caspase-1-dependent interleukin-18 maturation and caspase-1-independent necrosis triggered by the microbial toxin nigericin. *Cell Death and Differentiation*. 2003;10(9):956-68.

Hitomi J, Christofferson DE, Ng A, Yao J, Degterev A, Xavier RJ, Yuan J. Identification of a molecular signaling network that regulates a cellular necrotic cell death pathway. *Cell*. 2008;135(7):1311-23.

Honko AN, Sriranganathan N, Lees CJ, Mizel SB. Flagellin is an effective adjuvant for immunization against lethal respiratory challenge with *Yersinia pestis*. *Infection and Immunity*. 2006;74(2):1113-20.

Hook V, Funkelstein L, Wegrzyn J, Bark S, Kindy M, Hook G. Cysteine Cathepsins in the secretory vesicle produce active peptides: Cathepsin L generates peptide neurotransmitters and cathepsin B produces beta-amyloid of Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2012;1824(1):89-104.

Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, Samstad EO, Kono H, Rock KL, Fitzgerald KA, Latz E. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nature Immunology*. 2008;9(8):847-56.

Huang W, Na L, Fidel PL, Schwarzenberger P. Requirement of interleukin-17A for

systemic anti-*Candida albicans* host defense in mice. *The Journal of Infectious Diseases*. 2004;190(3):624-31.

Inaba K, Inaba M, Naito M, Steinman RM. Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including bacillus Calmette-Guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens in vivo. *The Journal of Experimental Medicine*. 1993;178(2):479-88.

Inaba K, Witmer-Pack M, Inaba M, Hathcock KS, Sakuta H, Azuma M, Yagita H, Okumura K, Linsley PS, Ikehara S, Muramatsu S, Hodes RJ, Steinman RM. The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice: abundant expression on dendritic cells in situ and during maturation in vitro. *The Journal of Experimental Medicine*. 1994;180(5):1849-60.

Kagedal K, Johansson U, Ollinger K. The lysosomal protease cathepsin D mediates apoptosis induced by oxidative stress. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2001a;15(9):1592-4.

Kagedal K, Zhao M, Svensson I, Brunk UT. Sphingosine-induced apoptosis is dependent on lysosomal proteases. *The Biochemical Journal*. 2001b;359(Pt 2):335-43.

Kanneganti TD, Body-Malapel M, Amer A, Park JH, Whitfield J, Franchi L, Taraporewala ZF, Miller D, Patton JT, Inohara N, Nunez G. Critical role for Cryopyrin/Nalp3 in activation of caspase-1 in response to viral infection and double-stranded RNA. *The Journal of Biological Chemistry*. 2006;281(48):36560-8.

Kayagaki N, Warming S, Lamkanfi M, Vande Walle L, Louie S, Dong J, Newton K, Qu Y, Liu J, Heldens S, Zhang J, Lee WP, Roose-Girma M, Dixit VM. Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. *Nature*. 2011;479(7371):117-21.

Keller M, Ruegg A, Werner S, Beer HD. Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion. *Cell*. 2008;132(5):818-31.

Kelly MN, Kolls JK, Happel K, Schwartzman JD, Schwarzenberger P, Combe C, Moretto M, Khan IA. Interleukin-17/interleukin-17 receptor-mediated signaling is important for generation of an optimal polymorphonuclear response against *Toxoplasma gondii* infection. *Infection and immunity*. 2005;73(1):617-21.

Kersten GF, Crommelin DJ. Liposomes and ISCOMs. *Vaccine*. 2003;21(9-10):915-20.

Khader SA, Bell GK, Pearl JE, Fountain JJ, Rangel-Moreno J, Cilley GE, Shen F, Eaton SM, Gaffen SL, Swain SL, Locksley RM, Haynes L, Randall TD, Cooper AM. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4⁺ T cell responses after vaccination and during *Mycobacterium tuberculosis* challenge. *Nature immunology*. 2007;8(4):369-77.

Kline JN, Krieg AM, Waldschmidt TJ, Ballas ZK, Jain V, Businga TR. CpG oligodeoxynucleotides do not require TH1 cytokines to prevent eosinophilic airway inflammation in a murine model of asthma. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 1999;104(6):1258-64.

Koch F, Stanzl U, Jennewein P, Janke K, Heufler C, Kampgen E, Romani N, Schuler G. High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10. *The Journal of Experimental Medicine*. 1996;184(2):741-6.

Kofoed EM, Vance RE. Innate immune recognition of bacterial ligands by NAIPs determines inflammasome specificity. *Nature*. 2011;477(7366):592-5.

Kool M, Pétrilli V, De Smedt T, Rolaz A, Hammad H, van Nimwegen M, Bergen IM, Castillo R, Lambrecht BN, Tschopp J. Cutting edge: alum adjuvant stimulates inflammatory dendritic cells through activation of the NALP3 inflammasome. *Journal of Immunology*. 2008; 15;181(6):3755-9.

Kool M, Soullié T, van Nimwegen M, Willart MA, Muskens F, Jung S, Hoogsteden HC, Hammad H, Lambrecht BN. Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine*. 2008;205(4):869-82.

Kopp E, Medzhitov R. Recognition of microbial infection by Toll-like receptors. *Current Opinion in Immunology*. 2003;15(4):396-401.

Korsholm KS, Andersen PL, Christensen D. Cationic liposomal vaccine adjuvants in animal challenge models: overview and current clinical status. *Expert Review of Vaccines*. 2012;11(5):561-77.

Kortmann J, Brubaker SW, Monack DM. Cutting Edge: Inflammasome Activation in Primary Human Macrophages Is Dependent on Flagellin. *Journal of Immunology*. 2015;195(3):815-9.

Kreuzaler PA, Staniszewska AD, Li W, Omidvar N, Kedjouar B, Turkson J, Poli V, Flavell RA, Clarkson, RW, Watson, CJ. Stat3 controls lysosomal-mediated cell death in vivo. *Nature cell biology*. 2011;13(3):303-9.

Kroemer G, Martin SJ. Caspase-independent cell death. *Nature Medicine*. 2005;11(7):725-30.

Kuida K, Lippke JA, Ku G, Harding MW, Livingston DJ, Su MS, Flavell RA. Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 beta converting enzyme. *Science*. 1995;267(5206):2000-3.

Lage SL, Amarante-Mendes GP, Bortoluci KR. Evaluation of pyroptosis in macrophages using cytosolic delivery of purified flagellin. *Methods*. 2013;61(2):110-

6.

Lage SL, Longo C, Branco LM, da Costa TB, Buzzo CL, Bortoluci KR. Emerging Concepts about NAIP/NLRC4 Inflammasomes. *Frontiers in Immunology*. 2014;5:309.

Lambrecht BN, Kool M, Willart MA, Hammad H. Mechanism of action of clinically approved adjuvants. *Current Opinion in Immunology*. 2009;21(1):23-9.

Lasiglie D, Traggiai E, Federici S, Alessio M, Buoncompagni A, Accogli A, Chiesa S, Penco F, Martini A, Gattorno M. Role of IL-1 beta in the development of human T(H)17 cells: lesson from NLPR3 mutated patients. *PloS One*. 2011;6(5):e20014.

Le Moigne V, Robreau G, Mahana W. Flagellin as a good carrier and potent adjuvant for Th1 response: study of mice immune response to the p27 (Rv2108) *Mycobacterium tuberculosis* antigen. *Molecular Immunology*. 2008;45(9):2499-507.

Lee SE, Kim SY, Jeong BC, Kim YR, Bae SJ, Ahn OS, Lee JJ, Song HC, Kim JM, Choy HE, Chung SS, Kweon MN, Rhee JH. A bacterial flagellin, *Vibrio vulnificus* FlaB, has a strong mucosal adjuvant activity to induce protective immunity. *Infection and Immunity*. 2006;74(1):694-702.

Levine MM, Levine OS. Influence of disease burden, public perception, and other factors on new vaccine development, implementation, and continued use. *Lancet*. 1997;350(9088):1386-92.

Li H, Nookala S, Re F. Aluminum hydroxide adjuvants activate caspase-1 and induce IL-1beta and IL-18 release. *Journal of Immunology*. 2007;178(8):5271-6.

Li H, Willingham SB, Ting JP, Re F. Cutting edge: inflammasome activation by alum and alum's adjuvant effect are mediated by NLRP3. *Journal of Immunology*. 2008;181(1):17-21.

Li P, Allen H, Banerjee S, Franklin S, Herzog L, Johnston C, McDowell J, Paskind M, Rodman L, Salfeld J, et al. Mice deficient in IL-1 beta-converting enzyme are defective in production of mature IL-1 beta and resistant to endotoxic shock. *Cell*. 1995;80(3):401-11.

Lightfield KL, Persson J, Brubaker SW, Witte CE, von Moltke J, Dunipace EA, Henry T, Sun YH, Cado D, Dietrich WF, Monack DM, Tsolis RM, Vance RE. Critical function for Naip5 in inflammasome activation by a conserved carboxy-terminal domain of flagellin. *Nature Immunology*. 2008;9(10):1171-8.

Lightfield KL, Persson J, Trinidad NJ, Brubaker SW, Kofoed EM, Sauer JD, Dunipace EA, Warren SE, Miao EA, Vance RE. Differential requirements for NAIP5 in activation of the NLRC4 inflammasome. *Infection and Immunity*. 2011;79(4):1606-14.

Liu-Bryan R1, Scott P, Sydlaske A, Rose DM, Terkeltaub R. Innate immunity

conferred by Toll-like receptors 2 and 4 and myeloid differentiation factor 88 expression is pivotal to monosodium urate monohydrate crystal-induced inflammation. *Arthritis & Rheumatology*. 2005;52(9):2936-46.

Lopez-Yglesias AH, Zhao X, Quarles EK, Lai MA, VandenBos T, Strong RK, Smith KD. Flagellin induces antibody responses through a TLR5- and inflammasome-independent pathway. *Journal of Immunology*. 2014;192(4):1587-96.

Lotze MT, Tracey KJ. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nature Review Immunology*. 2005;5(4):331-42. Review.

Lu B, Nakamura T, Inouye K, Li J, Tang Y, Lundback P, Valdes-Ferrer SI, Olofsson PS, Kalb T, Roth J, Zou Y, Erlandsson-Harris H, Yang H, Ting JP, Wang H, Andersson U, Antoine DJ, Chavan SS, Hotamisligil GS, Tracey KJ. Novel role of PKR in inflammasome activation and HMGB1 release. *Nature*. 2012;488(7413):670-4.

Lundberg U, Vinatzer U, Berdnik D, von Gabain A, Baccarini M. Growth phase-regulated induction of Salmonella-induced macrophage apoptosis correlates with transient expression of SPI-1 genes. *Journal of Bacteriology*. 1999;181(11):3433-7.

Mambula SS, Calderwood SK. Heat shock protein 70 is secreted from tumor cells by a nonclassical pathway involving lysosomal endosomes. *Journal of Immunology*. 2006;177(11):7849-57.

Man SM, Hopkins LJ, Nugent E, Cox S, Gluck IM, Tourlomousis P, Wright JA, Cicuta P, Monie TP, Bryant CE. Inflammasome activation causes dual recruitment of NLRC4 and NLRP3 to the same macromolecular complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;111(20):7403-8.

Manel N, Unutmaz D, Littman DR. The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgamma. *Nature Immunology*. 2008;9(6):641-9.

Maraskovsky E, Schnurr M, Wilson NS, Robson NC, Boyle J, Drane D. Development of prophylactic and therapeutic vaccines using the ISCOMATRIX adjuvant. *Immunology and Cell Biology*. 2009;87(5):371-6.

Mariathasan S, Newton K, Monack DM, Vucic D, French DM, Lee WP, Roose-Girma M, Erickson S, Dixit VM. Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature*. 2004;430(6996):213-8.

Marrack P, McKee AS, Munks MW. Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. *Nature Reviews Immunology*. 2009;9(4):287-93.

Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Molecular Cell*. 2002;10(2):417-26.

Martinon F, Glimcher LH. Gout: new insights into an old disease. *The Journal of Clinical Investigation*. 2006;116(8):2073-5.

Martinon F, Gaide O, Petrilli V, Mayor A, Tschopp J. NALP inflammasomes: a central role in innate immunity. *Seminars in Immunopathology*. 2007;29(3):213-29.

Martinon F, Tschopp J. Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation. *Cell Death and Differentiation*. 2007;14(1):10-22.

Martinon F, Mayor A, Tschopp J. The inflammasomes: guardians of the body. *Annual Review of Immunology*. 2009;27:229-65.

Mata-Espinosa DA, Hernandez-Pando R. [Gamma interferon: basics aspects, clinic significance and therapeutic uses]. *Revista de Investigacion Clinica; Organo Del Hospital de Enfermedades de la Nutricion*. 2008;60(5):421-31.

Matusiak M, Van Opdenbosch N, Vande Walle L, Sirard JC, Kanneganti TD, Lamkanfi M. Flagellin-induced NLRC4 phosphorylation primes the inflammasome for activation by NAIP5. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015;112(5):1541-6.

McCoy AJ, Koizumi Y, Higa N, Suzuki T. Differential regulation of caspase-1 activation via NLRP3/NLRC4 inflammasomes mediated by aerolysin and type III secretion system during *Aeromonas veronii* infection. *Journal of Immunology*. 2010;185(11):7077-84.

McGahon AJ, Martin SJ, Bissonnette RP, Mahboubi A, Shi Y, Mogil RJ, Nishioka WK, Green DR. The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro. *Methods in Cell Biology*. 1995;46:153-85.

Means TK, Hayashi F, Smith KD, Aderem A, Luster AD. The Toll-like receptor 5 stimulus bacterial flagellin induces maturation and chemokine production in human dendritic cells. *Journal of Immunology*. 2003;170(10):5165-75.

Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nature Reviews Immunology*. 2001;1(2):135-45.

Meixenberger K, Pache F, Eitel J, Schmeck B, Hippenstiel S, Slevogt H, N'Guessan P, Witznath M, Netea MG, Chakraborty T, Suttorp N, Opitz B. *Listeria monocytogenes*-infected human peripheral blood mononuclear cells produce IL-1 β , depending on listeriolysin O and NLRP3. *Journal of Immunology*. 2010;184(2):922-30.

Miao EA, Alpuche-Aranda CM, Dors M, Clark AE, Bader MW, Miller SI, Aderem A. Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1 β via Ipaf. *Nature Immunology*. 2006;7(6):569-75.

Miao EA, Ernst RK, Dors M, Mao DP, Aderem A. *Pseudomonas aeruginosa* activates caspase 1 through Ipaf. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(7):2562-7.

Miao EA, Leaf IA, Treuting PM, Mao DP, Dors M, Sarkar A, Warren SE, Wewers MD, Aderem A. Caspase-1-induced pyroptosis is an innate immune effector mechanism against intracellular bacteria. *Nature Immunology*. 2010;11(12):1136-42.

Milner JD, Brechley JM, Laurence A, Freeman AF, Hill BJ, Elias KM, Kanno Y, Spalding C, Elloumi HZ, Paulson ML, Davis J, Hsu A, Asher AI, O'Shea J, Holland SM, Paul WE, Douek DC. Impaired T(H)17 cell differentiation in subjects with autosomal dominant hyper-IgE syndrome. *Nature*. 2008;452(7188):773-6.

Moayeri M, Crown D, Newman ZL, Okugawa S, Eckhaus M, Cataisson C, Liu S, Sastalla I, Leppla SH. Inflammasome sensor Nlrp1b-dependent resistance to anthrax is mediated by caspase-1, IL-1 signaling and neutrophil recruitment. *PLoS Pathogens*. 2010;6(12):e1001222.

Molofsky AB, Byrne BG, Whitfield NN, Madigan CA, Fuse ET, Tateda K, Swanson MS. Cytosolic recognition of flagellin by mouse macrophages restricts *Legionella pneumophila* infection. *The Journal of Experimental Medicine*. 2006;203(4):1093-104.

Montaser M, Lalmanach G, Mach L. CA-074, but not its methyl ester CA-074Me, is a selective inhibitor of cathepsin B within living cells. *Biological Chemistry*. 2002;383(7-8):1305-8.

Monteleone M, Stow JL, Schroder K. Mechanisms of unconventional secretion of IL-1 family cytokines. *Cytokine*. 2015;74(2):213-8.

Mosley B, Urdal DL, Prickett KS, Larsen A, Cosman D, Conlon PJ, Gillis S, Dower SK. The interleukin-1 receptor binds the human interleukin-1 alpha precursor but not the interleukin-1 beta precursor. *The Journal of Biological Chemistry*. 1987;262(7):2941-4.

Munoz N, Van Maele L, Marques JM, Rial A, Sirard JC, Chabalgoity JA. Mucosal administration of flagellin protects mice from *Streptococcus pneumoniae* lung infection. *Infection and Immunity*. 2010;78(10):4226-33.

Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H, Okamura H. Interleukin-18 is a unique cytokine that stimulates both Th1 and Th2 responses depending on its cytokine milieu. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2001;12(1):53-72.

Nascimento FD, Hayashi MA, Kerkis A, Oliveira V, Oliveira EB, Radis-Baptista G, Nader HB, Yamane T, Tersariol IL, Kerkis I. Crotamine mediates gene delivery into cells through the binding to heparan sulfate proteoglycans. *The Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(29):21349-60.

Newman ZL, Leppla SH, Moayeri M. CA-074Me protection against anthrax lethal toxin. *Infection and Immunity*. 2009;77(10):4327-36.

Newman ZL, Crown D, Leppla SH, Moayeri M. Anthrax lethal toxin activates the inflammasome in sensitive rat macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2010;398(4):785-9.

Newton SM, Jacob CO, Stocker BA. Immune response to cholera toxin epitope inserted in *Salmonella* flagellin. *Science*. 1989;244(4900):70-2.

Ng J, Hirota SA, Gross O, Li Y, Ulke-Lemee A, Potentier MS, Schenck LP, Vilaysane A, Seamone ME, Feng H, Armstrong GD, Tschopp J, Macdonald JA, Muruve DA, Beck PL. *Clostridium difficile* toxin-induced inflammation and intestinal injury are mediated by the inflammasome. *Gastroenterology*. 2010;139(2):542-52, 52 e1-3.

Nicholson DW. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death and Differentiation*. 1999;6(11):1028-42.

Nystrom S, Antoine DJ, Lundback P, Lock JG, Nita AF, Hogstrand K, Grandien A, Erlandsson-Harris H, Andersson U, Applequist SE. TLR activation regulates damage-associated molecular pattern isoforms released during pyroptosis. *The EMBO Journal*. 2013;32(1):86-99.

Ohno T, Oboki K, Kajiwara N, Morii E, Aozasa K, Flavell RA, Okumura K, Saito H, Nakae S. Caspase-1, caspase-8, and calpain are dispensable for IL-33 release by macrophages. *Journal of Immunology*. 2009;183(12):7890-7.

Pasare C, Medzhitov R. Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2005a;560:11-8.

Pasare C, Medzhitov R. Control of B-cell responses by Toll-like receptors. *Nature*. 2005b;438(7066):364-8.

Pereira WO, Amarante-Mendes GP. Apoptosis: a program of cell death or cell disposal? *Scandinavian Journal of Immunology*. 2011.

Pierre P, Turley SJ, Gatti E, Hull M, Meltzer J, Mirza A, Inaba K, Steinman RM, Mellman I. Developmental regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells. *Nature*. 1997;388(6644):787-92.

Plotkin SA. [New vaccination strategies]. *Bulletin de l'Academie Nationale de Medecine*. 2008;192(3):511-8; discussion 8-9.

Porte R, Fougeron D, Munoz-Wolf N, Tabareau J, Georgel AF, Wallet F, Paget C, Trottein F, Chabalgoity JA, Carnoy C, Sirard JC. A toll-like receptor 5 agonist improves the efficacy of antibiotics in the treatment of primary and influenza-associated pneumococcal mouse infections¹. *Antimicrobial Agents and*

Chemotherapy. 2015.

Poyet JL, Srinivasula SM, Tnani M, Razmara M, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES. Identification of Ipaf, a human caspase-1-activating protein related to Apaf-1. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(30):28309-13.

Pure E, Inaba K, Crowley MT, Tardelli L, Witmer-Pack MD, Ruberti G, Fathman G, Steinman RM. Antigen processing by epidermal Langerhans cells correlates with the level of biosynthesis of major histocompatibility complex class II molecules and expression of invariant chain. *The Journal of Experimental Medicine*. 1990;172(5):1459-69.

Puren AJ, Fantuzzi G, Dinarello CA. Gene expression, synthesis, and secretion of interleukin 18 and interleukin 1beta are differentially regulated in human blood mononuclear cells and mouse spleen cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96(5):2256-61.

Qu Y, Misaghi S, Izrael-Tomasevic A, Newton K, Gilmour LL, Lamkanfi M, Louie S, Kayagaki N, Liu J, Komuves L, Cupp JE, Arnott D, Monack D, Dixit VM. Phosphorylation of NLRC4 is critical for inflammasome activation. *Nature*. 2012;490(7421):539-42.

Rathinam VA, Jiang Z, Waggoner SN, Sharma S, Cole LE, Waggoner L, Vanaja SK, Monks BG, Ganesan S, Latz E, Hornung V, Vogel SN, Szomolanyi-Tsuda E, Fitzgerald KA. The AIM2 inflammasome is essential for host defense against cytosolic bacteria and DNA viruses. *Nature Immunology*. 2010;11(5):395-402.

Raupach B, Peuschel SK, Monack DM, Zychlinsky A. Caspase-1-mediated activation of interleukin-1beta (IL-1beta) and IL-18 contributes to innate immune defenses against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. *Infection and Immunity*. 2006;74(8):4922-6.

Reis e Sousa C, Austyn JM. Phagocytosis of antigens by Langerhans cells. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 1993;329:199-204.

Ren T, Zamboni DS, Roy CR, Dietrich WF, Vance RE. Flagellin-deficient *Legionella* mutants evade caspase-1- and Naip5-mediated macrophage immunity. *PLoS Pathogens*. 2006;2(3):e18.

Repnik U, Turk B. Lysosomal-mitochondrial cross-talk during cell death. *Mitochondrion*. 2010;10(6):662-9.

Reubold TF, Hahne G, Wohlgemuth S, Eschenburg S. Crystal structure of the leucine-rich repeat domain of the NOD-like receptor NLRP1: implications for binding of muramyl dipeptide. *FEBS Letters*. 2014;588(18):3327-32.

Romani N, Koide S, Crowley M, Witmer-Pack M, Livingstone AM, Fathman CG,

Inaba K, Steinman RM. Presentation of exogenous protein antigens by dendritic cells to T cell clones. Intact protein is presented best by immature, epidermal Langerhans cells. *The Journal of Experimental Medicine*. 1989;169(3):1169-78.

Rovere-Querini P, Capobianco A, Scaffidi P, Valentinis B, Catalanotti F, Giazson M, Dumitriu IE, Müller S, Iannacone M, Traversari C, Bianchi ME, Manfredi AA. HMGB1 is an endogenous immune adjuvant released by necrotic cells. *EMBO Reports*. 2004;5(8):825-30.

Rudensky A, Beers C. Lysosomal cysteine proteases and antigen presentation. Ernst Schering Research Foundation Workshop. 2006;(56):81-95.

Sallusto F, Schaerli P, Loetscher P, Scharniel C, Lenig D, Mackay CR, Qin S, Lanzavecchia A. Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *European Journal of Immunology*. 1998;28(9):2760-9.

Sanders CJ, Yu Y, Moore DA, Williams IR, Gewirtz AT. Humoral immune response to flagellin requires T cells and activation of innate immunity. *Journal of Immunology*. 2006;177(5):2810-8.

Sanders CJ, Moore DA, Williams IR, Gewirtz AT. Both radioresistant and hemopoietic cells promote innate and adaptive immune responses to flagellin. *Journal of Immunology*. 2008;180(11):7184-92.

Sanders CJ, Franchi L, Yarovinsky F, Uematsu S, Akira S, Nunez G, Gewirtz AT. Induction of adaptive immunity by flagellin does not require robust activation of innate immunity. *European Journal of Immunology*. 2009;39(2):359-71.

Sansonetti PJ, Phalipon A, Arondel J, Thirumalai K, Banerjee S, Akira S, Takeda K, Zychlinsky A. Caspase-1 activation of IL-1 β and IL-18 are essential for *Shigella flexneri*-induced inflammation. *Immunity*. 2000;12(5):581-90.

Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature*. 2002;418(6894):191-5.

Schotte P, Van Crielinge W, Van de Craen M, Van Loo G, Desmedt M, Grooten J, Cornelissen M, De Ridder L, Vandekerckhove J, Fiers W, Vandenabeele P, Beyaert R. Cathepsin B-mediated activation of the proinflammatory caspase-11. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1998;251(1):379-87.

Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell*. 2010;140(6):821-32.

Schwendener RA. Liposomes as vaccine delivery systems: a review of the recent advances. *Therapeutic Advances in Vaccines*. 2014;2(6):159-82.

Shah JA, Darrah PA, Ambrozak DR, Turon TN, Mendez S, Kirman J, Wu CY,

Glaichenhaus N, Seder RA. Dendritic cells are responsible for the capacity of CpG oligodeoxynucleotides to act as an adjuvant for protective vaccine immunity against *Leishmania major* in mice. *The Journal of Experimental Medicine*. 2003;198(2):281-91.

Shenderov K, Riteau N, Yip R, Mayer-Barber KD, Oland S, Hieny S, Fitzgerald P, Oberst A, Dillon CP, Green DR, Cerundolo V, Sher A. Cutting edge: Endoplasmic reticulum stress licenses macrophages to produce mature IL-1 β in response to TLR4 stimulation through a caspase-8- and TRIF-dependent pathway. *Journal of Immunology*. 2014;192(5):2029-33.

Shi Y, Evans JE, Rock KL. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature*. 2003;425(6957):516-21.

Siegmund B, Fantuzzi G, Rieder F, Gamboni-Robertson F, Lehr HA, Hartmann G, Dinarello CA, Endres S, Eigler A. Neutralization of interleukin-18 reduces severity in murine colitis and intestinal IFN- γ and TNF- α production. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2001;281(4):R1264-73.

Silveira TN, Zamboni DS. Pore formation triggered by *Legionella* spp. is an Nlrp4 inflammasome-dependent host cell response that precedes pyroptosis. *Infection and Immunity*. 2010;78(3):1403-13.

Simberg D, Weisman S, Talmon Y, Barenholz Y. DOTAP (and other cationic lipids): chemistry, biophysics, and transfection. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*. 2004;21(4):257-317.

Sims JE, Smith DE. The IL-1 family: regulators of immunity. *Nature Reviews Immunology*. 2010;10(2):89-102.

Smith KD, Andersen-Nissen E, Hayashi F, Strobe K, Bergman MA, Barrett SL, Cookson BT, Aderem A. Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. *Nature Immunology*. 2003;4(12):1247-53.

Song L, Nakaar V, Kavita U, Price A, Huleatt J, Tang J, Jacobs A, Liu G, Huang Y, Desai P, Maksymiuk G, Takahashi V, Umlauf S, Reiserova L, Bell R, Li H, Zhang Y, McDonald WF, Powell TJ, Tussey L. Efficacious recombinant influenza vaccines produced by high yield bacterial expression: a solution to global pandemic and seasonal needs. *PloS One*. 2008;3(5):e2257.

Sornasse T, Flamand V, De Becker G, Bazin H, Tielemans F, Thielemans K, Urbain J Leo O, Moser M. Antigen-pulsed dendritic cells can efficiently induce an antibody response in vivo. *The Journal of Experimental Medicine*. 1992;175(1):15-21.

Spreafico R, Ricciardi-Castagnoli P, Mortellaro A. The controversial relationship

between NLRP3, alum, danger signals and the next-generation adjuvants. *European Journal of Immunology*. 2010;40(3):638-42.

Sutterwala FS, Mijares LA, Li L, Ogura Y, Kazmierczak BI, Flavell RA. Immune recognition of *Pseudomonas aeruginosa* mediated by the IPAF/NLRC4 inflammasome. *The Journal of Experimental Medicine*. 2007;204(13):3235-45.

Suzuki T, Franchi L, Toma C, Ashida H, Ogawa M, Yoshikawa Y, Mimuro H, Inohara N, Sasakawa C, Nunez G. Differential regulation of caspase-1 activation, pyroptosis, and autophagy via Ipaf and ASC in *Shigella*-infected macrophages. *PLoS Pathogens*. 2007;3(8):e111.

Tang HL, Cyster JG. Chemokine Up-regulation and activated T cell attraction by maturing dendritic cells. *Science*. 1999;284(5415):819-22.

Turner B, Roder C, Dieckmann D, Heuer M, Kruse M, Glaser A, Keikavoussi P, Kampgen E, Bender A, Schuler G. Generation of large numbers of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical application. *Journal of Immunological Methods*. 1999;223(1):1-15.

Ting JP, Lovering RC, Alnemri ES, Bertin J, Boss JM, Davis BK, Flavell RA, Girardin SE, Godzik A, Harton JA, Hoffman HM, Hugot JP, Inohara N, Mackenzie A, Maltais LJ, Nunez G, Ogura Y, Otten LA, Philpott D, Reed JC, Reith W, Schreiber S, Steimle V, Ward PA. The NLR gene family: a standard nomenclature. *Immunity*. 2008a;28(3):285-7.

Ting JP, Willingham SB, Bergstralh DT. NLRs at the intersection of cell death and immunity. *Nature Reviews Immunology*. 2008b;8(5):372-9.

Trinchieri G, Wysocka M, D'Andrea A, Rengaraju M, Aste-Amezaga M, Kubin M, Valiante NM, Chehimi J. Natural killer cell stimulatory factor (NKSF) or interleukin-12 is a key regulator of immune response and inflammation. *Progress in Growth Factor Research*. 1992;4(4):355-68.

Tschopp J, Schroder K. NLRP3 inflammasome activation: The convergence of multiple signalling pathways on ROS production? *Nature Review Immunology*. 2010;10(3):210-5.

Turk B, Dolenc I, Turk V, Bieth JG. Kinetics of the pH-induced inactivation of human cathepsin L. *Biochemistry*. 1993;32(1):375-80.

Turk V, Stoka V, Vasiljeva O, Renko M, Sun T, Turk B, Turk D. Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2012;1824(1):68-88.

Van der Meer JW, Van de Gevel JS, Van Hinsbergh VW, Leijh PC. The influence of culture conditions and serum lipids on interleukin-1 production by human monocytes.

Journal of Immunological Methods. 1988;108(1-2):19-26.

Vijay-Kumar M, Carvalho FA, Aitken JD, Fifadara NH, Gewirtz AT. TLR5 or NLRC4 is necessary and sufficient for promotion of humoral immunity by flagellin. *European Journal of Immunology*. 2010;40(12):3528-34.

Volpe E, Servant N, Zollinger R, Bogiatzi SI, Hupe P, Barillot E, Soumelis V. A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses. *Nature immunology*. 2008;9(6):650-7.

von Moltke J, Trinidad NJ, Moayeri M, Kintzer AF, Wang SB, van Rooijen N, Brown CR, Krantz BA, Leppla SH, Gronert K, Vance RE. Rapid induction of inflammatory lipid mediators by the inflammasome in vivo. *Nature*. 2012;490(7418):107-11.

von Moltke J, Ayres JS, Kofoed EM, Chavarria-Smith J, Vance RE. Recognition of bacteria by inflammasomes. *Annual Review of Immunology*. 2013;31:73-106.

Walker C, Selby M, Erickson A, Cataldo D, Valensi JP, Van Nest GV. Cationic lipids direct a viral glycoprotein into the class I major histocompatibility complex antigen-presentation pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992;89(17):7915-8.

Watarai M, Derre I, Kirby J, Growney JD, Dietrich WF, Isberg RR. *Legionella pneumophila* is internalized by a macropinocytotic uptake pathway controlled by the Dot/Icm system and the mouse Lgn1 locus. *The Journal of Experimental Medicine*. 2001;194(8):1081-96.

Wattiaux R, Jadot M, Warnier-Pirotte MT, Wattiaux-De Coninck S. Cationic lipids destabilize lysosomal membrane in vitro. *FEBS Letters*. 1997;417(2):199-202.

Yamashima T. Implication of cysteine proteases calpain, cathepsin and caspase in ischemic neuronal death of primates. *Progress in Neurobiology*. 2000;62(3):273-95.

Yanagihara S, Komura E, Nagafune J, Watarai H, Yamaguchi Y. EBI1/CCR7 is a new member of dendritic cell chemokine receptor that is up-regulated upon maturation. *Journal of Immunology*. 1998;161(6):3096-102.

Yarovinsky F, Zhang D, Andersen JF, Bannenberg GL, Serhan CN, Hayden MS, Hieny S, Sutterwala FS, Flavell RA, Ghosh S, Sher A. TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science*. 2005;308(5728):1626-9.

Yu FS, Cornicelli MD, Kovach MA, Newstead MW, Zeng X, Kumar A, Gao N, Yoon SG, Gallo RL, Standiford TJ. Flagellin stimulates protective lung mucosal immunity: role of cathelicidin-related antimicrobial peptide. *Journal of Immunology*. 2010;185(2):1142-9.

Zamboni DS, Kobayashi KS, Kohlsdorf T, Ogura Y, Long EM, Vance RE, Kuida K, Mariathasan S, Dixit VM, Flavell RA, Dietrich WF, Roy CR. The Birc1e cytosolic pattern-recognition receptor contributes to the detection and control of *Legionella pneumophila* infection. *Nature Immunology*. 2006;7(3):318-25.

Zhao Y, Yang J, Shi J, Gong YN, Lu Q, Xu H, Liu L, Shao F. The NLRC4 inflammasome receptors for bacterial flagellin and type III secretion apparatus. *Nature*. 2011;477(7366):596-600.

Emerging concepts about NAIP/NLRC4 inflammasomes

Silvia Lucena Lage¹, Carla Longo^{1,2}, Laura Migliari Branco¹, Thaís Boccia da Costa¹, Carina de Lima Buzzo¹ and Karina Ramalho Bortoluci^{1,2}*

¹ Centro de Terapia Celular e Molecular (CTC-Mol), Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil

² Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil

Edited by:

Anton G. Kutikhin, Russian Academy of Medical Sciences, Russia

Reviewed by:

Dario S. Zamboni, Universidade de São Paulo, Brazil

Amedeo Amedei, University of Florence, Italy

Anton G. Kutikhin, Russian Academy of Medical Sciences, Russia
Arseniy E. Yuzhalin, University of Oxford, UK

*Correspondence:

Karina Ramalho Bortoluci,
Departamento de Ciências Biológicas
e Centro de Terapia Celular e
Molecular (CTC-Mol), Universidade
Federal de São Paulo, R. Mirassol,
207 Vila Clementino, São Paulo, São
Paulo 04044-010, Brasil
e-mail: kbortoluci@gmail.com

Neuronal apoptosis inhibitory protein (NAIP)/NOD-like receptor (NLR) containing a caspase activating and recruitment domain (CARD) 4 (NLRC4) inflammasome complexes are activated in response to proteins from virulent bacteria that reach the cell cytosol. Specific NAIP proteins bind to the agonists and then physically associate with NLRC4 to form an inflammasome complex able to recruit and activate pro-caspase-1. NAIP5 and NAIP6 sense flagellin, component of flagella from motile bacteria, whereas NAIP1 and NAIP2 detect needle and rod components from bacterial type III secretion systems, respectively. Active caspase-1 mediates the maturation and secretion of the pro-inflammatory cytokines, IL-1 β and IL-18, and is responsible for the induction of pyroptosis, a pro-inflammatory form of cell death. In addition to these well-known effector mechanisms, novel roles have been described for NAIP/NLRC4 inflammasomes, such as phagosomal maturation, activation of inducible nitric oxide synthase, regulation of autophagy, secretion of inflammatory mediators, antibody production, activation of T cells, among others. These effector mechanisms mediated by NAIP/NLRC4 inflammasomes have been extensively studied in the context of resistance of infections and the potential of their agonists has been exploited in therapeutic strategies to non-infectious pathologies, such as tumor protection. Thus, this review will discuss current knowledge about the activation of NAIP/NLRC4 inflammasomes and their effector mechanisms.

Keywords: NAIP, NLRC4, flagellin, caspase-1, inflammasomes, lysosomes, cell death

INTRODUCTION

Inflammasomes are multiprotein platforms containing specialized cytosolic sensors for a wide range of pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) or damage-associated molecular patterns (DAMPs) that are able to activate the inflammatory caspase-1 and caspase-11 (caspase-4 in humans) in a manner dependent or independent of adaptor molecules (1–4). Inflammasomes are composed of a cytosolic receptor from the nucleotide-binding domain-leucine-rich repeat (NBD-LRR) [also named NOD-like receptors (NLR)] or the pyrin and HIN domain-containing protein (PYHIN) families; the adaptor molecule ASC [apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase activating and recruitment domain (CARD)]; and pro-caspase-1 or pro-caspase-11. AIM2 is the only member of the PYHIN family described to form inflammasomes. AIM2 is composed of two domains: a C-terminal HIN200 domain and an N-terminal pyrin (PYD) domain. The members of the NLR family contain three domains: a central NBD that is responsible for protein oligomerization and common to all members; a C-terminal region composed of LRR sequences that are supposed to sense PAMPs or DAMPs; and an N-terminal portion that is responsible for the specificity of their molecular interactions and, therefore, their effector functions. The NLR proteins can be classified into NLRBs [NLR containing the baculovirus inhibitory (BIR) domain], NLRs (NLRs containing the CARD domain), and NLRPs (NLRs containing the PYD domain) (5).

NOD-like receptor proteins are maintained in an autoinhibited state under physiological conditions. After agonist recognition, they undergo a conformational rearrangement, triggering the NBD domains. Then, these proteins expose the effector domain to allow the assembly of oligomeric complexes. The NLRs that lack the CARD domain to recruit and activate pro-caspases-1 and 11 require the assistance of the adapter molecule ASC, which contains the PYD and CARD domains for binding caspases (6, 7). The NLRC members can directly recruit pro-caspase-1 through homotypic interactions between CARD domains, or they can recruit the adaptor ASC to activate caspase-1 (2). The canonical effector mechanisms mediated by caspase-1 are the maturation and secretion of IL-1 β and IL-18 and the induction of pyroptosis, a pro-inflammatory form of cell death. Furthermore, caspase-11 seems to be able to induce pyroptosis (8).

After a decade of inflammasome discovery (9), little is known about the molecular complex formed by most members of the NLR family. AIM2, NLRP3, and NLRC4 are the best-characterized inflammasome complexes. The importance of these complexes to control bacterial, viral, fungal, and protozoan infections and their influence in inflammatory processes are gaining prominence in the literature, although their precise activation mechanisms remain to be elucidated. Here, we focus on NLRC4 inflammasomes, the recent advances in the understanding of their assembly and the consequences of their activation to the immune response.

ASSEMBLY AND ACTIVATION OF NAIP/NLRC4 INFLAMMASOMES

The first reports about the recognition of cytosolic flagellin, the monomeric subunit from flagella present in motile bacteria, demonstrated that the neuronal apoptosis inhibitory protein (NAIP)-5 was responsible for the detection of cytosolic flagellin from *L. pneumophila* and for the restriction of infection (10, 11). In the same year, studies with *S. typhimurium* revealed that another member of the NLR family, NLRC4, was also able to detect cytosolic flagellin (12, 13). NLRC4 was first described in 2001 as a mammalian protein homologous to CED4 of *C. elegans*, whose function is to recruit and activate caspases through its CARD domain (14, 15). Because of the ability to activate caspase-1, previously known as interleukin-1-converting enzyme (ICE), NLRC4 was first named IPAF (ICE-protease-activating factor). Although the involvement of NLRC4 in the control of infections was previously reported, their agonists remained a mystery until 2006.

Flagellin is one of the best-characterized agonists of the innate immune system. Extracellular flagellin is recognized by TLR5 (16) but it can be delivered to the cell cytosol through the secretion systems present in virulent bacteria strains, such as the *S. typhimurium* type III secretion system (T3SS SPI-1) and *L. pneumophila* type IV (T4SS). In the cell cytosol, flagellin induces the formation of the NAIP5/NLRC4 inflammasome, leading to the subsequent activation of caspase-1 (17, 18, 23). Notably, the activation NAIP5/NLRC4 inflammasomes by cytosolic flagellin occurs independently of TLR5 (20), and these two receptors recognize distinct regions of flagellin (16). TLR5 senses a region present in the D1 domain of the protein, whereas the amino acid sequences recognized by NAIP5/NLRC4 inflammasomes are in the D0 domain of the molecule (18, 23, 19, 21, 22).

Previous studies have pointed to the involvement of NAIP5 in controlling *L. pneumophila* flagellated bacteria (24, 25) and to the involvement of NLRC4 in caspase-1 activation and the induction of macrophage death (14, 15), although the role of flagellin in these processes was unidentified at that time. The simultaneous demonstration of cytosolic flagellin recognition by NAIP5 and NLRC4 prompted a model that proposed the existence of two distinct inflammasomes that recognize slight differences in the structure of flagellin (10–13). In 2008, with the advent of NAIP5-deficient mice, Lightfield and collaborators confirmed that NAIP5 is required for NLRC4-containing inflammasome activation in response to *L. pneumophila* infection in a flagellin-dependent manner; however, the NLRC4-mediated macrophage responses against *S. typhimurium* were only partially dependent on NAIP5 (21). A subsequent work from the same group demonstrated that the differential requirement for NAIP5 in response to *S. typhimurium* and *L. pneumophila* infection is not due to intrinsic differences between distinct flagellins, as a genetically engineered *L. pneumophila* developed to express the *S. typhimurium* flagellin also activated the NLRC4 inflammasome in a manner strictly dependent on NAIP5 (17). These data indicated that another agonist from *S. typhimurium* could activate NLRC4 independent of the presence of NAIP5. In fact, these studies confirm that NLRC4 responds to the *S. typhimurium* PrgJ protein independently of NAIP5, thus explaining why NLRC4-mediated

responses to *S. typhimurium* are only partially dependent on NAIP5.

The inflammasome structure formed by these proteins was unveiled only recently when two independent groups proposed a model for NAIP5/NLRC4 inflammasome assembly (18, 23). Using the transfection of inflammasome components and microbial molecules in HEK 293T cells or followed by biochemical assays, the authors demonstrated the ability of flagellin from different bacterial species to bind NAIP5. This interaction was dependent on the three leucine residues of the C-terminal portion of flagellin, confirming prior data (17). Furthermore, after the recognition of flagellin, a physical association between NAIP5 and NLRC4 was demonstrated, resulting in the formation of an oligomeric complex. Reconstitution experiments using truncated receptor variants showed that NAIPs are upstream of NLRC4 and suggest that they interact via the NBD domain. Notably, NAIP6 worked similarly to NAIP5, as it induced the oligomerization of NLRC4 in response to flagellin, and this could explain the response of NAIP5^{-/-} cells to high concentrations of flagellin. NAIP1 and NAIP2 also recruit NLRC4 in response to the bacterial needle and inner rod proteins of T3SS, respectively (18, 23). Therefore, NAIP proteins seem to be the universal sensors of cytosolic flagellin and secretory complex proteins, whereas NLRC4 acts as an adapter molecule and is responsible for the recruitment and activation of caspase-1. It is noteworthy that there is only one functional NAIP found in humans, which is not activated by flagellin but is able to detect needle proteins of T3SS, similar to NAIP1 (18).

Despite these recent contributions to the understanding of NAIP/NLRC4 assembly, the molecular requirements of bacterial proteins for the formation of the inflammasome complex still requires further clarification. Lightfield et al. (21) originally demonstrated that the final 35 amino acids of the C-terminal portion of the flagellin molecule are essential for the activation of NAIP5. Moreover, the replacement of three leucine residues by alanine in this region abrogated the potential of flagellin to activate NAIP5. However, these studies were based on constructs containing only the C-terminal portion of the flagellin structure. A recent study using whole flagellin with or without these regions have shown that although the three leucine residues were essential for the detection of the C-terminus, their involvement seems to be less important for full-length flagellin recognition, as whole flagellin containing three alanines instead of three leucines still induces cell death and inflammasome complex formation, although fewer complexes are formed (22). Surprisingly, although the absence of the N-terminal domain does not affect the ability of whole flagellin to interact with NAIP5, constructs containing only N-terminus also retain the ability to activate NAIP5/NLRC4. Thus, the molecular interaction between flagellin and NAIP5/6 still requires clarification. Moreover, although flagellin was found inside the NAIP5/NLRC4 complex, as demonstrated by immunoprecipitation (19, 26) and yeast two-hybrid (18) assays, providing a basis for the model of direct interaction between flagellin and NAIP5, our group recently demonstrated the ability of cytosolic flagellin to activate a lysosomal pathway and the requirement of cathepsin B for NLRC4-dependent IL-1 β secretion and pyroptosis (27). These observations raise the possibility that NAIP5/NLRC4 can also be activated by cytosolic alterations induced by the

presence of flagellin, as proposed for the activation of the NLRP3 inflammasome (28).

Challenging prior models that hypothesized that LRR domains are responsible for the detection of NLR agonists, a recent study found that these domains are dispensable for the ligand specificity of NAIPs (26). By using a series of chimeric proteins in which the N-terminal domains of NAIP5 or NAIP6 were fused to the C-terminal domains of NAIP2 or vice-versa, the authors demonstrated that NAIP proteins lost the ability to oligomerize with NLRC4 only when NOD domain-associated α -helical domains were absent, suggesting that ligand specificity maps to this region. Interestingly, a similar region in NLRC4 was recently associated with its autoinhibition (29), whereas LRR domain from NAIPs was shown to be required for the maintenance of this protein in an autoinhibited conformation (19). Despite, these unsolved pieces of the puzzle, it has been demonstrated that the interaction of NAIPs with their ligands and the association of NLRC4 with NAIPs induce conformational changes in these molecules that enable their oligomerization and activation (22, 30). Predicted models for the NAIP/NLRC4 inflammasome suggest that these complexes contain an excess of NLRC4 for each NAIP protein (22, 26) and that NLRC4 molecules are able to recruit and activate caspase-1 either directly or through an ASC adapter. The association of pro-caspase-1 with an inflammasomes-containing ASC allows its autoproteolytic cleavage to become an enzymatically active heterodimer capable of processing pro-IL-1 β and pro-IL-18 into mature cytokines (2). In contrast, an ASC-independent complex activates caspase-1 without autoproteolysis, which is sufficient for caspase-1 to target a distinct subset of substrates critical for the induction of pyroptosis.

CANONICAL EFFECTOR MECHANISMS INDUCED BY NAIP/NLRC4 INFLAMMASOMES

PYROPTOSIS

The NAIP5/NLRC4 inflammasome is perhaps the best-studied inflammasome complex with regard to resistance to infections. Their involvement has been reported against infections such as *S. typhimurium* (31, 32), *L. pneumophila* (25), *P. aeruginosa* (33, 34), *Y. pestis* (35), *S. flexneri* (36), and *A. veronii* (37). NAIP/NLRC4-mediated responses are related to the restriction of bacterial growth due to the active caspase-1-mediated canonical and non-canonical effector mechanisms, highlighting the importance of this inflammasome as a host defense mechanism against a large number of bacterial infections. The best elucidated effector mechanisms involved in the control of infections mediated by caspase-1 are the secretion of inflammatory cytokines IL-1 β and IL-18 and the induction of pyroptosis (38).

The term pyroptosis (from the Greek “pyro” meaning fire or fever, and “ptosis” to a fault) was coined in 2001 to describe a pro-inflammatory programmed cell death during *S. typhimurium* infection (39). Morphological and biochemical changes displayed by *S. typhimurium*-infected dying cells were more closely related to those found in classic necrosis compared with those observed during apoptosis, including the following: (1) diffuse DNA fragmentation with no chromatin condensation; (2) early loss of membrane integrity observed by the simultaneous uptake of annexin V with an impermeable membrane dye; (3) lactate

dehydrogenase (LDH) release, suggesting a loss of intracellular content; and (4) independence of any apoptotic caspase. Although cells dying by pyroptosis displayed features of necrosis with an inflammatory outcome, the authors found that this process was highly regulated by active caspase-1, as the addition of inhibitors of caspase-1 (z-YVAD-fmk) abolished *S. typhimurium*-induced cell death.

The induction of pyroptosis by pathogenic bacteria depends on an active secretion system that translocates bacterial proteins into the cell cytosol, such as the T3SS (SPI-1) of *S. typhimurium* and type IV (T4SS) of *L. pneumophila* (12, 13, 40–42). Mutant *L. pneumophila* (43) or *P. aeruginosa* (34, 44) lacking flagellin fail to activate caspase-1 and, therefore, are not able to induce pyroptosis and IL-1 β secretion in infected macrophages. Accordingly, the transfection of purified flagellin from *L. pneumophila* and *S. typhimurium* directly into the cell cytosol is sufficient to trigger caspase-1-dependent pore formation, pyroptosis, and IL-1 β secretion (45, 46). Importantly, infection with the non-flagellated bacteria *S. flexneri* also induces NLRC4-mediated pyroptosis, most likely in response to the inner rod component of T3SS (36).

Although the molecular mechanisms that regulate pyroptosis remain to be elucidated, the model of *S. typhimurium* infection has given us important knowledge about this form of cell death. The cell lysis observed during pyroptosis seems to result from a highly regulated process of pore formation in the plasma membrane (45, 46). Pores dissipate cellular ionic gradients but allow the retention of larger cytoplasmic constituents, leading to increased liquid osmotic pressure and water influx. These events are followed by cell swelling and subsequent osmotic lysis with the release of intracellular contents, which are potentially inflammatory (45, 46). Caspase-1-dependent DNA cleavage also occurs during pyroptosis (45, 47). However, the DNA cleavage observed during *S. typhimurium*-induced pyroptosis is independent of caspase-activated DNase (CAD) (45, 47), unlike what is observed during apoptosis, in which the proteolysis of inhibitor of CAD (ICAD) by apoptotic caspases mediates the release of CAD to the nucleus, where it cleaves DNA between nucleosomes. Therefore, pyroptotic cells do not display the typical pattern of oligonucleosomal fragmentation observed during apoptosis, a fact that can be used to distinguish between these two processes of cell death (48).

There is good evidence implicating pyroptosis as an important host defense mechanism mediated by NAIP/NLRC4 that clears intracellular pathogens *in vitro*. The death of infected macrophages by pyroptosis seems to correlate with a rapid loss of the replicative niche and high bacterial loads are recovered from macrophages deficient in components of inflammasomes or infected with mutant bacterial strains that fail to trigger their activation [reviewed by Bortoluci and Medzhitov (1) and Bergsbaken et al. (49)]. Moreover, a study conducted *in vivo* demonstrated that the NLRC4-dependent flagellin-mediated lysis of bacteria-containing macrophages not only results in the early loss of the intracellular replication niche but also creates an inflammatory milieu with the recruitment of effector cells to the infection site, which are involved in pathogen clearance (32). Although the possible targets of caspase-1 and caspase-11 mobilized during pyroptosis

remain unidentified, the studies involving NAIP/NLRC4 hugely contribute to the idea that this inflammatory form of cell death is an important effector mechanism against infections.

IL-1 β AND IL-18 SECRETION

IL-1 was the first identified cytokine and has been related to several inflammatory processes. IL-1 plays a role in virtually all cells and organs, ranging from fever and resistance to microorganisms to the activation of the hypothalamus–pituitary–adrenal axis (HPA) (50–56). IL-18 was first described in 1989 as a potent IFN- γ -inducing factor and an important component of polarized type-1 T helper cells (Th1) and type-1 macrophages (M1) responses, cells with a pro-inflammatory profile (57–59). Macrophages, monocytes, lymphocytes, keratinocytes, microglia, neutrophils, dendritic cells, and other cells are described as important sources of IL-1 β and IL-18 (60–64). IL-18 and IL-1 β have similar processing; they are both synthesized in an inactive form that requires processing by active caspase-1 to become biologically active (61, 65, 66). Although extensively studied, the mechanism responsible for IL-1 β and IL-18 release has not been fully elucidated. These cytokines can be passively released during cell lysis; however, there is recent evidence supporting the existence of active mechanisms involved in the secretion of IL-1 β and IL-18, such as caspase-1-induced membrane pores, vesicle shedding and lysosomal exocytosis (45, 49).

Although the precise effector mechanisms of IL-1 β and IL-18 remain to be elucidated, these cytokines have been reported to be important mediators induced by NAIP/NLRC4 to host resistance to bacterial infections (67). In addition to the effects of IL-1 β and IL-18 in the activation and recruitment of innate immune cells, these cytokines have important roles in the activation and differentiation of T lymphocytes (52). IL-1 β and IL-18 have been shown to drive the establishment of T CD4 $^{+}$ adaptive responses in mice and in humans and are responsible for the differentiation of Th17 and Th1, respectively (68–70). However, little is known about the involvement of IL-1 β and IL-18 in NAIP/NLRC4-induced adaptive immune responses. Kupz et al. demonstrated that IL-18, when produced by the activation of NLRC4 during infection by *S. typhimurium*, is required for the activation of non-cognate CD8 $^{+}$ T cells and the production of IFN- γ (71), supporting a role for this cytokine in the induction of cellular responses.

Additional evidence of the role of NAIP/NLRC4 in the activation of T cells came from an experimental vaccination with irradiated flagellin-expressing tumor cells. Authors demonstrated that the immunization of mice with flagellin-fused tumor cells induced tumor-specific CD4 $^{+}$ and CD8 $^{+}$ T cell responses and prevented parental tumor growth. Despite the well-known role of TLR5, the recognition of flagellin by the NAIP5/NLRC4 inflammasome was also required for the induction of a protective CD8 $^{+}$ T cell response and tumor suppression. Although the NAIP5/NLRC4 inflammasome-mediated IL-1 β secretion in response to the injection of flagellin-modified tumor cells, it is unclear whether the involvement of this cytokine was necessary for the success of this immunotherapy. The role of IL-1 β and IL-18 in tumorigenesis remains controversial. There is strong evidence supporting pro-tumorigenic properties of these cytokines via the induction

of chronic inflammation. Although the induction of Tregs and Th17 could impair the immune response against tumor cells, it is reasonable to consider that the activation of Th1 and cytotoxic CD8 T cells by IL-1 β and IL-18 may be beneficial to the host (72, 73).

EMERGING EFFECTOR MECHANISMS MEDIATED BY THE NAIP/NLRC4 INFLAMMASOME

HUMORAL EFFECTOR MECHANISMS

In addition to the well-characterized functions of NAIP/NLRC4 inflammasomes described above, non-canonical effector mechanisms have emerged. Recent data describe a range of effector functions mediated by NAIP/NLRC4 inflammasomes that operate independently of IL-1 β , IL-18 and pyroptosis. The NAIP5/NLRC4 inflammasome has been implicated in the activation of phospholipase A2 (cPLA2) with a consequent production of lipid mediators, such as prostaglandins and leukotrienes (74). Authors demonstrated that systemic cytosolic flagellin stimulation leads to an “eicosanoid storm” that initiates inflammation and the loss of vascular fluids, resulting in a very fast death in mice. Of note, these effects are mediated by NAIP5/NLRC4 and occur independently of IL-1 β /IL-18 or pyroptosis.

Inflammasomes have also been implicated in the active secretion of endogenous molecules known as DAMPs, challenging the idea that these molecules are only passively released during the process of cell lysis (75). IL-1 α is an alarmin, whose release has been recently linked to inflammasomes. Both IL-1 β and IL-1 α present some common features, such as belonging to the same family, synthesis in the cytoplasm and secretion by an unconventional pathway independent of the endoplasmic reticulum and Golgi complex (55); additionally, they are released simultaneously by various stimuli, and they act on the same receptor, IL-1R1, thus sharing some biological functions (52). However, despite these similarities, there are some important differences in the production, secretion, and function of these cytokines. Unprocessed forms of both IL-1 α and IL-1 β are thought to be produced in response to TLR ligands, but they have distinct activities. Unlike IL-1 β , which needs to be processed by caspase-1 to become biologically active (65), the uncleaved form of IL-1 α is able to engage IL-1R1 (60, 76), although its full activity seems to require cleavage by calpain (77). Although IL-1 α is not a substrate for caspase-1, there are some reports that have demonstrated that macrophages from caspase-1-deficient mice release less IL-1 α (27, 78–80), suggesting the involvement of inflammasomes.

The mechanism by which caspase-1 mediates IL-1 α secretion is still a matter of debate. A recent study demonstrated that the requirement of inflammasomes for IL-1 α secretion depends on the nature of agonists (81). Caspase-1 has been described as a shuttle that facilitates the secretion of leaderless proteins, such as IL-1 α (80). However, it is not clear whether active caspase-1 is the shuttle itself or whether it activates another machinery that is dependent on its activity, e.g., IL-1 β (82) or IL-1R2 (77), as has been proposed for the secretion of IL-1 α in response to NLRP3 agonists. The involvement of NLRC4 inflammasomes in IL-1 α secretion is poorly understood. In one previous study, infection by *S. typhimurium* resulted in NLRC4- and caspase-1-dependent

secretion of IL-1 α (81). Interestingly, in contrast with most of the NLRP3 agonists, the secretion of IL-1 α in response to *S. typhimurium* was completely independent of ASC, indicating a differential requirement for this adaptor molecule in cytokine secretion in response to NLRC4 agonists, as IL-1 β is entirely dependent on ASC (2). However, Barry et al. showed that IL-1 α initiates the inflammatory response driven by *L. pneumophila* independent of caspase-1 and NLRC4 (83). We recently reported that the activation of macrophages with purified flagellin inserted into lipidic vesicles induced IL-1 α secretion in a manner partially dependent on caspase-1 and cathepsin B (27). Therefore, the reasons for the discrepancies in the literature and the precise mechanisms involved in the cross talk between IL-1 α and NLRC4/caspase-1 axis remain to be addressed.

Another factor whose secretion has been linked to inflammasomes is the “High Mobility group box-1” (HMGB-1). HMGB-1 is a nuclear protein involved in the regulation of nucleosome function and DNA transcription that functions as an inflammatory mediator when released to the extracellular milieu (84). Lamkanfi et al. reported a critical role for HMGB-1 secreted through the NLRP3/ASC/caspase-1 axis in LPS-induced endotoxic shock (85). Interestingly, macrophages infected with *S. typhimurium* released significant amounts of HMGB-1 in a NLRC4 and caspase-1-dependent manner but independently of ASC, which is similar to previous reports of IL-1 α secretion (81). During pyroptosis induced by a variety of stimuli, including *S. typhimurium* infection, HMGB-1 did not undergo caspase-1-mediated processing before its secretion, but extracellular HMGB-1 was hyperacetylated at the nuclear localization sequences (NLSs) (86). Because this translational modification is essential for HMGB-1 translocation from the nucleus to the cytoplasm (87, 88), HMGB-1 release upon inflammasome activation seems to be a coordinated process. More recently, Nystrom et al. (89) reported that NLRC4-mediated pyroptosis is the prevalent factor in the regulation of HMGB-1 secretion, leading to the release of the chemo-tactic acetylated HMGB-1 isoform without requiring TLR-derived priming. Although the mechanisms by which inflammasome components can regulate DAMPs secretion still need to be better understood, DAMPs are already considered important therapeutic targets because of their role in host resistance against infection and their involvement in inflammatory disorders.

With respect to antibodies production NLRC4, NAIP5, and caspase-1 have been reported to have a redundant role with TLR5 in the induction of total IgG (90) or IgG1 (91) against flagellin or co-administered OVA and an additive effect to TLR5 in the induction of IgG2a (91). In the absence of MyD88, in which TLR5, IL-1 β , IL-1 α , and IL-18 signaling is compromised, the production of antibodies induced by flagellin was reduced but not abolished, and a large amount of antibodies was still produced (91). The same results were obtained with TLR5/caspase-1 double-knockout mice (91), supporting previous data that demonstrated that no significant difference was observed in specific anti-flagellin IgG titers in mice deficient for IL-18 (92) or IL-1R (93). These reports suggest that some yet-undiscovered mechanism that acts in addition to TLR5 and inflammasome-mediated cytokines could be involved in the adjuvant properties of flagellin, requiring new investigations into this agonist.

CELLULAR EFFECTOR MECHANISMS

In addition to inflammatory mediators and cell death processes, some cellular effector mechanisms mediated by NLRC4 have emerged. Previous studies from our group described a requirement of NAIP5, NLRC4, and caspase-1 for the activation of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and nitric oxide (NO) secretion in response to cytosolic flagellin (94). Interestingly, cytosolic flagellin-induced iNOS activation is preserved in the absence of MYD88, ruling out the participation of TLR5, IL-1 β , and IL-18. Moreover, NO secretion through the NAIP5/NLRC4-caspase-1 axis in response to flagellin is involved in the control of *L. pneumophila* (94) and *S. typhimurium* (unpublished data from our group) by macrophages, pointing to this pathway as an additional effector mechanism mediated by NAIP5/NLRC4.

Autophagy is another effector mechanism used by NAIP5/NLRC4 to control *L. pneumophila*. In the presence of NAIP5, NLRC4 macrophages present a rapid turnover of LC3⁺ *L. pneumophila*-containing vesicles, preventing the establishment of secondary infections (95). This response is mediated by the detection of flagellin, and the inhibition of autophagy in macrophages infected with flagellin-sufficient *L. pneumophila* increased the rate of pyroptosis in these cells. These data confirm a previous study that demonstrated that NLRC4 plays a role in the regulation of autophagy by binding Beclin-1 in steady-state conditions (96). Because the initiation of autophagy seems to precede the induction of pyroptosis, autophagy can be considered a pathway through which macrophages raise the threshold of contaminants necessary to result in the loss of cell by inflammatory cell death. NAIP5/NLRC4 can also restrict flagellin-competent *L. pneumophila* replication by promoting the delivery of *L. pneumophila*-containing phagosomes (LCP) to lysosomes for degradation (43, 97). In the absence of NAIP5/NLRC4/caspase-1, LCP avoids fusion with lysosomes, which allows the pathogen to exponentially replicate inside macrophages. This effect is dependent on caspase-1-mediated caspase-7 processing and does not require IL-1 β /IL-18 and the classical apoptosis pathway involving caspase-8 and -9 (98). These data corroborate a previous report that demonstrated a requirement of NLRC4, caspase-1, and ASC for caspase-7 processing during infection with flagellin-competent *S. typhimurium* (99). NLRC4 and ASC-dependent caspase-8 proteolysis was also reported during *S. typhimurium* infection (100). Interestingly, caspase-8 contributes to *Salmonella*-induced IL-1 β production, but it is dispensable for inducing pyroptosis, whereas caspase-1 processes pro-IL-1 β and coordinates pyroptosis. These data highlight the fact that inflammasomes are dynamic complexes that are able to recruit distinct members of the caspase family to induce diverse effector functions in response to *Salmonella* infection.

Similar to what has been demonstrated during apoptosis (101, 102) and necrosis (103), the cleavage of PARP1 (also called ARTD1) was also observed during pyroptosis induced by *S. typhimurium* (104). PARP1 processing in *S. typhimurium*-infected macrophages was abrogated in *Nlr4*^{-/-} but not in *Nlrp3*^{-/-} cells, consistent with the role of the NAIP5/NLRC4 inflammasome in the induction of pyroptosis during *S. typhimurium* infection (12, 31, 105). PARP1 is a nuclear chromatin-associated multifunctional enzyme that catalyzes the polymerization of ADP-ribose units from donor NAD⁺ molecules (106, 107). Although it has been

historically studied in the context of genotoxic stress signaling and consequent apoptosis, PARP1 has been related to chromatin structure regulation, transcription, and chromosomal organization (108, 109). Previous reports showed that inflammasomes are able to use PARP1 to induce the transcription of NF- κ B-dependent target genes independently of any type of programmed cell death (110). Upon LPS stimulation, caspase-7 is activated by caspase-1, which is translocated to the nucleus to induce PARP1 cleavage at the promoters of a subset of NF- κ B-dependent target genes that are negatively regulated by PARP1. Mutating the PARP1 cleavage site D214 renders PARP1 uncleavable and inhibits PARP1 release from chromatin and, therefore, chromatin decondensation, thereby restraining the expression of cleavage-dependent NF- κ B target genes, such as *il-6*, *cfs2*, and *lif*, but not *ip-10* (110). Preliminary and unpublished data from our group suggest the involvement of caspase-1-dependent PARP1 cleavage in iNOS gene expression upon cytosolic flagellin stimulation, as iNOS expression is significantly reduced in macrophages that harbor non-cleavable PARP1 (D214N). This is important evidence of the involvement of inflammasomes in epigenetic regulation and gene expression, although many of these outputs require further evaluation.

An important process of lysosomal exocytosis occurs during pyroptosis. Bergsbaken and Cookson (111) demonstrated that caspase-1-mediated pore formation induced during *S. typhimurium* infection promotes an influx of extracellular calcium, which is critical for lysosomal exocytosis. The release of lysosomal proteases with known antimicrobial activity contributes to the control of extracellular bacteria. In addition to the effect

of lysosomal contents in the extracellular compartment, recent data from our group demonstrated that cytosolic flagellin is also able to activate a lysosomal pathway that culminates in an inflammasome-independent inflammatory form of cell death. This inflammasome-independent cell death induced by cytosolic flagellin is regulated by cathepsins B and D and is temporally correlated with the restriction of *S. typhimurium* infection by macrophages (27). Together, these data indicate a cross talk between lysosomes and NAIP/NLRC4 inflammasomes that impact the control of bacterial infections and opens new avenues for the development of inflammasome-based therapeutic strategies for non-infectious pathologies such as tumors. In fact, lysosomes have been considered important targets for the development of anti-tumor drugs (112). Lysosomes from cancer cells appear to be less stable than normal cells, which has given rise to the development of therapies based on lysosomotropic detergents. In this sense, flagellin could be an alternative that in addition to the induction of lysosomal cell death, is able to mediate several effector mechanisms as described throughout this review (Figure 1).

CONCLUSION AND FUTURE DIRECTIONS

More than 10 years after their discovery (14, 15), the molecular mechanisms involved in the activation of NAIP/NLRC4 began to be elucidated (18, 19, 26). From two distinct inflammasome complexes, NAIPs emerged as universal sensors for cytosolic bacterial proteins, whereas NLRC4 became an adaptor molecule responsible for the recruitment and activation of caspase-1. At the same time, in addition to NAIP5, novel NAIPs members were described,

amplifying the potential of these proteins to detect bacterial infections (18, 19, 113, 114). Despite this important information, the molecular signatures of agonists recognized by NAIP/NLRC4 inflammasomes still require further study. Moreover, NLRC4 has been associated with host resistance against a mucosal *Candida albicans* infection (115) and in a colitis-associated colorectal cancer (CAC) model (116, 117). Interestingly, in both cases, NLRC4 seems to exert a protective role in non-hematopoietic compartments. However, the precise mechanism of NLRC4 activation in these models is unknown, raising the possibility that NLRC4 functions as an adaptor molecule for other NLR members in addition to NAIP and providing new insights into inflammasome signaling.

NAIP/NLRC4 are most likely the best-studied inflammasomes in the context of host resistance against infections. In addition to the extensively described IL-1 β and IL-18 secretion and pyroptosis, other important effector mechanisms mediated by these inflammasomes have recently emerged (Figure 1). Moreover, flagellin, the best studied NAIP/NLRC4 ligand, has been reported to activate distinct pathways, such as autophagy (95) and a lysosome pathway (27) (Figure 1). Although the precise mechanism involved in the lysosome disruption by flagellin is still under investigation, it culminates in an inflammatory process of cell death that is accompanied by IL-1 α secretion and contributes to the control of *S. typhimurium* by macrophages. This peculiar process of cell death occurs in the absence of inflammasome components. Additionally, the inhibition of cathepsin B disrupted IL-1 β secretion and pyroptosis in response to cytosolic flagellin, indicating a role for lysosomal proteases in the regulation of NAIP/NLRC4-dependent responses. Because human cells do not express NAIP5 or NAIP6 (18), the activation of the lysosomal pathway by flagellin might be an alternative pathway used when human cells interact with flagellated bacteria that reach cell cytosol. In the context of therapeutic strategies, this knowledge could be an important gain, as the immune properties of flagellin have been extensively exploited in different models. At least in the context of anti-tumor vaccination (118) and antibody production (90, 91), the protective and adjuvancy roles of flagellin require its cytosolic detection. Together, these reports open up new avenues to explore the immune potential of NAIP/NLRC4 agonists as therapeutic targets.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – Brazil) Proc 2013/16010-5, Brazilian Research Council (CNPq-Brazil), CAPES, and INCTV.

REFERENCES

- Bortolucci KR, Medzhitov R. Control of infection by pyroptosis and autophagy: role of TLR and NLR. *Cell Mol Life Sci* (2010) 67(10):1643–51. doi:10.1007/s00018-010-0335-5
- Broz P, von Moltke J, Jones JW, Vance RE, Monack DM. Differential requirement for Caspase-1 autoproteolysis in pathogen-induced cell death and cytokine processing. *Cell Host Microbe* (2010) 8(6):471–83. doi:10.1016/j.chom.2010.11.007
- Broz P, Monack DM. Noncanonical inflammasomes: caspase-11 activation and effector mechanisms. *PLoS Pathog* (2013) 9(2):e1003144. doi:10.1371/journal.ppat.1003144
- Maslanik T, Mahaffey L, Tannura K, Beninson L, Greenwood BN, Fleshner M. The inflammasome and danger associated molecular patterns (DAMPs) are implicated in cytokine and chemokine responses following stressor exposure. *Brain Behav Immun* (2013) 28:54–62. doi:10.1016/j.bbi.2012.10.014
- Ting JP, Lovering RC, Alnemri ES, Bertin J, Boss JM, Davis BK, et al. The NLR gene family: a standard nomenclature. *Immunity* (2008) 28(3):285–7. doi:10.1016/j.immuni.2008.02.005
- Martinon F, Mayor A, Tschopp J. The inflammasomes: guardians of the body. *Annu Rev Immunol* (2009) 27:229–65. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132715
- Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell* (2010) 140(6):821–32. doi:10.1016/j.cell.2010.01.040
- Kayagaki N, Warming S, Lamkanfi M, Vande Walle L, Louie S, Dong J, et al. Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. *Nature* (2011) 479(7371):117–21. doi:10.1038/nature10558
- Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell* (2002) 10(2):417–26. doi:10.1016/S1097-2765(02)00599-3
- Molofsky AB, Byrne BG, Whitfield NN, Madigan CA, Fuse ET, Tateda K, et al. Cytosolic recognition of flagellin by mouse macrophages restricts *Legionella pneumophila* infection. *J Exp Med* (2006) 203(4):1093–104. doi:10.1084/jem.20051659
- Ren T, Zamboni DS, Roy CR, Dietrich WF, Vance RE. Flagellin-deficient *Legionella* mutants evade caspase-1- and Naip5-mediated macrophage immunity. *PLoS Pathog* (2006) 2(3):e18. doi:10.1371/journal.ppat.0020018
- Franchi L, Amer A, Body-Malapel M, Kanneganti TD, Ozoren N, Jagirdar R, et al. Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1beta in *Salmonella*-infected macrophages. *Nat Immunol* (2006) 7(6):576–82. doi:10.1038/ni1346
- Miao EA, Alpuche-Aranda CM, Dors M, Clark AE, Bader MW, Miller SI, et al. Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1beta via Ipaf. *Nat Immunol* (2006) 7(6):569–75. doi:10.1038/ni1344
- Geddes BJ, Wang L, Huang WJ, Lavellee M, Manji GA, Brown M, et al. Human CARD12 is a novel CED4/Apaf-1 family member that induces apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* (2001) 284(1):77–82. doi:10.1006/bbrc.2001.4928
- Poyet JL, Srinivasula SM, Tnani M, Razmara M, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES. Identification of Ipaf, a human caspase-1-activating protein related to Apaf-1. *J Biol Chem* (2001) 276(30):28309–13. doi:10.1074/jbc.C100250200
- Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by toll-like receptor 5. *Nature* (2001) 410(6832):1099–103. doi:10.1038/35074106
- Lightfield KL, Persson J, Trinidad NJ, Brubaker SW, Kofoed EM, Sauer JD, et al. Differential requirements for NAIP5 in activation of the NLRC4 inflammasome. *Infect Immun* (2011) 79(4):1606–14. doi:10.1128/IAI.01187-10
- Zhao Y, Yang J, Shi J, Gong YN, Lu Q, Xu H, et al. The NLRC4 inflammasome receptors for bacterial flagellin and type III secretion apparatus. *Nature* (2011) 477(7366):596–600. doi:10.1038/nature10510
- Kofoed EM, Vance RE. Innate immune recognition of bacterial ligands by NAIPs determines inflammasome specificity. *Nature* (2011) 477(7366):592–5. doi:10.1038/nature10394
- Faustin B, Lartigue L, Bruey JM, Luciano F, Sergienko E, Bailly-Maitre B, et al. Reconstituted NALP1 inflammasome reveals two-step mechanism of caspase-1 activation. *Mol Cell* (2007) 25(5):713–24. doi:10.1016/j.molcel.2007.01.032
- Lightfield KL, Persson J, Brubaker SW, Witte CE, von Moltke J, Dunipace EA, et al. Critical function for Naip5 in inflammasome activation by a conserved carboxy-terminal domain of flagellin. *Nat Immunol* (2008) 9(10):1171–8. doi:10.1038/ni.1646
- Half EF, Diebold CA, Versteeg M, Schouten A, Brondijk TH, Huizinga EG. Formation and structure of a NAIP5-NLRC4 inflammasome induced by direct interactions with conserved N- and C-terminal regions of flagellin. *J Biol Chem* (2012) 287(46):38460–72. doi:10.1074/jbc.M112.393512
- Kofoed EM, Vance RE. NAIPs: building an innate immune barrier against bacterial pathogens. NAIPs function as sensors that initiate innate immunity by detection of bacterial proteins in the host cell cytosol. *Bioessays* (2012) 34(7):589–98. doi:10.1002/bies.201200013
- Diez E, Lee SH, Gauthier S, Yarghi Z, Tremblay M, Vidal S, et al. Birc1e is the gene within the Lgn1 locus associated with resistance to *Legionella pneumophila*. *Nat Genet* (2003) 33(1):55–60. doi:10.1038/ng1065
- Zamboni DS, Kobayashi KS, Kohlsdorf T, Ogura Y, Long EM, Vance RE, et al. The Birc1e cytosolic pattern-recognition receptor contributes to the

- detection and control of *Legionella pneumophila* infection. *Nat Immunol* (2006) 7(3):318–25. doi:10.1038/ni1305
26. Tenthorey JL, Kofoed EM, Daugherty MD, Malik HS, Vance RE. Molecular basis for specific recognition of bacterial ligands by NAIP/NLRC4 inflammasomes. *Mol Cell* (2014) 54(1):17–29. doi:10.1016/j.molcel.2014.02.018
 27. Lage SL, Buzzo CL, Amaral EP, Matteucci KC, Massis LM, Icimoto MY, et al. Cytosolic flagellin-induced lysosomal pathway regulates inflammasome-dependent and -independent macrophage responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2013) 110(35):E3321–30. doi:10.1073/pnas.1305316110
 28. Sutterwala FS, Ogura Y, Zamboni DS, Roy CR, Flavell RA. NALP3: a key player in caspase-1 activation. *J Endotoxin Res* (2006) 12(4):251–6. doi:10.1179/096805106X118771
 29. Hu Z, Yan C, Liu P, Huang Z, Ma R, Zhang C, et al. Crystal structure of NLRC4 reveals its autoinhibition mechanism. *Science* (2013) 341(6142):172–5. doi:10.1126/science.1236381
 30. Qu Y, Misaghi S, Izrael-Tomasevic A, Newton K, Gilmour LL, Lamkanfi M, et al. Phosphorylation of NLRC4 is critical for inflammasome activation. *Nature* (2012) 490(7421):539–42. doi:10.1038/nature11429
 31. Mariathasan S, Newton K, Monack DM, Vucic D, French DM, Lee WP, et al. Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature* (2004) 430(6996):213–8. doi:10.1038/nature02664
 32. Miao EA, Leaf IA, Treuting PM, Mao DP, Dors M, Sarkar A, et al. Caspase-1-induced pyroptosis is an innate immune effector mechanism against intracellular bacteria. *Nat Immunol* (2010) 11(12):1136–42. doi:10.1038/ni.1960
 33. Sutterwala FS, Mijares LA, Li L, Ogura Y, Kazmierczak BI, Flavell RA. Immune recognition of *Pseudomonas aeruginosa* mediated by the IPAF/NLRC4 inflammasome. *J Exp Med* (2007) 204(13):3235–45. doi:10.1084/jem.20071239
 34. Miao EA, Ernst RK, Dors M, Mao DP, Aderem A. *Pseudomonas aeruginosa* activates caspase 1 through Ipaf. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2008) 105(7):2562–7. doi:10.1073/pnas.0712183105
 35. Brodsky IE, Palm NW, Sadanand S, Ryndak MB, Sutterwala FS, Flavell RA, et al. A Yersinia effector protein promotes virulence by preventing inflammasome recognition of the type III secretion system. *Cell Host Microbe* (2010) 7(5):376–87. doi:10.1016/j.chom.2010.04.009
 36. Suzuki T, Franchi L, Toma C, Ashida H, Ogawa M, Yoshikawa Y, et al. Differential regulation of caspase-1 activation, pyroptosis, and autophagy via Ipaf and ASC in *Shigella*-infected macrophages. *PLoS Pathog* (2007) 3(8):e111. doi:10.1371/journal.ppat.0030111
 37. McCoy AJ, Koizumi Y, Higa N, Suzuki T. Differential regulation of caspase-1 activation via NLRP3/NLRC4 inflammasomes mediated by aerolysin and type III secretion system during *Aeromonas veronii* infection. *J Immunol* (2010) 185(11):7077–84. doi:10.4049/jimmunol.1002165
 38. Franchi L, Munoz-Planillo R, Nunez G. Sensing and reacting to microbes through the inflammasomes. *Nat Immunol* (2012) 13(4):325–32. doi:10.1038/ni.2231
 39. Cookson BT, Brennan MA. Pro-inflammatory programmed cell death. *Trends Microbiol* (2001) 9(3):113–4. doi:10.1016/S0966-842X(00)01936-3
 40. Chen LM, Kaniga K, Galan JE. *Salmonella* spp. are cytotoxic for cultured macrophages. *Mol Microbiol* (1996) 21(5):1101–15. doi:10.1046/j.1365-2958.1996.471410.x
 41. Lundberg U, Vinatzer U, Berdnik D, von Gabain A, Baccarini M. Growth phase-regulated induction of *Salmonella*-induced macrophage apoptosis correlates with transient expression of SPI-1 genes. *J Bacteriol* (1999) 181(11):3433–7.
 42. Brennan MA, Cookson BT. *Salmonella* induces macrophage death by caspase-1-dependent necrosis. *Mol Microbiol* (2000) 38(1):31–40. doi:10.1046/j.1365-2958.2000.02103.x
 43. Amer A, Franchi L, Kanneganti TD, Body-Malapel M, Ozören N, Brady G, et al. Regulation of *Legionella* phagosome maturation and infection through flagellin and host Ipaf. *J Biol Chem* (2006) 281(46):35217–23. doi:10.1074/jbc.M604933200
 44. Franchi L, Stoolman J, Kanneganti TD, Verma A, Ramphal R, Núñez G. Critical role for Ipaf in *Pseudomonas aeruginosa*-induced caspase-1 activation. *Eur J Immunol* (2007) 37(11):3030–9. doi:10.1002/eji.200737532
 45. Fink SL, Cookson BT. Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages. *Cell Microbiol* (2006) 8(11):1812–25. doi:10.1111/j.1462-5822.2006.00751.x
 46. Silveira TN, Zamboni DS. Pore formation triggered by *Legionella* spp. is an Nlr4 inflammasome-dependent host cell response that precedes pyroptosis. *Infect Immun* (2010) 78(3):1403–13. doi:10.1128/IAI.00905-09
 47. Bergsbaken T, Fink SL, Cookson BT. Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nat Rev Microbiol* (2009) 7(2):99–109. doi:10.1038/nrmicro2070
 48. Lage SL, Amarante-Mendes GP, Bortoluci KR. Evaluation of pyroptosis in macrophages using cytosolic delivery of purified flagellin. *Methods* (2013) 61(2):110–6. doi:10.1016/j.jymeth.2013.02.010
 49. Bergsbaken T, Fink SL, den Hartigh AB, Loomis WP, Cookson BT. Coordinated host responses during pyroptosis: caspase-1-dependent lysosome exocytosis and inflammatory cytokine maturation. *J Immunol* (2011) 187(5):2748–54. doi:10.4049/jimmunol.1100477
 50. Van der Meer JW, Van de Gevel JS, Van Hinsbergh VW, Leijh PC. The influence of culture conditions and serum lipids on interleukin-1 production by human monocytes. *J Immunol Methods* (1988) 108(1–2):19–26. doi:10.1016/0022-1759(88)90397-3
 51. Delaleu N, Bickel M. Interleukin-1 beta and interleukin-18: regulation and activity in local inflammation. *Periodontol 2000* (2004) 35:42–52. doi:10.1111/j.0906-6713.2004.003569.x
 52. Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol* (2009) 27:519–50. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132612
 53. Dinarello CA. Anti-inflammatory agents: present and future. *Cell* (2010) 140(6):935–50. doi:10.1016/j.cell.2010.02.043
 54. Gabay C, Lamacchia C, Palmer G. IL-1 pathways in inflammation and human diseases. *Nat Rev Rheumatol* (2010) 6(4):232–41. doi:10.1038/nrrheum.2010.4
 55. Sims JE, Smith DE. The IL-1 family: regulators of immunity. *Nat Rev Immunol* (2010) 10(2):89–102. doi:10.1038/nri2691
 56. Dinarello CA. Grand challenge in inflammation. *Front Immunol* (2012) 3:12. doi:10.3389/fimmu.2012.00012
 57. Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H, Okamura H. Interleukin-18 is a unique cytokine that stimulates both Th1 and Th2 responses depending on its cytokine milieu. *Cytokine Growth Factor Rev* (2001) 12(1):53–72. doi:10.1016/S1359-6101(00)00015-0
 58. Siegmund B, Fantuzzi G, Rieder F, Gamboni-Robertson F, Lehr HA, Hartmann G, et al. Neutralization of interleukin-18 reduces severity in murine colitis and intestinal IFN-gamma and TNF-alpha production. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* (2001) 281(4):R1264–73.
 59. Bastos KR, Barboza R, Sardinha L, Russo M, Alvarez JM, Lima MR. Role of endogenous IFN-gamma in macrophage programming induced by IL-12 and IL-18. *J Interferon Cytokine Res* (2007) 27(5):399–410. doi:10.1089/jir.2007.0128
 60. Mosley B, Urdal DL, Prickett KS, Larsen A, Cosman D, Conlon PJ, et al. The interleukin-1 receptor binds the human interleukin-1 alpha precursor but not the interleukin-1 beta precursor. *J Biol Chem* (1987) 262(7):2941–4.
 61. Puren AJ, Fantuzzi G, Dinarello CA. Gene expression, synthesis, and secretion of interleukin 18 and interleukin 1beta are differentially regulated in human blood mononuclear cells and mouse spleen cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1999) 96(5):2256–61. doi:10.1073/pnas.96.5.2256
 62. Berda-Haddad Y, Robert S, Salers P, Zekraoui L, Farnarier C, Dinarello CA, et al. Sterile inflammation of endothelial cell-derived apoptotic bodies is mediated by interleukin-1alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2011) 108(51):20684–9. doi:10.1073/pnas.1116848108
 63. Dinarello CA. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood* (2011) 117(14):3720–32. doi:10.1182/blood-2010-07-273417
 64. Carta S, Laveri R, Rubartelli A. Different members of the IL-1 family come out in different ways: DAMPs vs. cytokines? *Front Immunol* (2013) 4:123. doi:10.3389/fimmu.2013.00123
 65. Dinarello CA. Interleukin-1 beta, interleukin-18, and the interleukin-1 beta converting enzyme. *Ann N Y Acad Sci* (1998) 856:1–11. doi:10.1111/j.1749-6632.1998.tb08307.x
 66. Bellora F, Castriconi R, Doni A, Cantoni C, Moretta L, Mantovani A, et al. M-CSF induces the expression of a membrane-bound form of IL-18 in a subset of human monocytes differentiating in vitro toward macrophages. *Eur J Immunol* (2012) 42(6):1618–26. doi:10.1002/eji.201142173
 67. von Molte J, Ayres JS, Kofoed EM, Chavarria-Smith J, Vance RE. Recognition of bacteria by inflammasomes. *Annu Rev Immunol* (2013) 31:73–106. doi:10.1146/annurev-immunol-032712-095944
 68. Dinarello CA, Wolff SM. The role of interleukin-1 in disease. *N Engl J Med* (1993) 328(2):106–13. doi:10.1056/NEJM199301143280207

69. Chung Y, Chang SH, Martinez GJ, Yang XO, Nurieva R, Kang HS, et al. Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling. *Immunity* (2009) **30**(4):576–87. doi:10.1016/j.immuni.2009.02.007
70. Lasigliè D, Traggiai E, Federici S, Alessio M, Buoncompagni A, Accogli A, et al. Role of IL-1 beta in the development of human T(H)17 cells: lesson from NLRP3 mutated patients. *PLoS One* (2011) **6**(5):e20014. doi:10.1371/journal.pone.0020014
71. Kupz A, Guarda G, Gebhardt T, Sander LE, Short KR, Diavatopoulos DA, et al. NLRC4 inflammasomes in dendritic cells regulate noncognate effector function by memory CD8(+) T cells. *Nat Immunol* (2012) **13**(2):162–9. doi:10.1038/ni.2195
72. Kolb R, Liu GH, Janowski AM, Sutterwala FS, Zhang W. Inflammasomes in cancer: a double-edged sword. *Protein Cell* (2014) **5**(1):12–20. doi:10.1007/s13238-013-0001-4
73. Janowski AM, Kolb R, Zhang W, Sutterwala FS. Beneficial and detrimental roles of NLRs in carcinogenesis. *Front Immunol* (2013) **4**:370. doi:10.3389/fimmu.2013.00370
74. von Moltke J, Trinidad NJ, Moayeri M, Kintzer AF, Wang SB, van Rooijen N, et al. Rapid induction of inflammatory lipid mediators by the inflammasome in vivo. *Nature* (2012) **490**(7418):107–11. doi:10.1038/nature11351
75. Chen CJ, Kono H, Golenbock D, Reed G, Akira S, Rock KL. Identification of a key pathway required for the sterile inflammatory response triggered by dying cells. *Nat Med* (2007) **13**(7):851–6. doi:10.1038/nm1603
76. Howard AD, Kostura MJ, Thornberry N, Ding GJ, Limjoco G, Weidner J, et al. IL-1-converting enzyme requires aspartic acid residues for processing of the IL-1 beta precursor at two distinct sites and does not cleave 31-kDa IL-1 alpha. *J Immunol* (1991) **147**(9):2964–9.
77. Zheng Y, Humphry M, Maguire JJ, Bennett MR, Clarke MC. Intracellular interleukin-1 receptor 2 binding prevents cleavage and activity of interleukin-1alpha, controlling necrosis-induced sterile inflammation. *Immunity* (2013) **38**(2):285–95. doi:10.1016/j.immuni.2013.01.008
78. Kuida K, Lippke JA, Ku G, Harding MW, Livingston DJ, Su MS, et al. Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* (1995) **267**(5206):2000–3. doi:10.1126/science.7535475
79. Li P, Allen H, Banerjee S, Franklin S, Herzog L, Johnston C, et al. Mice deficient in IL-1 beta-converting enzyme are defective in production of mature IL-1 beta and resistant to endotoxic shock. *Cell* (1995) **80**(3):401–11. doi:10.1016/0092-8674(95)90490-5
80. Keller M, Rüegg A, Werner S, Beer HD. Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion. *Cell* (2008) **132**(5):818–31. doi:10.1016/j.cell.2007.12.040
81. Gross O, Yazdi AS, Thomas CJ, Masin M, Heinz LX, Guarda G, et al. Inflammasome activators induce interleukin-1alpha secretion via distinct pathways with differential requirement for the protease function of caspase-1. *Immunity* (2012) **36**(3):388–400. doi:10.1016/j.immuni.2012.01.018
82. Fetschschoss A, Kistowska M, LeibundGut-Landmann S, Beer HD, Johansen P, Senti G, et al. Inflammasome activation and IL-1beta target IL-1alpha for secretion as opposed to surface expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2011) **108**(44):18055–60. doi:10.1073/pnas.1109176108
83. Barry KC, Fontana MF, Portman JL, Dugan AS, Vance RE. IL-1alpha signaling initiates the inflammatory response to virulent *Legionella pneumophila* in vivo. *J Immunol* (2013) **190**(12):6329–39. doi:10.1049/jimmunol.1300100
84. Muller S, Scaffidi P, Degryse B, Bonaldi T, Ronfani L, Agresti A, et al. New EMBO members' review: the double life of HMGB1 chromatin protein: architectural factor and extracellular signal. *EMBO J* (2001) **20**(16):4337–40. doi:10.1093/emboj/20.16.4337
85. Lamkanfi M, Sarkar A, Vande Walle L, Vitari AC, Amer AO, Wewers MD, et al. Inflammasome-dependent release of the alarmin HMGB1 in endotoxemia. *J Immunol* (2010) **185**(7):4385–92. doi:10.4049/jimmunol.1000803
86. Lu B, Nakamura T, Inouye K, Li J, Tang Y, Lundbäck P, et al. Novel role of PKR in inflammasome activation and HMGB1 release. *Nature* (2012) **488**(7413):670–4. doi:10.1038/nature11290
87. Bonaldi T, Talamo F, Scaffidi P, Ferrera D, Porto A, Bachi A, et al. Monocytic cells hyperacetylate chromatin protein HMGB1 to redirect it towards secretion. *EMBO J* (2003) **22**(20):5551–60. doi:10.1093/emboj/cdg516
88. Evankovich J, Cho SW, Zhang R, Cardinal J, Dhupar R, Zhang L, et al. High mobility group box 1 release from hepatocytes during ischemia and reperfusion injury is mediated by decreased histone deacetylase activity. *J Biol Chem* (2010) **285**(51):39888–97. doi:10.1074/jbc.M110.128348
89. Nyström S, Antoine DJ, Lundbäck P, Lock JG, Nita AE, Höglstrand K, et al. TLR activation regulates damage-associated molecular pattern isoforms released during pyroptosis. *EMBO J* (2013) **32**(1):86–99. doi:10.1038/emboj.2012.328
90. Vijay-Kumar M, Carvalho FA, Aitken JD, Fifadara NH, Gewirtz AT. TLR5 or NLRC4 is necessary and sufficient for promotion of humoral immunity by flagellin. *Eur J Immunol* (2010) **40**(12):3528–34. doi:10.1002/eji.2010040421
91. Lopez-Yglesias AH, Zhao X, Quarles EK, Lai MA, VandenBos T, Strong RK, et al. Flagellin induces antibody responses through a TLR5- and inflammasome-independent pathway. *J Immunol* (2014) **192**(4):1587–96. doi:10.4049/jimmunol.1301893
92. Sanders CJ, Franchi L, Yarovinsky F, Uematsu S, Akira S, Núñez G, et al. Induction of adaptive immunity by flagellin does not require robust activation of innate immunity. *Eur J Immunol* (2009) **39**(2):359–71. doi:10.1002/eji.200838804
93. Sanders CJ, Moore DA III, Williams IR, Gewirtz AT. Both radioresistant and hemopoietic cells promote innate and adaptive immune responses to flagellin. *J Immunol* (2008) **180**(11):7184–92. doi:10.4049/jimmunol.180.11.7184
94. Buzzo CL, Campopiano JC, Massis LM, Lage SL, Cassado AA, Leme-Souza R, et al. A novel pathway for inducible nitric-oxide synthase activation through inflammasomes. *J Biol Chem* (2010) **285**(42):32087–95. doi:10.1074/jbc.M110.124297
95. Byrne BG, Dubuisson JF, Joshi AD, Persson JJ, Swanson MS. Inflammasome components coordinate autophagy and pyroptosis as macrophage responses to infection. *MBio* (2013) **4**(1):e620–612. doi:10.1128/mBio.00620-12
96. Jounai N, Kobiyama K, Shiina M, Ogata K, Ishii KJ, Takeshita F. NLRP4 negatively regulates autophagic processes through an association with beclin1. *J Immunol* (2011) **186**(3):1646–55. doi:10.4049/jimmunol.1001654
97. Fortier A, de Chastellier C, Balor S, Gros P. Birc1e/Naip5 rapidly antagonizes modulation of phagosome maturation by *Legionella pneumophila*. *Cell Microbiol* (2007) **9**(4):910–23. doi:10.1111/j.1462-5822.2006.00839.x
98. Akhter A, Gavrilin MA, Frantz L, Washington S, Ditty C, Limoli D, et al. Caspase-7 activation by the Nlrp4/Ipaf inflammasome restricts *Legionella pneumophila* infection. *PLoS Pathog* (2009) **5**(4):e1000361. doi:10.1371/journal.ppat.1000361
99. Lamkanfi M, Kanneganti TD, Van Damme P, Vanden Berghe T, Vanoverberghe I, Vandekerckhove J, et al. Targeted peptidocentric proteomics reveals caspase-7 as a substrate of the caspase-1 inflammasomes. *Mol Cell Proteomics* (2008) **7**(12):2350–63. doi:10.1074/mcp.M800132-MCP200
100. Man SM, Tourlomousis P, Hopkins L, Monie TP, Fitzgerald KA, Bryant CE. *Salmonella* infection induces recruitment of caspase-8 to the inflammasome to modulate IL-1beta production. *J Immunol* (2013) **191**(10):5239–46. doi:10.4049/jimmunol.1301581
101. Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, et al. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* (1995) **376**(6535):37–43. doi:10.1038/376037a0
102. Casciola-Rosen L, Rosen A, Petri M, Schlissel M. Surface blebs on apoptotic cells are sites of enhanced procoagulant activity: implications for coagulation events and antigenic spread in systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1996) **93**(4):1624–9. doi:10.1073/pnas.93.4.1624
103. Noseri C, Coppola S, Ghibelli L. Possible involvement of poly(ADP-ribosyl) polymerase in triggering stress-induced apoptosis. *Exp Cell Res* (1994) **212**(2):367–73. doi:10.1006/excr.1994.1156
104. Malireddi RK, Ippagunta S, Lamkanfi M, Kanneganti TD. Cutting edge: proteolytic inactivation of poly(ADP-ribose) polymerase 1 by the Nlrp3 and Nlrp4 inflammasomes. *J Immunol* (2010) **185**(6):3127–30. doi:10.4049/jimmunol.1001512
105. Kanneganti TD, Lamkanfi M, Kim YG, Chen G, Park JH, Franchi L, et al. Pannexin-1-mediated recognition of bacterial molecules activates the cryopyrin inflammasome independent of Toll-like receptor signaling. *Immunity* (2007) **26**(4):433–43. doi:10.1016/j.immuni.2007.03.008
106. Kim MY, Zhang T, Kraus WL. Poly(ADP-ribosyl)ation by PARP-1: “PAR-laying” NAD+ into a nuclear signal. *Genes Dev* (2005) **19**(17):1951–67. doi:10.1101/gad.1331805
107. Hassa PO, Haenni SS, Elser M, Hottiger MO. Nuclear ADP-ribosylation reactions in mammalian cells: where are we today and where are we going? *Microbiol Mol Biol Rev* (2006) **70**(3):789–829. doi:10.1128/MMBR.00040-05
108. Kraus WL, Lis JT. PARP goes transcription. *Cell* (2003) **113**(6):677–83. doi:10.1016/S0092-8674(03)00433-1

109. Krishnakumar R, Kraus WL. PARP-1 regulates chromatin structure and transcription through a KDM5B-dependent pathway. *Mol Cell* (2010) **39**(5):736–49. doi:10.1016/j.molcel.2010.08.014
110. Erenér S, Pétrilli V, Kassner I, Minotti R, Castillo R, Santoro R, et al. Inflammasome-activated caspase 7 cleaves PARP1 to enhance the expression of a subset of NF-kappaB target genes. *Mol Cell* (2012) **46**(2):200–11. doi:10.1016/j.molcel.2012.02.016
111. Bergsbaken T, Cookson BT. Macrophage activation redirects yersinia-infected host cell death from apoptosis to caspase-1-dependent pyroptosis. *PLoS Pathog* (2007) **3**(11):e161. doi:10.1371/journal.ppat.0030161
112. Aits S, Jaattela M. Lysosomal cell death at a glance. *J Cell Sci* (2013) **126**(Pt 9):1905–12. doi:10.1242/jcs.091181
113. Rayamajhi M, Zak DE, Chavarria-Smith J, Vance RE, Miao EA. Cutting edge: mouse NAIP1 detects the type III secretion system needle protein. *J Immunol* (2013) **191**(8):3986–9. doi:10.4049/jimmunol.1301549
114. Yang J, Zhao Y, Shi J, Shao F. Human NAIP and mouse NAIP1 recognize bacterial type III secretion needle protein for inflammasome activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2013) **110**(35):14408–13. doi:10.1073/pnas.1306376110
115. Tomalka J, Ganesan S, Azodi E, Patel K, Majmudar P, Hall BA, et al. A novel role for the NLRC4 inflammasome in mucosal defenses against the fungal pathogen *Candida albicans*. *PLoS Pathog* (2011) **7**(12):e1002379. doi:10.1371/journal.ppat.1002379
116. Hu B, Elinav E, Huber S, Booth CJ, Strowig T, Jin C, et al. Inflammation-induced tumorigenesis in the colon is regulated by caspase-1 and NLRC4. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2010) **107**(50):21635–40. doi:10.1073/pnas.1016814108
117. Hu B, Elinav E, Flavell RA. Inflammasome-mediated suppression of inflammation-induced colorectal cancer progression is mediated by direct regulation of epithelial cell proliferation. *Cell Cycle* (2011) **10**(12):1936–9. doi:10.4161/cc.10.12.16008
118. Garaude J, Kent A, van Rooijen N, Blander JM. Simultaneous targeting of toll- and nod-like receptors induces effective tumor-specific immune responses. *Sci Transl Med* (2012) **4**(120):120ra16. doi:10.1126/scitranslmed.3002868

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 24 April 2014; accepted: 17 June 2014; published online: 02 July 2014.

Citation: Lage SL, Longo C, Branco LM, da Costa TB, Buzzo CdL and Bortoluci KR (2014) Emerging concepts about NAIP/NLRC4 inflammasomes. *Front. Immunol.* **5**:309. doi: 10.3389/fimmu.2014.00309

This article was submitted to Tumor Immunity, a section of the journal *Frontiers in Immunology*.

Copyright © 2014 Lage, Longo, Branco, da Costa, Buzzo and Bortoluci. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

**APÊNDICE B - Cytosolic flagellin-induced lysosomal pathway regulates
inflammasome-dependent and -independent macrophage responses**

Cytosolic flagellin-induced lysosomal pathway regulates inflammasome-dependent and -independent macrophage responses

Silvia L. Lage^{a,b}, Carina L. Buzzo^{a,b}, Eduardo P. Amaral^c, Kely C. Matteucci^{a,b}, Liliana M. Massis^d, Marcelo Y. Icimoto^e, Adriana Karaoglanovic Carmona^e, Maria R. D'Império Lima^c, Mauricio M. Rodrigues^{b,f}, Luis C. S. Ferreira^d, Gustavo P. Amarante-Mendes^c, and Karina R. Bortoluci^{a,b,1}

Departamentos de ^aCiências Biológicas e ^fMicrobiologia, Imunologia, e Parasitologia, e ^bCentro de Terapia Celular e Molecular, Universidade Federal de São Paulo, CEP 04044-010, São Paulo, Brazil; Departamentos de ^cImunologia e ^dMicrobiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, CEP 05508-900, São Paulo, Brazil; and ^eDepartamento de Biofísica, Universidade Federal de São Paulo, CEP 04023-062, São Paulo, Brazil

Edited by Ruslan Medzhitov, Yale University School of Medicine, New Haven, CT, and approved July 17, 2013 (received for review March 21, 2013)

NAIP5/NLRC4 (neuronal apoptosis inhibitory protein 5/nucleotide oligomerization domain-like receptor family, caspase activation recruitment domain domain-containing 4) inflammasome activation by cytosolic flagellin results in caspase-1-mediated processing and secretion of IL-1 β /IL-18 and pyroptosis, an inflammatory cell death pathway. Here, we found that although NLRC4, ASC, and caspase-1 are required for IL-1 β secretion in response to cytosolic flagellin, cell death, nevertheless, occurs in the absence of these molecules. Cytosolic flagellin-induced inflammasome-independent cell death is accompanied by IL-1 α secretion and is temporally correlated with the restriction of *Salmonella* Typhimurium infection. Despite displaying some apoptotic features, this peculiar form of cell death do not require caspase activation but is regulated by a lysosomal pathway, in which cathepsin B and cathepsin D play redundant roles. Moreover, cathepsin B contributes to NAIP5/NLRC4 inflammasome-induced pyroptosis and IL-1 α and IL-1 β production in response to cytosolic flagellin. Together, our data describe a pathway induced by cytosolic flagellin that induces a peculiar form of cell death and regulates inflammasome-mediated effector mechanisms of macrophages.

Flagellin, the monomeric subunit of flagella present in Gram-negative and Gram-positive bacteria, is one of the few protein structures that can activate both transmembrane and cytosolic pattern recognition receptors of the innate immune system. Extracellular flagellin is recognized by the transmembrane Toll-like receptor (TLR)5 (1). On the other hand, flagellin can be directly delivered into the cytosol by transport systems, such as the type III secretion system (T3SS) of *Salmonella* (2) and the type IV secretion system (T4SS) of *Legionella* (3). Once in the cytosol, flagellin is sensed by the inflammasome complex comprised of the NOD-like receptor (NLR) proteins neuronal apoptosis inhibitory protein (NAIP)5 and NLRC4 [NLR family, caspase activation recruitment domain (CARD) domain-containing 4] (2–5).

Both TLR5 and NAIP5/NLRC4 receptors recognize conserved regions of flagellin. TLR5 is thought to detect a region of flagellin located in the D1 domain (6), whereas a sequence of three leucine residues that is present in the C-terminal D0 domain of flagellin is required to activate the NAIP5/NLRC4 inflammasome (7). Despite some redundant roles that are attributed to NLRC4 and NAIP5 in flagellin-mediated macrophage activation (7), a new model for NAIP5/NLRC4 inflammasome activation in response to flagellin was recently proposed (8, 9). In this model, NAIP5 acts as an immune sensor protein that specifically binds to flagellin (9). The interaction between NAIP5 and flagellin promotes the recruitment of NLRC4 through the NOD domain. The formation of this protein complex leads to the association of NLRC4 with procaspase-1 via CARD-CARD interactions. Additionally, NLRC4 can recruit the adaptor protein ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a

caspase recruitment domain), which also contains a CARD domain and is able to recruit and process procaspase-1.

Caspase-1 activation results in the cleavage and secretion of biologically active forms of the inflammatory cytokines interleukin (IL)-1 β and IL-18 (10) and the induction of a form of cell death named pyroptosis (11). The activation of caspase-1 in response to cytosolic flagellin by the NAIP5/NLRC4 inflammasome complex can also induce other effector mechanisms to restrict infections, such as caspase-7-dependent phagosome maturation (4, 12) and the activation of inducible nitric oxide synthase (iNOS) by macrophages (13). Both of these effector mechanisms lead to the inhibition of *Legionella pneumophila* replication. Importantly, caspase-1-induced IL-1 β and IL-18 are not involved in phagosome maturation (4, 12), induction of pyroptosis (14), or iNOS activation (13), suggesting that caspase-1 mediates independent effects that cooperate to clear infections.

Although the NAIP5/NLRC4 inflammasome complex is involved in the control of many bacterial infections, such as infection with *Salmonella* Typhimurium (2, 5), *Shigella flexneri* (15), *Pseudomonas aeruginosa* (16, 17), *L. pneumophila* (3, 4), and *Listeria monocytogenes* (18), the precise effector mechanism mediated by these receptors is not completely understood. Among the NAIP5/NLRC4 inflammasome-mediated effector

Significance

This study describes a unique form of cell death induced by a cytosolic flagellin that does not require NLRC4 (nucleotide oligomerization domain-like receptor family, caspase activation recruitment domain domain-containing 4), ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain), or caspase-1/11 but is regulated by lysosomal cathepsins B and D. Inflammasome-independent cell death is characterized by loss of membrane integrity and IL-1 α secretion and participates in the clearance of *Salmonella* Typhimurium by macrophages. Lysosomal pathway activated by flagellin also regulates inflammasome-dependent responses such as IL-1 β and IL-1 α secretion and pyroptosis. Together, our data identify a pathway induced by cytosolic flagellin that cooperates with inflammasomes to the clearance of infections.

Author contributions: K.R.B. supervised the project; S.L.L., G.P.A.-M., and K.R.B. designed research; S.L.L., C.L.B., E.P.A., K.C.M., and M.Y.I. performed research; L.M.M., M.Y.I., A.K.C., L.C.S.F., and K.R.B. contributed new reagents/analytic tools; S.L.L., C.L.B., E.P.A., A.K.C., M.R.D.L., M.M.R., L.C.S.F., G.P.A.-M., and K.R.B. analyzed data; and S.L.L. and K.R.B. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

*This Direct Submission article had a prearranged editor.

¹To whom correspondence should be addressed. E-mail: kbortoluci@gmail.com.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1305316110/-DCSupplemental.

mechanisms that have been implicated with intracellular bacterial replication control, pyroptosis has received great attention.

Pyroptosis has been described as a programmed cell death pathway that uniquely depends on caspase-1 (19). Recently, it was demonstrated that the enteric pathogenic bacteria *Escherichia coli*, *Citrobacter rodentium*, and *Vibrio cholerae* and the cholera toxin B subunit can trigger the activation of a noncanonical inflammasome that targets caspase-11 (also known as caspase-4 in humans and related to caspase-1) (20). These stimuli induce cell death in a caspase-11-dependent fashion, but the process is not dependent on ASC, NLRC4, or caspase-1. Interestingly, this process of cell death (also named pyroptosis) is accompanied by the secretion of IL-1 α but not by the secretion of IL-1 β (which requires caspase-1). Importantly, the 129 mouse strain that was used to generate the first caspase-1 $^{-/-}$ mutants (21, 22) harbors a mutation in the caspase-11 locus that impairs caspase-11 function. Because of the close proximity in the genome between the caspase-1 and caspase-11 genes, the two proteins cannot be segregated by recombination. Therefore, these caspase-1 $^{-/-}$ mice are also defective for caspase-11 (20).

Importantly, although pyroptosis is regulated by caspase activation, similarly to apoptosis, inhibition of or genetic deficiency in apoptotic caspase does not rescue cells from pyroptosis (11, 23). In addition, pyroptosis and apoptosis provide distinct outcomes for the immune response, which may be explained by the different morphological and biochemical changes that are observed in cells undergoing these forms of cell death (24, 25). Activation of caspase-1/11 results in the rapid formation of pores in the plasma membrane that dissipate cellular ionic gradients. This process allows the influx of water into the cells, resulting in cell swelling, osmotic lysis, and the release of intracellular contents (25, 26). The loss of plasma membrane integrity and the secretion of inflammatory mediators during pyroptosis, including IL-1 β and IL-18, results in the induction of a strong inflammatory response (27). The inflammatory milieu produced by pyroptosis could result in the recruitment of effector cells to the site of infection as a mechanism of pathogen clearance. Recently, it was demonstrated that the ectopic expression of the *Salmonella* flagellin protein FliC during the intracellular phase of infection triggers pyroptosis of infected cells in vivo (14). The bacteria released by the pyroptotic macrophages were controlled by infiltrating neutrophils through a reactive oxygen species-dependent mechanism.

Despite the evidence implicating pyroptosis as an important host defense mechanism to clear intracellular pathogens, the molecular regulation of pyroptosis is poorly understood. Here, we analyzed the regulation of macrophage death using purified flagellin as a single, death-inducing stimulus. Our data demonstrate that cytosolic flagellin is able to induce cell death in the absence of caspase-1/11. Although displaying some apoptotic features, such as cell shrinkage and the formation of membrane blebs, cytosolic flagellin-induced caspase-1/11-independent cell death does not require apoptotic caspases but depends on lysosomal events. Similar to pyroptosis, cytosolic flagellin-induced caspase-1/11-independent cell death results in the release of intracellular inflammatory contents. Caspase-1/11-independent cell death also contributes to the control of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*Salmonella* Typhimurium) infection by macrophages, supporting the existence of an effector mechanism important to restrict bacterial infection. Finally, our data provide evidences that lysosomal cathepsins also regulate IL-1 β secretion and pyroptosis in response to cytosolic flagellin. Taken together, our results suggests lysosome events as a central regulator of both inflammasome-dependent and inflammasome-independent macrophage responses induced by cytosolic flagellin.

Results

Purified Flagellin Protects both Wild-Type and TLR5-Deficient Mice from Flagellin-Deficient *Salmonella* Typhimurium Infection. Recent studies have suggested that flagellin-induced pyroptosis controls the infection of virulent bacteria, such as *L. pneumophila* and *Salmonella* Typhimurium (14). To investigate this phenomenon in more detail, we inoculated the *Salmonella* Typhimurium flagellin-expressing 1412 strain (ST) and flagellin-deficient 2157 strain (ST Δ Fli) in wild-type (WT) and TLR5 $^{-/-}$ mice and evaluated the number of colony-forming units (CFUs) recovered after 6 h from the peritoneal cavity (PEC). Recognition of flagellin was involved in the protection, since a higher bacterial load was found when mice were infected with ST Δ Fli strain (Fig. 1A, black boxes) in comparison with ST (Fig. 1A, white boxes). Surprisingly, the i.p. inoculation of purified flagellin from *Salmonella* Typhimurium, 3 h after infection with ST Δ Fli strain, significantly reduced the bacterial load in PECs of both WT and TLR5 $^{-/-}$ mice, suggesting that a mechanism dependent on flagellin but independent of TLR5 can operate to clear *Salmonella* Typhimurium infection in mice (Fig. 1A, gray boxes).

Because inoculation of mice with purified flagellin potentially stimulates both TLR5 and NLRC4-dependent responses (28), we decided to investigate the relative contribution of these receptors to macrophage responses to flagellin. Peritoneal macrophages (PMs) were stimulated with 1, 3, or 6 μ g/mL (correspondent to 0.3, 1, or 2 $\times 10^{-7}$ M) of purified flagellin from *Bacillus subtilis* (FLA-BS) or with FLA-BS inserted into cationic lipid vesicles, which permits the delivery of the flagellin into the cellular cytosol (FLA-BSDot). Free flagellin is thought to activate TLR5, whereas cytosolic flagellin is believed to activate NAIP5/NLRC4 receptors (2, 13). As expected, only treatment with cytosolic flagellin induced the secretion of IL-1 β by macrophages (Fig. S1A), whereas IL-6 was only observed when macrophages were treated with free flagellin (Fig. S1B). Additionally, death in PM was also only observed when cells were treated with cytosolic flagellin, as assessed by LDH release (Fig. S1C), 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay (Fig. S1D), and loss of vital acridine orange (AO) dye in combination with ethidium bromide (EtBr) incorporation (Fig. S1E). All of these responses occurred in a dose-dependent manner. Being derived from a Gram-positive bacterial species devoid of lipopolysaccharide (LPS) in the cell envelope, flagellin from *B. subtilis* was used to prevent any interference of LPS in treated cells. Moreover, similar levels of IL-1 β were found in WT and TLR2 $^{-/-}$ PMs culture after stimulation with cytosolic flagellin, discarding the interference of any contamination with TLR2 ligands in flagellin preparations (Fig. S2A). Cell death (Fig. S2B) and IL-1 β production (Fig. S2C) were also observed when cells were treated with purified *Salmonella* Typhimurium FliC flagellin (FliCdot) but not when cells were treated with the peptide of *Plasmodium vivax* VK210 circumsporozoite protein (pepVK210Dot) trapped into lipid vesicles. Similarly to purified native *Salmonella* Typhimurium FliC flagellin, a recombinant flagellin produced in an *E. coli* strain (BL21DE) (rFliCdot) also induced macrophage death (Fig. S2B) and IL-1 β production (Fig. S2C). In contrast, these responses were not obtained with a recombinant p24 protein from HIV (rp24Dot), produced in the same *E. coli* strain and purified by the same nickel-affinity chromatography, discarding the influence of nonspecific cytotoxic effects of flagellin preparations. Of note, the purity of flagellin preparations is similar (Fig. S2D), and all proteins were inserted into N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium methyl-sulfate (DOTAP) and used in similar concentrations. These results indicate that only intracellular flagellin is capable of inducing macrophage responses, suggesting a role for inflammasome activation in cell viability. Finally, MyD88 $^{-/-}$ and WT PMs displayed similar morphology (Fig. S2E) and similar levels

Fig. 1. Cell death induced by cytosolic flagellin occurs in the absence of the NLRC4/ASC-caspase-1/11 axis. (A) CFU numbers recovered from the peritoneal cavity of C57BL/6 and TLR5-deficient mice infected with the flagellin-proficient *Salmonella* Typhimurium 1412 strain (ST WTfli) or the flagellin deficient *Salmonella* Typhimurium 2157 strain (ST Δfli) (5×10^3 bacteria per mouse) or the ST Δfli strain plus purified FliC (ST Δfli + FliC). Numbers represent the means $\pm$ SEM ($n = 3$ per group). * $P < 0.05$ compared with ST Δfli-infected group. (B and C) IL-1 β levels from supernatants of PMs stimulated with purified *B. subtilis* flagellin trapped into DOTAP (FLA-BSDot) (3 μ g/mL) for 6 h were determined by ELISA (C). Numbers represent the means $\pm$ SEM ($n = 2$). *** $P < 0.001$ compared with knockout groups. (D) LDH levels quantified in culture supernatants after 6 h using a LDH kit. Numbers represent the means $\pm$ SEM ($n = 2$). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ compared with WT group. (E) Cytotoxicity assessed as the percentage of EtBr single-positive cells in fluorescence micrographs according to AO/EtBr staining. Numbers represent the means $\pm$ SEM of at least seven images per treatment. *** $P < 0.001$ compared with control group; *** $P < 0.001$ compared with WT group. (F) Representative micrographs of FLA-BSDot-stimulated PMs at 6 h. AO-stained PMs (green) show viable cells in each field, and EtBr (red) indicates permeabilized PMs. At right are merged images. Micrographs represent an original magnification of 400 $\times$. All data are representative of four (C57BL/6:00 PMs vs. caspase-1/11 $^{-/-}$ PMs) or two independent experiments.

of LDH liberation (Fig. S2F) when stimulated with cytosolic flagellin. These data eliminate the possibility that the MYD88 pathway participates in cytosolic flagellin-induced cell death.

Caspase-1/11, NLRC4, and ASC Are Not Required for Cytosolic Flagellin-Induced Cell Death. Currently, it is thought that after exposure to cytosolic flagellin, caspase-1 is recruited to the NAIIP5/NLRC4 inflammasome complex, where it is activated. The ASC adaptor molecule may or may not participate in this process (5, 7, 29). IL-1 β production by PM from C57BL/6 WT mice in response to cytosolic flagellin increased over time in culture, peaking at 6 h (Fig. 1B). Using caspase-1/11-deficient (Fig. 1B), NLRC4-deficient, and ASC-deficient (Fig. 1C) cells, we observed that the cytosolic flagellin-mediated secretion of IL-1 β was dramatically reduced in the absence of these molecules, thus confirming their requirement for the secretion of IL-1 β in response to cytosolic flagellin. Low levels of LDH were released by NLRC4 $^{-/-}$ and caspase-1/11 $^{-/-}$ macrophages in comparison with WT and ASC $^{-/-}$ macrophages 1–3 h after cytosolic flagellin stimulation (Fig. 1D). However, the levels of LDH released from cytosolic flagellin-stimulated WT and caspase-1/11 $^{-/-}$ PM was similar 6 h after stimulation (Fig. 1D). Surprisingly, although less pronounced compared with the cell death observed in WT and ASC $^{-/-}$ cultures, a high frequency of macrophage death after cytosolic flagellin stimulation was also observed in the absence of NLRC4 and caspase-1/11, as assessed by loss of vital AO dye in combination with EtBr incorporation (Fig. 1E and F). Similar results were observed when 6 μ g/mL of cytosolic flagellin was used for stimulation (Fig. S3A–C) and with

bone marrow-derived macrophages (BMDMs) (Fig. S3D and E). It is noteworthy that BMDM are not able to release IL-1 β in response to cytosolic flagellin in the absence of priming with TLR ligands, in contrast to observed with starch-elicited PMs (Fig. 1B and C). Elicited PMs are composed mainly by newly recruited macrophages originated from inflammatory monocytes, which could present basal levels of pro-IL-1 β because they hold a constitutively activated form of caspase-1 (30, 31). Taken together, these data indicate that whereas IL-1 β secretion is dependent on NLRC4, ASC, and caspase-1/11, cytosolic flagellin-induced cell death occurs in the absence of these molecules.

Flagellin Induces Inflammasome-Dependent Pyroptosis and Inflammasome-Independent Cell Death, both Contributing to the Clearance of *Salmonella* Typhimurium. We then evaluated cell death in WT and caspase-1/11 $^{-/-}$ PMs that were infected with the ST and ST Δfli. Of note, the plates were centrifuged at 290 $\times g$ for 10 min to enable the same rate of ingestion of the two *Salmonella* Typhimurium strains by the macrophages, overcoming the absence of flagellum in ST Δfli, as described previously (2). At 1 h postinfection, a higher frequency of cell death was observed in WT PMs compared with caspase-1/11 $^{-/-}$ PM (Fig. 2A). The early caspase-1/11-dependent cell death appeared to be dependent on the presence of flagellin because infection of WT macrophages with the ST induced a higher frequency of PMs death compared with infection with ST Δfli strain (Fig. 2B and C). Flagellin-dependent death was reduced and displayed slower kinetics after infection ST in caspase-1/11 $^{-/-}$ PMs (Fig. 2A–C), as demonstrated

previously by cytosolic flagellin stimulation. Early caspase-1/11-dependent cell death was correlated with a reduction in the number of CFUs observed in WT PMs compared with caspase-1/11^{-/-} PMs (Fig. 2D). These data confirm the role of early caspase-1/11-dependent pyroptosis in the control of *Salmonella* Typhimurium infection by macrophages. Importantly, however, recognition of flagellin also conferred protection in a caspase-1/11-independent manner, because significantly higher numbers of CFUs were found in caspase-1/11^{-/-} macrophages infected with the ST Δ Fli strain with regard to PMs infected with the ST strain (Fig. 2D). Moreover, adding cytosolic flagellin during infection with ST Δ Fli strain resulted in a marked increase in cell death (Fig. 2E) and a decrease in the numbers of CFUs (Fig. 2F) found in macrophages

from caspase-1/11^{-/-}, as well as WT mice, corroborating our previous in vivo data (Fig. 1A). Altogether, these data indicate that both flagellin-induced caspase-1/11-dependent pyroptosis and caspase-1/11-independent cell death participate in the clearance of *Salmonella* Typhimurium by macrophages.

Flagellin-Induced, Caspase-1/11-Independent Cell Death Displays Apoptotic Features but Does Not Rely on Caspase Activity.

To evaluate the morphological and biochemical features of caspase-1/11-independent macrophage death, cell morphology after stimulation with cytosolic flagellin was assessed. One hour after stimulation, WT PMs were permeable to EtBr before the loss of vital AO staining (Fig. S4A). These data are indicative of the formation of pores in the plasma membrane (26, 32). Double staining with AO/EtBr was not observed in caspase-1/11^{-/-} macrophages (Fig. S4A). Giemsa-stained slides indicated that the majority of WT PM appeared to be swelled compared with caspase-1/11^{-/-} PMs that seemed to have a reduction in volume (Fig. S4B). Moreover, time-lapse, phase-contrast images indicated a higher frequency of swollen cells in WT PM that increase in size over time, resulting in the accumulation of cellular debris (Fig. 3A). Despite the presence of cells with a similar morphology compared with WT PMs, we found that the majority of caspase-1/11^{-/-} PMs died with apoptotic characteristics, which included the loss of cell volume and the formation of membrane blebs (Fig. 3A). The flagellin-induced caspase-1/11-independent cell death closely resembled apoptotic cells (Fig. S4C). To determine whether macrophages stimulated with cytosolic flagellin are biased toward apoptotic cell death in the absence of NLRC4 or caspase-1/11, we compared the flagellin-induced caspase-1/11-independent cell death to actinomycin D (ActD)-induced apoptosis. Of note, ActD treatment induced the same frequency of cell death (Fig. S4D, black bars) and hypodiploid nuclei (Fig. S4E, center graphs, and Fig. S4F, black bars) in both WT and caspase-1/11^{-/-} PMs. These data demonstrate that the lack of caspase-1/11 did not interfere with the apoptotic program of cell death. The frequency of hypodiploid nuclei observed 3 h after stimulation with cytosolic flagellin is strongly reduced in the absence of caspase-1/11 (Fig. 3B), demonstrating the involvement of caspase-1/11 in DNA fragmentation that occurs in response to cytosolic flagellin. However, a decrease in full-length caspase-3, which is associated with the appearance of the active, cleaved 17/19-kDa caspase-3, was observed only in ActD-treated WT, caspase-1/11^{-/-}, and NLRC4^{-/-} macrophages but not in any of cytosolic flagellin-treated WT, caspase-1/11^{-/-}, and NLRC4^{-/-} cells (Fig. 3C). The involvement of cytosolic flagellin in the activation of apoptotic caspase-7 and caspase-9 were also investigated using a fluorimetric assay. ActD-treated WT or caspase-1/11^{-/-} macrophages displayed caspase-7 (Fig. 3D) and caspase-9 (Fig. 3E) activation that was abrogated by the addition of z-VAD-fmk and LEHD-fmk (pan-caspase and caspase-9 inhibitors, respectively). In contrast, activation of caspase-7 or caspase-9 was not observed in response to cytosolic flagellin stimulation (Fig. 3D and E), suggesting that the apoptotic machinery is not involved in cytosolic flagellin-induced cell death. According to these data both, AO loss (Fig. S4B, white bars) and the formation of hypodiploid nuclei (Fig. S4C, right graphs, and Fig. S4D, white bars) induced by ActD were strongly inhibited by Q-VD-fmk, a pan-caspase inhibitor. In contrast, Q-VD-fmk did not interfere with cell death in cytosolic flagellin-stimulated caspase-1/11^{-/-} (Fig. 3F) and NLRC4^{-/-} macrophages (Fig. 3G), as measured by AO/EtBr staining. Thus, the absence of apoptotic caspase activation and the lack of caspase interference in cytosolic flagellin-induced cell death indicate that caspase-1/11^{-/-} PMs did not have a bias toward the classical apoptotic program of cell death.

Fig. 2. Flagellin-induced caspase-1/11-independent cell death contributes to the control of *Salmonella* Typhimurium infection. (A) Cytotoxicity assessed in WT and caspase-1/11-deficient PMs infected with *Salmonella* Typhimurium 1412 strain (St WTfli) or *Salmonella* Typhimurium 2157 strain (St Δ Fli) [multiplicities of infection (MOI), 5:1], as the percentage of EtBr single-positive cells in fluorescence micrographs according to AO/EtBr staining. Numbers represent the means $\pm$ SEM ($n = 3$). *** $P < 0.001$ compared with the caspase-1/11^{-/-} group. Data are representative of three independent experiments. (B) Representative micrographs of stimulated PMs at 3 h. AO-stained PMs (green) show viable cells in each field, and EtBr (red) indicates permeabilized PMs. Micrographs represent an original magnification of 400 $\times$. (C) Cytotoxicity assessed as the percentage of EtBr single-positive cells in fluorescence micrographs according to AO/EtBr staining of St WTfli-stimulated PMs at 3 h. *** $P < 0.001$ compared with the St Δ Fli strain-infected group. Data are representative of three independent experiments. (D) CFUs recovered from PMs infected with St WTfli or St Δ Fli (MOI, 5:1) at 3 h. *** $P < 0.001$ compared with the ST Δ FliC-infected group. Data are representative of three independent experiments. (E) Cytotoxicity assessed as the percentage of EtBr single-positive cells in fluorescence micrographs according to AO/EtBr staining of PMs infected with the St Δ FliC strain (MOI, 5:1) concomitantly treated (open symbols) or not with FliCdot (closed symbols). Data are representative of two independent experiments. (F) The number of CFUs recovered from the peritoneal cavity of mice infected with Δ FliC strain (MOI, 5:1) in the presence or absence of FliCdot. Numbers represent the means $\pm$ SEM ($n = 3$). Data are representative of two independent experiments.

Fig. 3. Cell death induced by cytosolic flagellin is independent of caspase activity and culminates in IL-1 α release. (A) The cell morphology of FLA-BSDot-stimulated PMs (3 μ g/mL) accompanied in phase contrast microscopy for 3.5 h. Micrographs represent an original magnification of 400 $\times$. Data are representative of three independent experiments. (B) Percentage of hypodiploid nuclei evaluated by flow cytometry according to PI incorporation in FLA-BSDot- or empty DOTAP-treated PMs at 3 h. Numbers represent the means $\pm$ SEM ($n = 3$). *** $P < 0.001$ compared with the WT group. (C) Western blot analysis for caspase-3 activation in BMDMs stimulated with FLA-BSDot (6 μ g/mL) or ActD (5 μ g/mL) at 6 h. Activation of caspase-3 was determined by decrease in the full-length caspase-3 (35 kDa) associated with the appearance of the cleaved 17/19-kDa caspase-3. (D and E) Fluorimetric assay for caspase-7 (D) and caspase-9 (E) activity in FLA-BSDot or ActD-treated PMs at 4 h. Cell-free extracts were incubated with caspase-7 or caspase-9 fluorimetric substrates in the presence or absence of specific caspase inhibitors. Numbers represent the means $\pm$ SEM ($n = 3$). Results represent relative fluorescence units (RFU). (F and G) Cytotoxicity assessed as the percentage of EtBr single-positive cells in fluorescence micrographs according to AO/EtBr staining in PMs stimulated with FLA-BSDot (3 μ g/mL). Cells were treated or not with Q-VD-fmk (20 μ M) 1 h prior to stimulation. Numbers represent the means $\pm$ SEM ($n = 3$). (H) Cytotoxicity in PMs stimulated with FLA-BSDot (6 μ g/mL) or ActD (5 μ g/mL). Numbers represent

Caspase-1/11-Independent Cell Death Induced by Cytosolic Flagellin Retains an Inflammatory Outcome Characterized by the Release of IL-1 α . Despite displaying some apoptotic features, almost 40% of caspase-1/11^{-/-} PMs that were stimulated with cytosolic flagellin were permeable to EtBr at 3 h, whereas almost all ActD-treated cells remained impermeable (Fig. 3H). In comparison, up to 12 h after ActD treatment, a high frequency of ActD-treated PM from both WT and caspase-1/11^{-/-} mice lost vital AO but remained impermeable to EtBr, indicating that these cells died but did not lose plasma membrane integrity. Importantly, even less than WT cells, cytosolic flagellin-stimulated caspase-1/11^{-/-} PMs released large amounts of IL-1 α (Fig. 3I), which is a known damage signal released by necrotic cells (33). In contrast, apoptotic cell death induced by ActD did not result in IL-1 α release, even after 24 h of stimulation (Fig. 3I), when almost all cells were already dead, consistent with the idea that apoptotic cells retain these molecules within apoptotic bodies. These data demonstrate that cytosolic flagellin-induced caspase-1/11-independent cell death retains the same inflammatory outcome as the classical caspase-1/11-dependent pyroptosis, both characterized by the loss of cell integrity and release of intracellular proinflammatory contents, corroborating with the idea that cytosolic flagellin does not activate the classic apoptotic machinery in the absence of caspase-1/11.

Lysosomal Cathepsins Regulate Caspase-1/11-Dependent and -Independent Macrophage Responses to Cytosolic Flagellin. Given the peculiar features displayed by caspase-1/11-deficient dying cells after cytosolic flagellin stimulation, we investigated the participation of alternative cell death mechanisms. Lysosomal membrane permeabilization (LMP) induced by a variety of stimuli activates a programmed cell death process independent of the classical apoptotic machinery (34–36). This unusual form of cell death induces a mixed necrotic or subapoptotic semblance (37), similar to what we observed in caspase-1/11-independent cell death induced by cytosolic flagellin. To investigate the ability of cytosolic flagellin to induce loss of lysosomal acidity, a hallmark of lysosomal damage, we analyzed macrophages in accordance to AO staining upon flagellin stimulation. AO is a cell permeable dye with lysosomotropic properties that accumulate within acidic lysosomes. When elicited by blue light, the fluorescence emitted by AO varies from red (at high concentrations in the intact acidic lysosomes) to green (under low concentrations in the cytosol or nucleus) (37–39). A large number of spots with bright green fluorescence were observed in both WT and caspase-1/11^{-/-} PMs a few minutes after stimulation with cytosolic flagellin (Fig. 4A) but not with empty DOTAP or medium (Fig. S5A). Because the appearance of a high green AO fluorescence indicates the disruption of lysosomes filled with AO, which then disperse diffusely through the cell cytosol (37–39), our data suggest that cytosolic flagellin can induce loss of lysosomal membrane integrity and leakage of the lysosomal contents into the cell cytosol. The lysosomal damage was likely to be a result of the transfection with cytosolic flagellin but not the transfection of any protein, because a similar staining pattern was observed with FliC flagellin from *Salmonella* Typhimurium inserted into DOTAP but not with other proteins such as VK210 and rp24 also inserted into DOTAP (Fig. S5A). These results indicate that different preparations of flagellin induced the same effect on macrophages death, in contrast to that observed with nonrelated proteins.

the means $\pm$ SEM of at least five images per treatment. *** $P < 0.001$ compared with the Act-D group. (I) IL-1 α levels from supernatants of PMs stimulated with FLA-BSDot (3 μ g/mL) or ActD (5 μ g/mL) were determined by ELISA *** $P < 0.001$ compared with the knockout group. Data are representative of two independent experiments.

Fig. 4. Major role for lysosomal permeability in flagellin-induced macrophage death. (A) Representative fluorescence micrographs of PMs stimulated with FLA-BSDot (3 µg/mL) and stained with AO/EtBr. (Left) Cells with high cytoplasmic green fluorescence. (Center and Right) AO-stained PMs with decreased intensity in cytoplasmic green fluorescence. Micrographs represent an original magnification of 400 $\times$. (B–E) Cytotoxicity assessed as the percentage of EtBr single-positive cells in fluorescence micrographs in PMs stimulated with FLA-BSDot (3 µg/mL). Cells were pretreated or untreated with the lysosomal acidification inhibitor bafilomycin A1 (20 nM) (B), cathepsin B inhibitor CA074-Me (25 µM) (C), cathepsin D inhibitor pepstatin A (25 µM) (D) or both CA074-Me and pepstatin A (E), 1.5 h prior stimulation. Numbers represent the means $\pm$ SEM of at least 15 images per treatment. *** P < 0.001 compared with the pretreated group. Data are representative of two independent experiments.

The presence of bafilomycin A1, which specifically inhibits a vacuolar H⁺-ATPase (V-ATPase), preventing lysosomal acidification, abolished cytosolic flagellin-induced cell death in caspase-1/11^{-/-} macrophages (Fig. 4B). Moreover, the presence of bafilomycin also had a significant inhibitory effect on cell death in WT macrophages stimulated with cytosolic flagellin, which suggests the involvement of lysosomal pathways in both pyroptosis and caspase-1/11-independent cell death induced by cytosolic flagellin. To further examine the role of lysosomal pathways in the regulation of cell death induced by cytosolic flagellin, the involvement of lysosomal cathepsins B and D was evaluated by the addition of the selective inhibitors, N-(L-3-*trans*-propylcarbonyl-oxirane-2-carbonyl)-L-isoleucyl-L-proline methyl ester (CA074-Me) and pepstatin A, respectively. No significant effect on the levels of cell death induced by cytosolic flagellin in both WT and caspase-1/11^{-/-} macrophages was observed in the presence of CA074-Me (Fig. 4C) or pepstatin A alone (Fig. 4D). However, when added together, cell death was halved in both WT and caspase-1/11^{-/-} macrophages (Fig. 4E), indicating a redundant role for cathepsins B and D during cytosolic flagellin-induced cell death. Despite lysosomal disruption and cathepsin B release are associated with NLRP3 inflammasome activation (40, 41), cytosolic flagellin-stimulated NLRP3^{-/-} macrophages displayed similar frequencies of dead cells (Fig. S5D) and IL-1 α release (Fig. S5E) compared with WT macrophages, ruling out the participation of NLRP3 in lysosomal-mediated inflammatory cell death induced by cytosolic flagellin.

Interestingly, the presence of CA074-Me during cytosolic flagellin stimulation significantly inhibited caspase-1-dependent IL-1 β production (Fig. 5A). The inhibition of cathepsin B also reduced IL-1 α production by WT macrophages, at levels similar to those released by caspase-1/11^{-/-} cells (Fig. 5B), suggesting that cathepsin B might regulate caspase-1/11 activities in response to cytosolic flagellin. In contrast to the effect of CA074-Me, the presence of pepstatin A did not affect IL-1 β (Fig. 5C) or IL-1 α (Fig. 5D) production in response to the stimulation with cytosolic flagellin, which suggests that cathepsin B may have a major role in the regulation of caspase-1-dependent IL-1 β production and partially caspase-1/11-dependent IL-1 α secretion in response to cytosolic flagellin. It is noteworthy that CA074-Me inhibitor is broadly accepted as a "specific" inhibitor of cathepsin B (40, 42, 43). However, some findings obtained with CA074-Me are not reproduced in cathepsin B knockout cells (41). In addition, because it has been demonstrated that caspase inhibitors can interact with cathepsin B, thus inhibiting its activity (44), we tested the possibility of the cross-reactivity between CA074-Me and recombinant caspase-1. As shown in Fig. 5E, CA074-Me was not able to directly inhibit caspase-1 activity, whereas inhibited cathepsin B activity in a dose-dependent manner,

Fig. 5. Lysosomal cathepsins regulate cytokine production in response to cytosolic flagellin. IL-1 β (A and C) or IL-1 α (B and D) levels from supernatants of PMs stimulated with 3 µg/mL cytosolic flagellin from *B. subtilis* (FLA-BSDot) were determined by ELISA. Cells were pretreated or not with the cathepsin B inhibitor CA074-Me (A and B), cathepsin D inhibitor pepstatin A (C and D), with the indicated concentrations, 1.5 h prior to stimulation with FLA-BSDot. Data obtained in A and B are representative of two independent experiments. Numbers represent the means $\pm$ SEM (n = 2). Data obtained in C and D are shows as the mean of two independent experiments. Numbers represent the means $\pm$ SEM (n = 4). * P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001 compared with the untreated group. (E) Recombinant cathepsin B and caspase-1 were pretreated with CA074-Me and their residual activity measured and represented as means $\pm$ SEM (n = 3).

Fig. 6. The relationship between inflammasome and lysosomal pathway for cytokine production and cell death. Bacterial flagellin inserted into macrophage cytosol through T3SS/T4SS secretion systems or by lipid vesicles can induce the activation of both NAIP5/NLRC4 inflammasome complex (labeled A) and lysosomal pathway (labeled B). Cytosolic flagellin could induce lysosome rupture or LMP that permits the release of active cathepsins into cell cytosol. Inflammasome activation results in caspase-1/11-mediated pyroptosis and IL-1 β production and IL-1 α secretion. However, the inflammasome-mediated macrophages responses seem to be a result of the cross-talk between inflammasome complex and lysosomal pathway, where cathepsin B could regulate the activation of NAIP5/NLRC4 inflammasome or caspase-1 activities, because it is involved with IL-1 β production (labeled C). On the other hand, the lysosomal pathway orchestrates the cytosolic flagellin induced caspase-1/11-independent inflammatory cell death.

discarding the nonspecific effect of CA074-Me in the inhibition of caspase-1 and suggesting that the inhibition of caspase-1-dependent macrophages responses to cytosolic flagellin was a result of cross-talk between cathepsin B and caspase-1 and not an off-target effect of CA074-Me. Together, these data indicate that lysosomal events, particularly the activated cathepsins, participate in the regulation of caspase-1/11-dependent and -independent responses after cytosolic flagellin stimulation.

Discussion

Caspase-1-mediated cellular signaling induced by flagellin stimulation seems to be strictly coordinated. Activation of caspase-1 by the NAIP5/NLRC4 inflammasome complex promotes rapid formation of pore in the plasma membrane that culminates in cell swelling, osmotic lysis, and the release of the proinflammatory cytokines IL-1 β and IL-18 (11, 25). Taken together, these caspase-1-dependent events characterize the pyroptosis process. However, we show here that cytosolic flagellin also induces cell death in the absence of caspase-1/11. Cytosolic flagellin-induced caspase-1/11-independent cell death occurs with slower kinetics in comparison with pyroptosis, and dying cells have some apoptotic-like features, including loss of cell volume and the formation of structures that resemble membrane blebs. Despite the initial events that distinguish it from pyroptosis, cytosolic flagellin-induced caspase-1/11-independent cell death seems to result in the same inflammatory outcome, culminating in cell lysis with the release of intracellular contents including the proinflammatory cytokine IL-1 α . Moreover, cytosolic flagellin-induced caspase-1/11-independent cell death strongly correlated with the restriction of *Salmonella*

Typhimurium infection by macrophages and could explain the reduction of in vivo infection found in caspase-1/11 $^{-/-}$ mice after the inoculation of flagellin. Importantly, the inhibition of cathepsin B and cathepsin D reduced cytosolic flagellin-induced cell death by half, in both WT and caspase-1/11 $^{-/-}$ macrophages. In addition, IL-1 β production in response to cytosolic flagellin was abrogated in the absence of active cathepsin B. Taken together, our data indicate that cytosolic flagellin activates the lysosomal pathway that, in its turn, regulate both caspase-1/11-dependent and caspase-1/11-independent macrophages responses.

Despite the fact that flagellin may be recognized by both TLR5 and NAIP5/NLRC4 inflammasome, their individual activation results in nonredundant cellular responses. Caspase-1 activation, cytotoxicity, and release of IL-1 β have been demonstrated to proceed normally in TLR5-deficient BMDM during *Salmonella* Typhimurium infection (5). In agreement with this study, our results demonstrated that the introduction of purified flagellin from *B. subtilis* directly into the macrophage cytosol using transfection lipid vesicles (DOTAP) was sufficient to induce caspase-1-dependent IL-1 β secretion, the formation of membrane pores and the early LDH release by macrophages. These same effects were not observed when macrophages were stimulated with purified flagellin in its free form. Stimulation with free flagellin only resulted in IL-6 production because of its extracellular recognition by TLR5. Moreover, the LDH release and cell death that was induced by cytosolic flagellin were still observed when MyD88 was absent, suggesting that the TLR5, IL-1R, and IL-18R signaling pathways are not required for macrophage death.

Because flagellin-induced pyroptosis is accompanied by cell permeabilization, most studies have assessed this peculiar program of cell death by analyzing early liberation of LDH, which is indicative of a loss of cell integrity. In contrast to C57BL/6 WT PMs, LDH was not identified in NLRC4^{-/-} and caspase-1/11^{-/-} macrophage cultures early after stimulation with cytosolic flagellin. Using distinct approaches to characterize cell death, we observed that LDH liberation did not necessarily correlate with cell death. Stimulation of macrophages with a low dose of cytosolic flagellin was sufficient to induce LDH liberation but was not sufficient to induce cell death. Moreover, caspase-1/11^{-/-} macrophages lost AO dye and incorporated EtBr at 3 h after stimulation with cytosolic flagellin, but no LDH release was identified in these cultures. These data suggest that the release of cellular inflammatory contents and cell death, which are two important consequences of the recognition of cytosolic flagellin, possibly represent two independent events. The disagreement observed between the cytotoxicity assays can be explained by the nature of each assay (45). LDH release is predicted on the release and accumulation of the enzyme into the culture supernatant after a loss in plasma membrane integrity. Conversely, the EtBr/AO assay is based on the loss of acidic compartments, specifically the acidity of nuclei, in combination with an increased cell membrane permeability that permits the EtBr diffusion. Therefore, it is possible that some temporary membrane damage could lead to the release of LDH without inducing cell death. Conversely, other intracellular events could culminate in a loss of AO staining before any cell membrane damage that would allow the liberation of LDH. Therefore, the techniques that are used to characterize cell death can be misinterpreted when used alone. Here, we determined that caspase-1/11 is not required for cell death in response to cytosolic flagellin stimulation as proposed previously (19, 24).

Caspase-1/11-dependent pyroptosis has been described as an important effector mechanism to clear bacterial infections (19, 46). It is believed that the death of infected macrophages by this pathway results in the loss of a replication niche for the infecting bacteria and exposes the bacteria to an inflammatory microenvironment that is optimized for the control of bacterial replication. Miao and his collaborators (14) provided the first in vivo evidence to suggest that pyroptosis could be a host defense mechanism to clear intracellular pathogens. They demonstrated that the induction of flagellin expression during *Salmonella* Typhimurium infection led to NLRC4-dependent pyroptosis, which resulted in the exposure of the released bacteria to infiltrating neutrophils. The bacteria were then killed by the production of reactive oxygen species. Although there was not a direct correlation between cell death and neutrophils-mediated killing in caspase-1/11^{-/-} mice, the authors showed that caspase-1/11^{-/-} mice were more permissive to *Salmonella* Typhimurium infection compared with WT mice (14). Our experiments demonstrated that the i.p. inoculation of flagellin significantly reduces the bacterial load in WT and TLR5^{-/-} mice, indicating that flagellin induces the control of in vivo infection by a mechanism independent of TLR5. Then, we hypothesize that the flagellin-dependent control of *Salmonella* infection by caspase-1/11^{-/-} macrophages is correlated with caspase-1/11-independent cell death. In fact, caspase-1/11^{-/-} macrophages underwent flagellin-dependent cell death in vitro during infection with *Salmonella* Typhimurium. The slow kinetics of caspase-1/11-independent cell death was likely related to the higher number of CFUs observed in caspase-1/11^{-/-} macrophages compared with WT cells. However, caspase-1/11^{-/-} macrophages were more susceptible to flagellin-deficient *Salmonella* Typhimurium compared with flagellin-sufficient *Salmonella* Typhimurium. Finally, the stimulation of both WT and caspase-1/11^{-/-} macrophages with cytosolic flagellin significantly reduces the infection of flagellin-deficient *Salmonella* Typhimurium in both macrophages. Most importantly, this

reduction is temporally correlated with the induction of cell death, which corroborates our hypothesis.

In contrast to proIL-1 β , proIL-1 α is not a caspase-1 substrate and does not require processing to allow receptor binding (47). However, the role of caspase-1 in the regulation of IL-1 α release is still a matter of debate (21, 33, 48). Recently, it was demonstrated that for most NLRP3 soluble activators, including ATP and nigericin, the release of IL-1 α was dependent on NLRP3, ASC, and caspase-1 (49). However, the ability of caspase-1 in controlling IL-1 α secretion occurs independently of its protease activity. In contrast, some particles or crystals such as silica and MSU induced processing and secretion of IL-1 α in a manner independently of inflammasome. In our hands, the secretion of IL-1 α in response to cytosolic flagellin seems to be partially dependent on caspase-1 because caspase-1/11^{-/-} macrophages is able to release IL-1 α , but with levels significantly lower in comparison with that found in WT macrophages cultures. The secretion of IL-1 α , in vivo, was equally or more important than the secretion of IL-1 β to induce IL-6 production and neutrophil recruitment during model of peritonitis induced by MSU (49). Therefore, cell injury that is concomitant to the release of IL-1 α could be an important consequence of flagellin-induced caspase-1/11-independent cell death that contributes to the inflammatory milieu at the site of bacterial infection.

Interestingly, cytosolic flagellin-stimulated macrophages displayed some apoptotic characteristics in the absence of caspase-1/11 and NLRC4, such as loss in cell volume and the membrane blebbing. These results suggest the possibility that, in the absence of inflammasome activation, macrophages could have a bias toward apoptotic program of cell death. In fact, it was demonstrated that in the absence of caspase-1, dying *Salmonella*-infected macrophages could exhibit apoptotic or even autophagic features (50, 51). Chromatin condensation and DNA breakage observed in the absence of caspase-1 is mediated by caspase-2 and requires the SipB protein from *Salmonella*. However, cytosolic flagellin-induced caspase-1/11-independent cell death seems to be regulated by a pathway distinct from classical apoptosis. Conversely to ActD-induced apoptosis, caspase-1/11-independent cell death induced by cytosolic flagellin resulted in the loss of cell integrity, observed by the entry of EtBr and in the release of intracellular contents few hours after stimulation, thus maintaining a necrotic outcome (33). Moreover, cytosolic flagellin did not activate apoptotic caspases 3, 7, and 9 and the broad pharmacological inhibition of caspases did not modify the kinetics or outcome of cytosolic flagellin-induced cell death in the absence of caspase-1/11. Despite the independency of caspases, cytosolic flagellin-induced caspase-1/11-independent cell death is abrogated in the presence of bafilomycin, which suggests the involvement of the lysosomal pathway. Concomitant inhibition of cathepsin B and cathepsin D have a significant negative effect on cytosolic flagellin-induced cell death, which indicates a redundant role of these two proteins and supports the involvement of lysosomal damage-mediated program of cell death. Thus, our work adds a flagellin-mediated mechanism by which *Salmonella* Typhimurium can kill the infected macrophage in the absence of caspase-1 and caspase-11.

It is well established that moderate lysosomal damage with slow liberation of lysosomal hydrolases into the cell cytosol can culminate in controlled lysosome-mediated apoptotic cell death (37). Once in cytosol, cathepsins B and D can induce apoptosis in a synergistic manner by simultaneously cleavage of the proapoptotic protein Bid, and the antiapoptotic members of Bcl-2 family, like Bcl-2, Bcl-xL, Ncl-1e, and XIAP (52–56). According to this, the early cell shrinkage and formation of membrane blebs observed in cytosolic flagellin-stimulated caspase-1/11^{-/-} macrophages and that resembles apoptosis could be a result of the activation of the apoptotic machinery by lysosomal cathepsins into cell cytosol. However, different from apoptotic cells,

cytosolic flagellin-stimulated caspase-1/11^{-/-} macrophages undergo rapid loss of membrane integrity, which is consistent with a massive induction of lysosomal membrane permeability and consequent loss of organelle membrane integrity (37). This lysosomal damage-mediated cell death program commonly results in uncontrolled necrotic cell death without apoptotic caspase activation where macrophages exhibit promiscuous features of apoptosis and necrosis, consistent with our observations. The mechanism by which flagellin induces massive loss of lysosome membrane integrity has yet to be elucidated. Therefore, the fact of distinct flagellin preparations but not other nonrelated proteins were able to induce lysosomal cell death, discard nonspecific effects of possible contaminants in preparations, and point out the unique lysosomotropic propriety of flagellin.

In our model, the lysosomal pathway has a central role in flagellin-induced cell death because the inhibition of either lysosome acidification or cathepsin B and D activation, but not the absence of caspase-1/11, suppresses cell death. In addition, because cell death occurs less prominently and with distinct characteristics in the absence of caspase-1/11, it is possible that these two proinflammatory caspases act as accessory/catalytic factors rather than being the central effector mechanism of cytosolic flagellin-induced cell death. This is reminiscent to what occurs during apoptosis, particularly after insults that triggers the intrinsic pathway, where the apoptotic effector caspases -3, -6, and -7 are also not required for cell death, but they are essential for imprinting apoptotic characteristics, such as the appearance of “eat me” or “find me” signals, DNA degradation, and inactivation of DAMPs, in cells that are already destined to die (57–59). Likewise, we propose that pyroptosis, as defined as a caspase-1/11-dependent cell death, is rather a program of cell demise capable of imprinting particular characteristics to the cells committed to die, such as the secretion of IL-1 β /IL-18.

There are few and conflicting data about the relationship between inflammasomes and lysosomal damage-mediated cell death. In some instances, LMP, a hallmark characteristic of lysosomal-mediated cell death, can occur upstream or downstream of inflammasome activation (42, 60). In other circumstances, LMP is an independent event that occurs simultaneously with caspase-1 activation, thus contributing to cell death (38). It has been described that the inhibition of cathepsin B activation abolishes caspase-1-dependent IL-1 β and IL-18 production in addition to caspase-1-independent pyroptosis that are mediated by NLRP3 inflammasome (42). Despite the similarities of the cathepsin B effects, we clearly show here that cytosolic flagellin-induced lysosomal cell death is not mediated by NLRP3. However, it is important to note that it is still possible that NLRP3-dependent responses may compensate for the lack of Nlr4 in Nlr4 knockout mice and, similarly, Nlr4-dependent responses may be sufficient in the absence of NLRP3. Future studies could address this question using Nlr4/Asc and Nlr4/NLRP3 double knockouts. One of the few studies that have attempted to investigate the regulation of this pathway suggested that phosphorylated tyrosine kinase Syk is physically associated with ASC, and Syk is required to activate both the NLRP3 inflammasome and cathepsin B in macrophages that were stimulated with hemozoin from *Plasmodium*, but not with uric acid or

silica (60). Because IL-1 β production is abolished in the absence of active cathepsin B or Syk, these data suggest that the phosphorylation of Syk and the activation of cathepsin B are upstream of caspase-1 activation. However, the mechanisms involved in the activation of cathepsin B and NLRP3 by phosphorylated Syk remain to be elucidated. Recently, cathepsin B was demonstrated to be involved in pyroptosis induced by *Bacillus anthracis* lethal toxin (LT) (38). Interestingly, it was observed that LMP could be upstream or downstream of the NLRP1b inflammasome activity. LMP required a NLRP1b LT-responsive allele of NLRP1b and caspase-1 activation, but LT-induced mitochondrial outer membrane permeabilization seems to be sufficient to induce LMP and can function as a positive regulator of NLRP1b inflammasome activities. Here, we demonstrated evidences of the regulation of NAIP5/NLRC4 inflammasome activities by lysosomal pathway, because inhibition of cathepsin B impacts cytosolic flagellin-induced inflammasome-mediated effects.

Taken together, our results indicate that NAIP5/NLRC4 inflammasome (labeled “A” in Fig. 6) and lysosomal pathway (labeled “B” in Fig. 6) are both activated after cytosolic flagellin stimulation. Both NAIP5/NLRC4 inflammasome and lysosomal pathway seem to synergistically contribute to cell death/pyroptosis, IL-1 β production and IL-1 α secretion (labeled “C” in Fig. 6). Moreover, lysosomal cathepsins regulate flagellin-induced cell death in the absence of NAIP5/NLRC4 inflammasome. Given that this peculiar form of cell death is also involved in the clearance of bacterial infection, our results provide further understanding of the molecular mechanisms that coordinate the activation and death of macrophages in response to flagellin and its biological significance to host resistance against infections with flagellated bacteria.

Methods

Animal studies were all performed using protocols that were approved by the Federal University of São Paulo Committees on the Use and Care of Animals (CEP 0159/11). Details on methods and any associated references are available in *SI Methods*. Briefly, PMs were obtained by peritoneal lavage 4 d after i.p. treatment with starch solution (1%) (Sigma Aldrich). Purified flagellins from *B. subtilis* (FLA-BS) and *Salmonella* Typhimurium (FliC) were purchased from Invivogen. The recombinant *Salmonella* Typhimurium FliC flagellin and the HIV p24 protein were expressed in the *E. coli* BL21 DE strain, and the recombinant proteins were purified by nickel affinity chromatography, as described previously (61, 62). VK210 peptide of *P. vivax* protein was purchased from GenScript. PMs were cultured in the presence of purified flagellin from *B. subtilis* or *Salmonella* Typhimurium in its free form (FLA-BS or FliC) or inserted into DOTAP (FLA-BSDot or FliCDot) (Roche Diagnostics), a cationic lipid formulation that permits its delivery to cell cytosol (63). DOTAP was used accordingly to the manufacturer's instructions, and protein concentration was calculated to maintain the same molarity. Cytokines were measured in culture supernatant with ELISA kits from BD (OptEIA), following the manufacturer's instructions. Pore formation and cytotoxicity was assessed using EtBr incorporation in combination with AO (Sigma) staining as described previously (64).

ACKNOWLEDGMENTS. We thank Dr. Richard Flavell for kindly providing ASC^{-/-}, caspase-1/11^{-/-}, and NLRC4^{-/-} mice and Dr. Vishva Dixit for kindly providing NLRP3^{-/-} mice. This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo and the Brazilian Research Council.

- Hayashi F, et al. (2001) The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410(6832):1099–1103.
- Franchi L, et al. (2006) Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1 β in salmonella-infected macrophages. *Nat Immunol* 7(6):576–582.
- Zamboni DS, et al. (2006) The Birc1e cytosolic pattern-recognition receptor contributes to the detection and control of Legionella pneumophila infection. *Nat Immunol* 7(3):318–325.
- Amer A, et al. (2006) Regulation of Legionella phagosome maturation and infection through flagellin and host Ipaf. *J Biol Chem* 281(46):35217–35223.
- Miao EA, et al. (2006) Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1 β via Ipaf. *Nat Immunol* 7(6):569–575.

- Smith KD, et al. (2003) Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. *Nat Immunol* 4(12):1247–1253.
- Lightfield KL, et al. (2008) Critical function for Naip5 in inflammasome activation by a conserved carboxy-terminal domain of flagellin. *Nat Immunol* 9(10):1171–1178.
- Lightfield KL, et al. (2011) Differential requirements for NAIP5 in activation of the NLRC4 inflammasome. *Infect Immun* 79(4):1606–1614.
- Zhao Y, et al. (2011) The NLRC4 inflammasome receptors for bacterial flagellin and type III secretion apparatus. *Nature* 477(7366):596–600.
- Fantuzzi G, Dinarello CA (1999) Interleukin-18 and interleukin-1 β : Two cytokine substrates for ICE (caspase-1). *J Clin Immunol* 19(1):1–11.

11. Brennan MA, Cookson BT (2000) Salmonella induces macrophage death by caspase-1-dependent necrosis. *Mol Microbiol* 38(1):31–40.
12. Akhter A, et al. (2009) Caspase-7 activation by the Nlr4/Ipf inflammasome restricts Legionella pneumophila infection. *PLoS Pathog* 5(4):e1000361.
13. Buzzo CL, et al. (2010) A novel pathway for inducible nitric oxide synthase activation through inflammasomes. *J Biol Chem* 285(42):32087–32095.
14. Miao EA, et al. (2010) Caspase-1-induced pyroptosis is an innate immune effector mechanism against intracellular bacteria. *Nat Immunol* 11(12):1136–1142.
15. Suzuki T, et al. (2007) Differential regulation of caspase-1 activation, pyroptosis, and autophagy via Ipf and ASC in Shigella-infected macrophages. *PLoS Pathog* 3(8):e111.
16. Franchi L, et al. (2007) Critical role for Ipf in Pseudomonas aeruginosa-induced caspase-1 activation. *Eur J Immunol* 37(11):3030–3039.
17. Sutterwala FS, et al. (2007) Immune recognition of Pseudomonas aeruginosa mediated by the IPAF/NLRC4 inflammasome. *J Exp Med* 204(13):3235–3245.
18. Warren SE, Mao DP, Rodriguez AE, Miao EA, Aderem A (2008) Multiple Nod-like receptors activate caspase 1 during Listeria monocytogenes infection. *J Immunol* 180(11):7558–7564.
19. Bergsbaken T, Fink SL, Cookson BT (2009) Pyroptosis: Host cell death and inflammation. *Nat Rev Microbiol* 7(2):99–109.
20. Kayagaki N, et al. (2011) Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. *Nature* 479(7371):117–121.
21. Kuida K, et al. (1995) Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* 267(5206):2000–2003.
22. Li P, 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(3):401–411.
23. Chen Y, Smith MR, Thirumalai K, Zychlinsky A (1996) A bacterial invasin induces macrophage apoptosis by binding directly to ICE. *EMBO J* 15(15):3853–3860.
24. Fink SL, Cookson BT (2005) Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: Mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immun* 73(4):1907–1916.
25. Fink SL, Cookson BT (2006) Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages. *Cell Microbiol* 8(11):1812–1825.
26. Silveira TN, Zamboni DS (2010) Pore formation triggered by Legionella spp. is an Nlr4 inflammasome-dependent host cell response that precedes pyroptosis. *Infect Immun* 78(3):1403–1413.
27. Ting JP, Willingham SB, Bergstralh DT (2008) NLRs at the intersection of cell death and immunity. *Nat Rev Immunol* 8(5):372–379.
28. Vijay-Kumar M, Carvalho FA, Aitken JD, Fikadara NH, Gewirtz AT (2010) TLR5 or NLRC4 is necessary and sufficient for promotion of humoral immunity by flagellin. *Eur J Immunol* 40(12):3528–3534.
29. Broz P, von Moltke J, Jones JW, Vance RE, Monack DM (2010) Differential requirement for Caspase-1 autoproteolysis in pathogen-induced cell death and cytokine processing. *Cell Host Microbe* 8(6):471–483.
30. Ghosh EE, et al. (2010) Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(6):2568–2573.
31. Cassado AdosA, et al. (2011) Cellular renewal and improvement of local cell effector activity in peritoneal cavity in response to infectious stimuli. *PLoS ONE* 6(7):e22141.
32. McGahon AJ, et al. (1995) The end of the (cell) line: Methods for the study of apoptosis in vitro. *Methods Cell Biol* 46:153–185.
33. Eigenbrod T, Park JH, Harder J, Iwakura Y, Nnz G (2008) Cutting edge: Critical role for mesothelial cells in necrosis-induced inflammation through the recognition of IL-1 alpha released from dying cells. *J Immunol* 181(12):8194–8198.
34. Guicciardi ME, Leist M, Gores GJ (2004) Lysosomes in cell death. *Oncogene* 23(16):2881–2890.
35. Hitomi J, et al. (2008) Identification of a molecular signaling network that regulates a cellular necrotic cell death pathway. *Cell* 135(7):1311–1323.
36. Kreuzaler PA, et al. (2011) Stat3 controls lysosomal-mediated cell death in vivo. *Nat Cell Biol* 13(3):303–309.
37. Boya P, Kroemer G (2008) Lysosomal membrane permeabilization in cell death. *Oncogene* 27(50):6434–6451.
38. Averette KM, et al. (2009) Anthrax lethal toxin induced lysosomal membrane permeabilization and cytosolic cathepsin release is Nlrp1b/Nalp1b-dependent. *PLoS ONE* 4(11):e7913.
39. Nascimento FD, et al. (2007) Crotonamide mediates gene delivery into cells through the binding to heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem* 282(29):21349–21360.
40. Hornung V, et al. (2008) Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol* 9(8):847–856.
41. Dostert C, et al. (2009) Malarial hemozoin is a Nalp3 inflammasome activating danger signal. *PLoS ONE* 4(8):e6510.
42. Hentze H, Lin XY, Choi MS, Porter AG (2003) Critical role for cathepsin B in mediating caspase-1-dependent interleukin-18 maturation and caspase-1-independent necrosis triggered by the microbial toxin nigericin. *Cell Death Differ* 10(9):956–968.
43. Duncan JA, et al. (2009) Neisseria gonorrhoeae activates the proteinase cathepsin B to mediate the signaling activities of the NLRP3 and ASC-containing inflammasome. *J Immunol* 182(10):6460–6469.
44. Schotte P, et al. (1998) Cathepsin B-mediated activation of the proinflammatory caspase-11. *Biochem Biophys Res Commun* 251(1):379–387.
45. Lage SL, Amarante-Mendes GP, Bortoluci KR (2013) Evaluation of pyroptosis in macrophages using cytosolic delivery of purified flagellin. *Methods* 61(2):110–116.
46. Bortoluci KR, Medzhitov R (2010) Control of infection by pyroptosis and autophagy: Role of TLR and NLR. *Cell Mol Life Sci* 67(10):1643–1651.
47. Dinarello CA (1998) Interleukin-1 beta, interleukin-18, and the interleukin-1 beta converting enzyme. *Ann N Y Acad Sci* 856:1–11.
48. Sutterwala FS, et al. (2006) Critical role for NALP3/CIA51/Cryopyrin in innate and adaptive immunity through its regulation of caspase-1. *Immunity* 24(3):317–327.
49. Gross O, et al. (2012) Inflammasome activators induce interleukin-1a secretion via distinct pathways with differential requirement for the protease function of caspase-1. *Immunity* 36(3):388–400.
50. Jesenberger V, Procyk KJ, Yuan J, Reipert S, Baccarini M (2000) Salmonella-induced caspase-2 activation in macrophages: A novel mechanism in pathogen-mediated apoptosis. *J Exp Med* 192(7):1035–1046.
51. Hernandez LD, Pypaert M, Flavell RA, Galn JE (2003) A Salmonella protein causes macrophage cell death by inducing autophagy. *J Cell Biol* 163(5):1123–1131.
52. Repnik U, Turk B (2010) Lysosomal-mitochondrial cross-talk during cell death. *Mitochondrion* 10(6):662–669.
53. Kgedal K, Johansson U, Ollinger K (2001) The lysosomal protease cathepsin D mediates apoptosis induced by oxidative stress. *FASEB J* 15(9):1592–1594.
54. Kgedal K, Zhao M, Svensson I, Brunk UT (2001) Sphingosine-induced apoptosis is dependent on lysosomal proteases. *Biochem J* 359(Pt 2):335–343.
55. Foghsgaard L, et al. (2001) Cathepsin B acts as a dominant execution protease in tumor cell apoptosis induced by tumor necrosis factor. *J Cell Biol* 153(5):999–1010.
56. Yamashita T (2000) Implication of cysteine proteases calpain, cathepsin and caspase in ischemic neuronal death of primates. *Prog Neurobiol* 62(3):273–295.
57. Kroemer G, Martin SJ (2005) Caspase-independent cell death. *Nat Med* 11(7):725–730.
58. Pereira WO, Amarante-Mendes GP (2011) Apoptosis: A program of cell death or cell disposal? *Scand J Immunol* 73(5):401–407.
59. Amarante-Mendes GP, et al. (1998) Anti-apoptotic oncogenes prevent caspase-dependent and independent commitment for cell death. *Cell Death Differ* 5(4):298–306.
60. Shio MT, et al. (2009) Malarial hemozoin activates the NLRP3 inflammasome through Lyn and Syk kinases. *PLoS Pathog* 5(8):e1000559.
61. Bargieri DY, et al. (2008) New malaria vaccine candidates based on the Plasmodium vivax Merozoite Surface Protein-1 and the TLR-5 agonist Salmonella Typhimurium FlIC flagellin. *Vaccine* 26(48):6132–6142.
62. Bargieri DY, et al. (2010) Immunogenic properties of a recombinant fusion protein containing the C-terminal 19 kDa of Plasmodium falciparum merozoite surface protein-1 and the innate immunity agonist FlIC flagellin of Salmonella typhimurium. *Vaccine* 28(16):2818–2826.
63. Simberg D, Weisman S, Talmon Y, Barenholz Y (2004) DOTAP (and other cationic lipids): Chemistry, biophysics, and transfection. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 21(4):257–317.
64. Kasibhatla S, et al. (2006) Acridine orange/ethidium bromide (AO/EB) staining to detect apoptosis. *CSH Protoc*, 10.1101/pdb.prot4493.

**APÊNDICE C - Evaluation of pyroptosis in macrophages using cytosolic
delivery of purified flagellin**

Evaluation of pyroptosis in macrophages using cytosolic delivery of purified flagellin

Silvia L. Lage^a, Gustavo P. Amarante-Mendes^{b,c}, Karina R. Bortoluci^{a,d,e,*}

^a Centro de Terapia Celular e Molecular (CTC-Mol), Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil

^b Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

^c Instituto de Investigação em Imunologia, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT), Brazil

^d Departamento de Ciências Biológicas - Campus Diadema - Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil

^e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Vacinas (INCTV), Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Available online 27 February 2013

Keywords:

Pyroptosis

Apoptosis

Cell death

ABSTRACT

Pyroptosis is a molecularly controlled form of cell death that exhibits some features of apoptosis as well of necrosis. Pyroptosis is induced by inflammasome-activated caspase-1 or caspase-11 (caspase-4 in humans), as a result of distinct pathogenic or damage stimuli. Although pyroptosis displays some morphological and biochemical features of apoptosis, it has an inflammatory outcome due to the loss of plasma membrane integrity and the consequent release of intracellular contents, reminiscent to necrosis. Here, we use cytosolic delivery of purified flagellin as an experimental tool to trigger pyroptosis and describe potential methods to study this form of cell death. Finally, we discuss the advantages and limitations of these methods.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Pyroptosis is a controlled form of cell death triggered by a variety of pathogenic stimuli or damage signals that induce inflammasome activation [1,2]. Inflammasomes are multiprotein complexes containing a “sensor” belonging to NOD-like receptors (NLR) or to pyrin and HIN domain-containing protein (PYHIN) families, the adaptor molecule ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase activating and recruitment domain (CARD)), and pro-caspase-1 or pro-caspase-11 (pro-caspase-4 in humans).

The best-characterized inflammasomes complexes contain NLRP3, NLRC4 or AIM2, as sensor proteins. AIM2 senses cytosolic DNA during intracellular bacterial [3] or viral [4] infections, whereas NLRC4 responds to bacterial proteins such as flagellin [5] or the inner rod component of bacterial type III secretion system (T3SS) [6]. A wide range of distinct class of stimuli can activate NLRP3, including viral double stranded RNA [7], bacterial-derived pore forming toxins [8–10], crystalline or particulate structures such as alum [11,12] and silica [13] and endogenous damage signals such as uric acid and ATP [14]. Since these structures are not molecularly related it is believed that all of these stimulus induce common pathways, such as ROS production, lysosomal rupture or potassium efflux that result in a distinct signals able to activate NLRP3, either directly or through an intermediate molecule [15].

* Corresponding author at: Departamento de Ciências Biológicas - Campus Diadema e Centro de Terapia Celular e Molecular (CTC-Mol) - Universidade Federal de São Paulo, R. Mirassol, 207, Vila Clementino, São Paulo, SP 04044 010, Brazil.

E-mail address: kbortoluci@gmail.com (K.R. Bortoluci).

AIM2 is a dimer containing a C-terminal HIN200 domain and an N-terminal pyrin domain (PYR) that belongs to a PYHIN family of proteins [16]. NLRP3 and NLRC4 are members of the NLR proteins that comprise three domains: a C-terminal region that contains a leucine-rich repeat domain (LRR) responsible for agonist sensing; a central nucleotide-binding domain (NBD) and an effector N-terminal portion that subdivide these proteins into distinct subfamily members [17]. Depending on the NLR member, the N-terminal portion can contain a PYR, CARD or baculovirus inhibitory domain (BIR) domains. The adaptor molecule ASC is comprised of a PYD and a CARD domain that permits its interaction with PYD-containing proteins and the CARD domain of caspase-1.

Similar to AIM2, NLRP3 has a N-terminal PYR domain. Once activated, AIM2 and NLRP3 recruit ASC through PYD–PYD interactions leading to caspase-1 activation [16,18]. On the other hand, NLRC4 contains a CARD at the N-terminal region that enables the direct interaction with caspase-1, besides being able to recruit ASC [19,20]. Activation of NLRC4 inflammasome requires its association with another NLR member of NAIP (Neuronal apoptosis inhibitory protein) subfamily that contains a BIR domain at the N-terminal region [20,21]. In response to flagellin, activation of the NLRC4 inflammasome requires the presence of NAIP5, whereas NAIP2 is responsible for the T3SS rod protein recognition. Therefore, NAIP proteins directly bind to their ligands and then physically associate with NLRC4 to form an inflammasome complex able to recruit and activate caspase-1 either directly or through the ASC molecule. The association of pro-caspase-1 with inflammasomes containing ASC allows its autoproteolytic cleavage to become an enzymatically active heterodimer capable of processing

pro-IL-1 β and pro-IL-18 into mature cytokines [22]. In contrast, ASC-independent inflammasomes activate caspase-1 without autoproteolysis, which is sufficient for caspase-1 targeting of a distinct subset of substrates critical for the induction of pyroptosis.

Pyroptosis and apoptosis are processes of cell death mediated by caspases. However, whereas apoptosis has a tolerogenic outcome, cells dying by pyroptosis quickly swell and rupture, resulting in the release of intracellular contents and inflammation, similarly as in classical necrosis [1]. Cell lysis during pyroptosis is a highly regulated process that requires activation of caspase-1 to generate pores in the plasma membrane [23]. It has been proposed that these pores dissipate cellular ionic gradients, but allow the retention of greater cytoplasmic constituents, leading to increased liquid osmotic pressure. This process causes the inflow of water, resulting in cell swelling and osmotic lysis [23,24]. Pyroptosis is considered an important effector mechanism to clear microbial infections, since the death of infected macrophages by pyroptosis results in the loss of the replication niche in addition to the release of the inflammatory intracellular contents and cytokines that, in their turn, lead to the recruitment of effector cells to the infectious site [25].

Therefore, specific signaling pathways dependent on caspase activity are involved in apoptosis and pyroptosis, but, unlike apoptosis, the terminal cellular events in pyroptosis have necrotic features. Here we describe the most commonly used approaches to

study pyroptosis. Because pyroptosis exhibits some features of apoptosis as well as necrosis, we point out the advantages and limitations of these methods for the discrimination among different types of cell death.

2. Cytosolic delivery of purified flagellin

Flagellin is one of the few protein structures that can be recognized by innate immune system. The recognition of extracellular flagellin occurs via transmembrane TLR5 that seems to sense a conserved region located in D1 domain of flagellin structure [23,26]. However, flagellin can be delivered to the cell cytosol by secretion systems present in virulent bacteria, such as *S. typhimurium* type III secretion system (T3SS SPI-1) [5] and *L. pneumophila* type IV (T4SS) [27]. Cytosolic flagellin is sensed by NAIP5/NLRC4 complex, though a mechanism that was recently elucidated [20,21]. It is proposed that NAIP5 directly binds to flagellin at the three-leucine residues present on the flagellin C-terminal D0 domain [20]. After that, NAIP5 recruits NLRC4 through the NOD domain, leading to the association of this receptor directly with pro-caspase-1 or via ASC, which is able to recruit and process pro-caspase-1. Activated caspase-1, in its turn, mediates processing of inactive precursors of proinflammatory cytokines IL-1 β and IL-18, whereas unprocessed caspase-1 is able to promote pyroptotic cell death via a yet obscure mechanism.

To induce pyroptosis, we use an approach well established in our lab that consists of stimulation of starch (Sigma Aldrich)-elicited adherent peritoneal cells (1×10^5 cells pre-seeded “overnight” in 96-well plates) with purified flagellin from gram-positive *B. subtilis* (Invivogen) inserted into DOTAP (FLA-BSDot) (Roche Diagnostics), a cationic lipid formulation that allows the delivery of exogenous proteins to the cytosol [28]. As a control, we use flagellin in its free form (FLA-BS). To produce the FLA-BSDot preparations, purified flagellin is incubated for 15 min, at room temperature with DOTAP (5 μ l per μ g of flagellin) and then volume is completed with RPMI-1640 + 3% FCS to obtain preparations of 1–6 μ g/ml final concentration. Medium from macrophage cultures seeded at the day before is replaced by 200 μ l of the FLA-BS or FLA-BSDot preparations and cells are cultured for different periods of time. Notably, we use flagellin from gram-positive *B. subtilis* in attempt to eliminate LPS contamination. It is important to point out that the region of flagellin responsible for its recognition by NAIP5/NLRC4 axis remains highly conserved among different bacterial species, including non-pathogenic *B. subtilis*.

To confirm the cytosolic delivery of flagellin, the release of IL-1 β was estimated as a measure of inflammasome activation. It is fully understood that inflammasome-activated caspase-1 processes the inactive precursors of IL-1 β and IL-18 into biologically active cytokines [29]. IL-1 β production was measured in culture supernatants by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (BD Biosciences). Briefly, a 96-well ELISA plate was coated with 100 μ l per well of the anti-mouse IL-1 β monoclonal antibody as a capture antibody diluted in coating buffer (0.1 M Sodium Carbonate, pH 9.5) (1:250) and incubated overnight at 4 °C. The wells were washed three times with wash buffer (PBS [1x] with 0.05% Tween-20) and blocked with 200 μ l of the assay diluent (PBS [1x] with 10% FBS, pH 7.0) for 1 h at room temperature (RT). Then, the wells were washed three times and 100 μ l of the standard curve (recombinant mouse 17KDa mature form of IL-1 β (ranging from 15.6 pg/mL to 1000 pg/mL), controls (assay diluent) or samples were added to wells and incubated for 2 h at RT. After washings, 100 μ l per well of the detection antibody (biotinylated anti-mouse IL-1 β monoclonal antibody) diluted in the assay diluent (1:1000) were added and incubated 1 h at RT. The wells were washed five times and incubated with 100 μ l of the enzyme re-

Fig. 1. Only cytosolic flagellin induces caspase-1-dependent IL-1 β secretion. PM from C57BL/6 and caspase-1-deficient mice ($1 \times 10^5/200 \mu$ l) were stimulated with 6 μ g/ml of purified flagellin from *Bacillus subtilis* in its free form (FLA-BS) or inserted into DOTAP (FLA-BSDot). The release of IL-1 β was determined in culture supernatants by ELISA. Numbers represent the mean $\pm$ SD of duplicate samples. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ when compared to control group or knockout group. Data obtained are representative of three independent experiments.

Fig. 2. Pyroptotic and apoptotic cells display distinct features. Peritoneal macrophage (PM) from C57BL/6 and caspase-1-deficient mice ($1 \times 10^5/200 \mu\text{l}$) were stimulated for 12 h with actinomycin D ($5 \mu\text{g/ml}$) (right panel), a known apoptogenic drug, or for 1.5 h with $6 \mu\text{g/ml}$ (correspondent to $2 \times 10^{-7} \text{ M}$) of purified flagellin from *Bacillus subtilis* inserted into DOTAP (FLA-BSDot). Cell morphology was accompanied in phase contrast microscopy. Micrographs represent original magnification $\times 400$. Data are representative of three independent experiments.

agent (streptavidin–horseradish peroxidase conjugate) diluted in assay diluent (1:250) for 30 min at RT, in the dark. After this period, the plate was washed seven times and $100 \mu\text{l}$ of the substrate solution (10 mL of the citrate–phosphate buffer, pH 5.0 containing 5 mg of the o-Phenylenediamine dihydrochloride (OPD) (Sigma–Aldrich) and $5 \mu\text{l}$ of Hydrogen peroxide) were added to each well and incubated for 30 min at RT, in the dark. Finally, $50 \mu\text{l}$ per well of the stop solution (2 N H_2SO_4) were added and the absorbance was read at 490 nm by using a microplate absorbance reader. The IL-1 β concentration in samples was determined according to the standards curve values.

Time-course analysis of IL-1 β secretion in the supernatants, clearly shows that cytosolic (FLA-BSDot), but not free flagellin (FLA-BS), induces IL-1 β secretion, an indicative of caspase-1 activation (Fig. 1A). In fact, IL-1 β induced by FLA-BSDot is entirely dependent on caspase-1, since its production is abolished in macrophages obtained from caspase-1 $^{-/-}$ mice (Fig. 1B). In conclusion, using a transfection lipid vesicle one can deliver purified flagellin into cell cytosol, making it an excellent experimental model to evaluate the activation of inflammasomes and consequent induction of caspase-1-dependent pyroptosis.

Mature IL-1 β production can be evaluated by western blot in cell lysates or culture supernatants. Macrophages (1×10^6 cells) are stimulated or not with FLA-BS or FLA-BSDot for 2 and 4 h. Cell extracts (lysed directly in a RIPA buffer (50 mM Tris–HCl pH 6.8,

1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 1% deoxycholate and 0.1% SDS)) or culture supernatants samples (precipitated with 50% trichloroacetic acid and acetone) are resolved under reducing conditions for 2.5 h at 75 V using SDS–polyacrylamide gels. Samples are transferred onto PVDF membranes for 1 h at 20 V using a semi-dry system (BioRad). Membranes are blocked for 1 h in TBS-T (10 mM Tris–HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, and 0.05% Tween) containing 0.1% sodium azide and 5% nonfat dried milk. Blots are then probed using a goat anti-IL-1 β p-17 subunit antibody (Sigma Aldrich) diluted in blocking buffer (1:200) overnight. Reactions are detected using a secondary anti-goat antibody conjugated to horseradish peroxidase (Santa Cruz) (1:1000) and visualized using an enhanced chemiluminescence (ECL) solution (GE Healthcare).

2.1. Caspase activation

Caspases are cysteine–proteases that cleave a limited number of substrates after aspartate residues playing a central role in initiating both apoptosis and pyroptosis. Caspases are expressed in cytosol as inactive zymogens and became active enzymes either in the context of multimeric complexes (i.e. death-inducing signaling complex/DISC, apoptosome and inflammasome), which bring certain caspases to close proximity, or after proteolysis by other activated caspases [30]. Importantly, caspases-3, -6, -7, -8, -9 and -10,

Fig. 3. Only cytosolic flagellin induces early macrophage lysis in a caspase-1-dependent manner. PM from C57BL/6 and caspase-1-deficient mice ($10^5/200 \mu\text{l}$) were stimulated with $6 \mu\text{g/ml}$ of purified flagellin from *Bacillus subtilis* in its free form (FLA-BS) or inserted into DOTAP (FLA-BSDot). LDH release (A) (B) was determined in culture supernatants by LDH kit. Numbers represent the mean $\pm$ SD of duplicate samples. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ when compared to control group or knockout group. Data obtained are representative of three independent experiments.

are associated with apoptosis, whereas caspase-1 participates only in pyroptosis.

Caspase-1 is synthesized as pro-caspase-1 (45 KDa) and is activated by dimerization and autoproteolytic processing after recruitment into the ASC-containing inflammasome [22,29]. Pro-caspase-1 undergoes self-activation by autoproteolytic cleavage resulting in removal of the N-terminal CARD domain and become an enzymatically active heterodimer comprised by large p20 (20 KDa) and small p10 (10 KDa) subunits. Because active caspase-1 mediates pyroptosis, the analysis of cleaved caspase-1 is an important assay to evaluate this form of cell death.

Active caspase-1 can be evaluated by western blot. Cell extracts and culture supernatants from FLA-BSDot-stimulated macrophages (1×10^6 cells) are obtained 30, 60 and 120 min after stimulation and samples are resolved and transferred onto PVDF membranes, as described above. Membranes are probed using a rat anti-caspase-1 p20 monoclonal antibody clone 4B4 (Genentech) (1:250), overnight. Horseradish peroxidase-conjugated anti-rat antibodies (1:2000) (Sigma Aldrich) are used as secondary antibody. The reactions are visualized using an ECL solution (GE Healthcare).

Caspase activation can also be evaluated by fluorimetric or colorimetric assays, employing specific caspase substrates [31].

FLICA™ (Fluorescent Labeled Inhibitor of Caspases) probes are also extensively used to evaluate caspase activation. FLICA probes are cell-permeable and non-cytotoxic reagents containing an inhibitor peptide sequences that irreversible bind to active caspase enzymes through a fluoromethyl ketone (FMK) moiety and a fluorescent tag that permits the evaluation of active caspases by flow cytometry or by fluorescence microscopy. The detection of caspase-1 employs the tyrosine–valine–alanine–aspartic acid (YVAD) as the caspase-1 recognition sequence [32]. Briefly, macrophages (1×10^6 cells) are stimulated or not with FLA-BS or FLA-BSDot for 30, 60 and 120 min as previous described. Then, cells are incubated for 1 h at 37°C , in the dark, with $10 \mu\text{l}$ of the 30x concentrated FAM-YVAD-FMK (Immunochemistry Technologies), following manufacturer's instructions. After washes, cells pellet is resuspended in 2 mL of the rinsing solution and the active caspase-1 is measured by flow cytometry using a FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences) and the FlowJo software (Tree Star).

Because caspase activation is not observed during necrosis, the assessment of caspase-1 and apoptotic caspases activation is a possible approach to discriminate among these types of cell death. However, it is important to note that, caspase-1 activation does not necessarily result in pyroptosis. Depending on the nature and concentration of stimuli, caspase-1 activation by inflammasomes leads to cytokine maturation in the absence of cell death [8,9,13,33]. Therefore, the evaluation of specific caspase activation is a fundamental complementary approach to the correct characterization of cell death processes.

3. Cell morphology

During apoptosis, caspases are responsible for promoting the well-characterized morphological changes that include cell shrinkage, chromatin marginalization and nuclear condensation. The process is followed by cell fragmentation into membrane-bound apoptotic bodies, which contains cellular organelles and nuclear fragments. Therefore, the intracellular contents remain protected into membrane-bound bodies that can be phagocytosed by nearby cells, actively inhibiting inflammation [34]. On the other hand, cell swelling and osmotic lysis are the hallmarks of pyroptosis and necrosis, both of them resulting in the release of intracellular contents and inflammation [35]. Both pyroptosis and necrosis are characterized by progressive loss of plasma membrane integrity, cellular and organelles swelling, and finally disorganized dismantling of intracellular contents [1].

Morphological changes during apoptosis, pyroptosis and necrosis can be observed using bright field, confocal or electron microscopy. Time-lapse phase-contrast images demonstrate that stimulation of peritoneal macrophages (PM) from wild-type (WT) C57BL/6 mice with FLA-BSDot, as described above, quickly induced a high frequency of swollen cells that seem to blow up with time, leading to the accumulation of cellular debris (Fig. 2A). In contrast, the treatment of PM with actinomycin D (ActD), a known apoptogenic drug, leads to loss of cell volume and formation of membrane blebs, consistent to apoptosis (Fig. 2B). It is important to note that the effect of ActD but not of cytosolic flagellin is preserved in macrophages from caspase-1^{-/-} mice, indicating the dependency of this protease on the induction of pyroptosis but not apoptosis (Fig. 2). Since the morphology of necrosis and pyroptosis are similar, the evaluation of caspase-1 dependency is important to distinguish these two forms of cell death.

4. Phosphatidylserine externalization

Executioner apoptotic caspases also promote phosphatidylserine (PS) externalization in dying cells, which contributes to the

Fig. 4. Flagellin-induced cell death by EtBr/AO staining. PM from C57BL/6 mice ($10^5/200\text{ }\mu\text{l}$) were stimulated with $6\text{ }\mu\text{g/ml}$ of purified flagellin from *Bacillus subtilis* in its free form (FLA-BS) or inserted into DOTAP (FLA-BSDot). After 6 h cell permeability was assessed by fluorescence microscopy according to Acridine orange (AO) and Ethidium bromide (EtBr) staining. Acridine orange-stained PMs (green) show viable cells in each field, and EtBr (red) indicates permeabilized PMs. Right panels show merged images. Micrographs represent original magnification $\times 400$. EtBr single staining cells were evaluated as an indicative of cell death (right panels, above). Data are representative of three independent experiments.

	Apoptosis	Pyroptosis	Oncosis
Caspase activation	Casp-3,7,9	Casp- 1/11	No
Annexin V/PI stain	Annexin ⁺ /PI ⁻	Annexin ⁺ /PI ⁺	Annexin ⁺ /PI ⁺
LDH release	No	Early event	Early event
Early AO/EtBr stain	AO ⁺ EtBr ⁻ cells with green spots in the nuclei	AO ⁺ EtBr ⁺ cells with orange condensed nuclei	AO ⁺ EtBr ⁺ cells with orange uncondensed nuclei
Late AO/EtBr stain	AO ⁺ EtBr ⁺ cells with orange spots in the nuclei	AO ⁺ EtBr ⁺ cells with red condensed nuclei	AO ⁺ EtBr ⁺ cells with red uncondensed nuclei

efficient clearance of apoptotic bodies by nearby cells thus preventing membrane rupture and further tissue damage and inflammation [36,37]. The exposure of PS still holds as an important marker for apoptosis being widely used to the evaluation of this form of cell death by flow cytometry or fluorescence microscopy through annexin V-binding assay, as described by Brumatti et al. [38]. However, it is important to note that membrane pores formed during caspase-1 activation permits annexin V to enter the cell and stain the inner leaflet of the plasma membrane [35]. Similarly, annexin V can also bind PS on the inside of the damaged cell membranes of necrotic cells [39]. Therefore, apoptotic, pyroptotic and

necrotic cells cannot be distinguished among themselves, using annexin V labeling only. The concomitant use of PI (propidium iodide) or 7-AAD (7-amino actinomycin D) helps revealing pyroptotic or necrotic cells, as both reagents will only label cells with damaged plasma membrane.

5. LDH release

Because a key event in pyroptosis is the early loss of plasma membrane integrity, the lactate dehydrogenase (LDH) release assay has been adopted as one of the major approaches to character-

ize cell death by pyroptosis [24,40–42]. LDH is a cytosolic enzyme released from damaged cells and its presence in culture supernatants is detected by the conversion of lactate to pyruvate with parallel reduction of NAD to NADH.

LDH release is quantified colorimetrically in supernatants from FLA-BSDot-stimulated macrophages by using a LDH-release kit from Doles or similar. Briefly, 50 μ l of supernatants obtained from macrophages treated or not with FLA-BS or FLA-BSDot are incubated with 100 μ l of ferric alum solution and substrate for 3 min, at 37 °C. Then, 100 μ l of fenasina methosulfate and NAD solution in distilled water are added. After 5 min, at 37 °C, the absorbance is measured at 510 nm and the percentage of cell lysis is calculated as follows: $((\text{experimental release} - \text{spontaneous release}) / (\text{maximum release} - \text{spontaneous release})) \times 100$, where 'spontaneous release' is LDH found in unstimulated macrophages or cells treated with empty DOTAP vesicles and 'maximum release' is the value of LDH obtained in macrophages treated with a solution of 1% Triton-X100. Thus, it is expected that the percentage of cell lysis should be directly proportional to the amount of LDH released into the culture medium. Similarly to IL-1 production, LDH is only observed in the presence of FLA-BSDot (Fig. 3A). In addition, LDH release was significantly inhibited in the absence of caspase-1, confirming the requirement of this molecule for macrophage responses to cytosolic flagellin (Fig. 3B). Therefore, early LDH release can be employed to detect processes of cell death that involve loss of cell membrane integrity. However, we cannot discard the possibility of LDH release in transitory processes of cellular damage, such as those caused by active entry of pathogens. Moreover, since cell lysis is a phenomenon shared by distinct forms of necrotic cell death and pyroptosis, and could occur in late phase of apoptosis, LDH assay should be used in combination with other assays in order to determine the form of cell death observed in a particular experimental condition.

6. Ethidium bromide and acridine orange staining

Acridine orange (AO) is a cell-permeable, acidophilic green dye that preferentially stains lysosomes and nuclei of live cells. Ethidium bromide (EtBr) is an intercalating agent that emits a red fluorescence upon binding to DNA. AO is widely used in combination with EtBr to evaluate cell death [43]. Healthy cells with intact plasma membrane incorporate AO but exclude EtBr and, therefore, stain uniformly green. Necrotic cells or cells undergoing pyroptosis become permeable to EtBr and stain orange or, eventually, red if they lose the AO staining. Importantly, necrotic cells maintain nuclear morphology similar to healthy cells, with no or very limited chromatin condensation whereas pyroptotic cells may display condensed chromatin. In contrast, early apoptotic cells stain green and contain bright green spots in the nuclei, as a result of a dramatic chromatin condensation and nuclear fragmentation. Late apoptotic cells eventually incorporate EtBr and, therefore, stain orange but, in contrast to necrotic cells, the late apoptotic cells exhibit condensed and often fragmented nuclei [35].

To evaluate pyroptosis induced by flagellin, macrophages were stimulated as described above and after 1.5, 3 and 6 h, culture supernatants were discarded and a solution of PBS containing EtBr and AO (Sigma Aldrich) (50 μ g/ml v/v) was added. Images were acquired using an inverted fluorescence microscope with original magnification $\times$ 400, and the percentage of EtBr positive cells was analyzed using ImageJ software, as an indicative of the percentage of cell death. Similarly to the results observed with the LDH assay, 3 h after stimulation with FLA-BSDot, we observed that the majority of cells are positive to EtBr dye, indicating cell death with loss of cell membrane integrity (Fig. 4A). In contrast, macrophages stimulated with FLA-BS showed similar staining to

unstimulated control or empty DOTAP-treated cells, containing the large majority of cells impermeable to EtBr and stained with AO, even after 6 h of stimulation. The percentage of EtBr single positive cells in each sample was calculated using ImageJ software (Fig. 4, right panels, above).

7. Conclusions

Pyroptosis is a particular form of cell death that depends on caspase-1. In contrast to apoptosis, pyroptotic cells display a rapid loss of membrane integrity that seems to be a result of caspase-1-mediated pore formation in plasma membrane. The delivery of purified flagellin into macrophages cytosol using lipidic vesicles resulted in IL-1 β secretion and cell permeabilization and lysis, as observed by phase contrast microscopy, LDH release and AO/EtBr stain. These effects were not observed during free flagellin stimulation neither in the absence of caspase-1, consistent with the features described for pyroptosis.

Common methods to characterize cell death processes can result in imprecise conclusions when used alone to discriminate necrosis, apoptosis and pyroptosis (Table 1). Amongst the techniques critically analyzed here, the evaluation of AO/EtBr stain provides a very simple, rapid and reliable method to detect pyroptosis, in a quantitative and qualitative manner. EtBr/AO staining largely eliminates the subjectivity and low specificity encountered when attempting to assess pyroptosis based only on LDH release. Besides both late apoptotic cells and cells undergoing pyroptosis incorporate EtBr, AO/EtBr staining assay provides an efficient strategy to discriminate between early apoptosis and pyroptosis since only the last one become permeable and positively stain to EtBr at early time points in culture. Although necrotic cells also incorporate EtBr, they can be distinguished from pyroptotic cells based on chromatin condensation and DNA fragmentation. However, even the EtBr/AO stain can also lead to misinterpretations and, therefore, should be associated with a second method, preferably one that assess cell death dependency of caspase-1, in order to precisely characterize pyroptosis.

Grant Support

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP-Brazil), Brazilian Research Council (CNPq-Brazil) and CAPES.

Acknowledgements

We thank Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for their ongoing support of the work carried out in our laboratories.

References

- [1] K.R. Bortoluci, R. Medzhitov, *Cell Mol. Life Sci.* 67 (2010) 1643–1651.
- [2] N. Kayagaki, S. Warming, M. Lamkanfi, L. Vande Walle, S. Louie, J. Dong, K. Newton, Y. Qu, J. Liu, S. Heldens, J. Zhang, W.P. Lee, M. Roose-Girma, V.M. Dixit, *Nature* 479 (2011) 117–121.
- [3] T. Fernandes-Alnemri, J.W. Yu, C. Juliana, L. Solorzano, S. Kang, J. Wu, P. Datta, M. McCormick, L. Huang, E. McDermott, L. Eisenlohr, C.P. Landel, E.S. Alnemri, *Nat. Immunol.* 11 (2010) 385–393.
- [4] V.A. Rathinam, Z. Jiang, S.N. Waggoner, S. Sharma, L.E. Cole, L. Waggoner, S.K. Vanaja, B.G. Monks, S. Ganesan, E. Latz, V. Hornung, S.N. Vogel, E. Szomolanyi-Tsuda, K.A. Fitzgerald, *Nat. Immunol.* 11 (2010) 395–402.
- [5] L. Franchi, A. Amer, M. Body-Malapel, T.D. Kanneganti, N. Ozoren, R. Jagirdar, N. Inohara, P. Vandenabeele, J. Bertin, A. Coyle, E.P. Grant, G. Nunez, *Nat. Immunol.* 7 (2006) 576–582.
- [6] E.A. Miao, D.P. Mao, N. Yudkovsky, R. Bonneau, C.G. Lorang, S.E. Warren, I.A. Leaf, A. Aderem, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107 (2010) 3076–3080.

- [7] T.D. Kanneganti, M. Body-Malapel, A. Amer, J.H. Park, J. Whitfield, L. Franchi, Z.F. Taraporewala, D. Miller, J.T. Patton, N. Inohara, G. Nunez, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 36560–36568.
- [8] J. Harder, L. Franchi, R. Munoz-Planillo, J.H. Park, T. Reimer, G. Nunez, *J. Immunol.* 183 (2009) 5823–5829.
- [9] K. Meixenberger, F. Pache, J. Eitel, B. Schmeck, S. Hippenstiel, H. Slevogt, P. N'Guessan, M. Witzzenrath, M.G. Netea, T. Chakraborty, N. Suttorp, B. Opitz, *J. Immunol.* 184 (2010) 922–930.
- [10] J. Ng, S.A. Hirota, O. Gross, Y. Li, A. Ulke-Lemee, M.S. Potentier, L.P. Schenck, A. Vilaysane, M.E. Seamone, H. Feng, G.D. Armstrong, J. Tschopp, J.A. Macdonald, D.A. Muruve, P.L. Beck, *Gastroenterology* 139 (2010) 542–552. 52 e1–3.
- [11] H. Li, S.B. Willingham, J.P. Ting, F. Re, *J. Immunol.* 181 (2008) 17–21.
- [12] S.C. Eisenbarth, O.R. Colegio, W. O'Connor, F.S. Sutterwala, R.A. Flavell, *Nature* 453 (2008) 1122–1126.
- [13] V. Hornung, F. Bauernfeind, A. Halle, E.O. Samstad, H. Kono, K.L. Rock, K.A. Fitzgerald, E. Latz, *Nat. Immunol.* 9 (2008) 847–856.
- [14] R. Spreafico, P. Ricciardi-Castagnoli, A. Mortellaro, *Eur. J. Immunol.* 40 (2010) 638–642.
- [15] J. Tschopp, K. Schroder, *Nat. Rev. Immunol.* 10 (2010) 210–215.
- [16] C.L. Case, *Yale J. Biol. Med.* 84 (2011) 333–343.
- [17] S. Benko, D.J. Philpott, S.E. Girardin, *Cytokine* 43 (2008) 368–373.
- [18] F. Martinon, K. Burns, J. Tschopp, *Mol. Cell* 10 (2002) 417–426.
- [19] J.L. Poyet, S.M. Srinivasula, M. Tnani, M. Razmara, T. Fernandes-Alnemri, E.S. Alnemri, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 28309–28313.
- [20] Y. Zhao, J. Yang, J. Shi, Y.N. Gong, Q. Lu, H. Xu, L. Liu, F. Shao, *Nature* 477 (2011) 596–600.
- [21] K.L. Lightfield, J. Persson, N.J. Trinidad, S.W. Brubaker, E.M. Kofoed, J.D. Sauer, E.A. Dunipace, S.E. Warren, E.A. Miao, R.E. Vance, *Infect. Immun.* 79 (2011) 1606–1614.
- [22] P. Broz, J. von Moltke, J.W. Jones, R.E. Vance, D.M. Monack, *Cell Host Microbe* 8 (2011) 471–483.
- [23] S.L. Fink, B.T. Cookson, *Cell Microbiol.* 8 (2006) 1812–1825.
- [24] T.N. Silveira, D.S. Zamboni, *Infect. Immun.* 78 (2010) 1403–1413.
- [25] E.A. Miao, I.A. Leaf, P.M. Treuting, D.P. Mao, M. Dors, A. Sarkar, S.E. Warren, M.D. Wewers, A. Aderem, *Nat. Immunol.* 11 (2010) 1136–1142.
- [26] K.D. Smith, E. Andersen-Nissen, F. Hayashi, K. Strobe, M.A. Bergman, S.L. Barrett, B.T. Cookson, A. Aderem, *Nat. Immunol.* 4 (2003) 1247–1253.
- [27] A. Amer, L. Franchi, T.D. Kanneganti, M. Body-Malapel, N. Ozoren, G. Brady, S. Meshinchi, R. Jagirdar, A. Gewirtz, S. Akira, G. Nunez, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 35217–35223.
- [28] C.L. Buzzo, J.C. Campopiano, L.M. Massis, S.L. Lage, A.A. Cassado, R. Leme-Souza, L. Dias da Cunha, M. Russo, D.S. Zamboni, G.P. Amarante-Mendes, K.R. Bortoluci, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 32087–32095.
- [29] F. Martinon, A. Mayor, J. Tschopp, *Annu. Rev. Immunol.* 27 (2009) 229–265.
- [30] G.P. Amarante-Mendes, D.R. Green, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 32 (1999) 1053–1061.
- [31] S.H. Kaufmann, S.H. Lee, X.W. Meng, D.A. Loegering, T.J. Kottke, A.J. Henzing, S. Ruchaud, K. Samejima, W.C. Earnshaw, *Methods* 44 (2008) 262–272.
- [32] Z. Darzynkiewicz, P. Pozarowski, B.W. Lee, G.L. Johnson, *Methods Mol. Biol.* 682 (2011) 103–114.
- [33] I. Ceballos-Olvera, M. Sahoo, M.A. Miller, L. Del Barrio, F. Re, *PLoS Pathog* 7 (2011) e1002452.
- [34] D.V. Krysko, K. D'Herde, P. Vandenabeele, *Apoptosis* 11 (2006) 1709–1726.
- [35] E.A. Miao, J.V. Rajan, A. Aderem, *Immunol. Rev.* 243 (2011) 206–214.
- [36] S.J. Martin, C.P. Reutelingsperger, A.J. McGahon, J.A. Rader, R.C. van Schie, D.M. LaFace, D.R. Green, *J. Exp. Med.* 182 (1995) 1545–1556.
- [37] S.J. Martin, D.M. Finucane, G.P. Amarante-Mendes, G.A. O'Brien, D.R. Green, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 28753–28756.
- [38] G. Brumatti, C. Sheridan, S.J. Martin, *Methods* 44 (2008) 235–240.
- [39] P. Saikumar, Z. Dong, V. Mikhailov, M. Denton, J.M. Weinberg, M.A. Venkatachalam, *Am. J. Med.* 107 (1999) 489–506.
- [40] M.A. Brennan, B.T. Cookson, *Mol. Microbiol.* 38 (2000) 31–40.
- [41] E.A. Miao, C.M. Alpuche-Aranda, M. Dors, A.E. Clark, M.W. Bader, S.I. Miller, A. Aderem, *Nat. Immunol.* 7 (2006) 569–575.
- [42] T. Suzuki, L. Franchi, C. Toma, H. Ashida, M. Ogawa, Y. Yoshikawa, H. Mimuro, N. Inohara, C. Sasakawa, G. Nunez, *PLoS Pathog* 3 (2007) e111.
- [43] S. Kasibhatla, G.P. Amarante-Mendes, D. Finucane, T. Brunner, E. Bossy-Wetzel, D.R. Green, *CSH Protoc.* 2006 (2006) 1–5.