

Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

LETÍCIA DE SOUSA LOPES

**Otimização do sistema de deleção gênica por CRISPR-Cas9 em
macrófagos e avaliação de genes potencialmente envolvidos na
ativação do inflamassoma de NLRC4**

Ribeirão Preto - SP

2022

LETÍCIA DE SOUSA LOPES

Otimização do sistema de deleção gênica por CRISPR-Cas9 em macrófagos e avaliação de genes potencialmente envolvidos na ativação do inflamassoma de NLRC4

Versão Corrigida

(A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BD TD))

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre.

Área de concentração: Biologia Celular e Molecular

Orientador: Prof. Dr. Dario Simões Zamboni

Coorientador: Warrison Coelho de Andrade

Ribeirão Preto - SP
2022

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Lopes, Letícia de Sousa

Otimização do sistema de deleção gênica por CRISPR-Cas9 em macrófagos e avaliação de genes potencialmente envolvidos na ativação do inflamassoma de NLRC4

Ribeirão Preto, São Paulo, 2022, 85 p.; 1l; 30cm

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo.

Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Zamboni, Dario Simões.

Coorientador: Warrison Coelho de Andrade

Nome: Lopes, Letícia de Sousa

Título: Otimização do sistema de deleção gênica por CRISPR-Cas9 em macrófagos e avaliação de genes potencialmente envolvidos na ativação do inflamassoma de NLRC4.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Mestre.

Aprovado em: _____ / _____ / _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. Dario Simões Zamboni

Instituição: FMRP - USP

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Dra. Elaine Zayas Marcelino

Instituição: RBI –FMRP/USP

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. Tiago Wilson Patriarca Mineo

Instituição: ICBIM/UFU

Julgamento: _____

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

À minha mãe e minha vó.

AGRADECIMENTOS

Aos animais utilizados nesse trabalho, pela contribuição dada à construção da ciência.

Ao meu orientador, prof. Dr. Dario Zamboni, pelos ensinamentos durante esse período.

Ao meu co-orientador, Warrison Andrade, por toda ajuda e orientação, além de momentos compartilhados.

Aos meus colegas de laboratório, por toda a ajuda, convivência diária, conhecimentos compartilhados e pelos momentos de descontração. Essa jornada foi bem mais leve graças a presença de todos vocês e eu sempre serei muito grata por isso.

À secretária Gabriela, que diariamente se dedica aos alunos do Programa de Biologia Celular e Molecular, se preocupando com nosso crescimento e estando sempre disposta a nos ajudar.

À minha mãe, Edinalva, minha avó, Maria de Lourdes e meu pai, Arlindo, por sempre apoiarem minhas decisões e acreditarem em mim – até quando não fui capaz de fazer o mesmo. Obrigada por todo apoio e suporte em mais essa jornada!

Ao meu avô, Petronilio, por ter dado tudo de si à nossa família e por sempre se lembrar de mim. Sua história não será esquecida!

Aos meus amigos que conheci em Ribeirão Preto, em especial Camila, Isabela, Isadora, Mariana, Tamara, Samuel, Júlia e Lara, por toda amizade e momentos compartilhados. Nem sempre essa jornada foi fácil, mas felizmente tive o prazer de contar com cada um de vocês em todo o trajeto.

Aos meus amigos da Biologia (Turma de 2020), Ana Carolina e Pedro. Sou imensamente grata por manter essa amizade ao longo dos anos e quilômetros de distância.

Aos meus amigos de Guiratinga, em especial Sérgio Silva, por todo apoio em mais de 10 anos de amizade.

Às agências de fomento FAPESP, CNPq e CAPES, pelo apoio financeiro que tornou possível a realização deste trabalho.

Ao laboratório de Imunidade Inata e Patogênese Microbiana, pela estrutura física necessária para a realização desse trabalho.

FONTES DE FINANCIAMENTO

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), nº do processo de bolsa 2020/06177-3. Os projetos do laboratório também são financiados pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

“Os cientistas dizem que somos feitos de átomos,
mas um passarinho me contou que somos feitos
de histórias.”

Eduardo Galeano

Lopes, Letícia de Sousa. Otimização do sistema de deleção gênica por CRISPR-Cas9 em macrófagos e avaliação de genes potencialmente envolvidos na ativação do inflamassoma de NLRC4. 2022, 84 p. Dissertação de mestrado (Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP.

RESUMO

O inflamassoma é um complexo multiproteico envolvido na ativação de caspases inflamatórias em resposta a sinais ambientais ou a patógenos. Após o reconhecimento do ligante, o complexo inflamassoma é formado e medeia a clivagem e ativação de pró-IL-1 β e pró-IL-18, além de gasdermina-D, levando a secreção das citocinas em suas formas ativas e a morte celular inflamatória, conhecida como piroptose. Dentre os diferentes inflamassomas, NLRC4 e NLRP3 são os mais estudados. O inflamassoma de NLRC4 apresenta um papel crucial na defesa do hospedeiro contra patógenos intracelulares, incluindo *Salmonella*, *Shigella*, *Legionella* e *Pseudomonas*. Além disso, já foi descrito que mutações no gene de NLRC4 estão ligadas ao aparecimento e progressão de doenças inflamatórias como MAS (Macrophage Activation Syndrome), e enterocolite de início neonatal. Apesar de ser um dos inflamassomas mais estudados, mecanismos envolvidos na ativação e regulação da via de NLRC4 ainda precisam ser identificados. Neste trabalho, nós otimizamos o protocolo de deleção gênica por CRISPR-Cas9, gerando macrófagos primários derivados de medula óssea nocautes para os genes de ASC e NLRC4. Além disso, baseado em ensaios fenotípicos de replicação de *L. pneumophila*, observamos que a possível deleção dos nossos genes de interesse não levou ao aumento da replicação bacteriana, sugerindo que as proteínas não apresentam papel relevante para a via do inflamassoma de NLRC4.

Palavras-chave: inflamassoma, NLRC4, imunidade inata, CRISPR-Cas9, deleção gênica

Lopes, Letícia de Sousa. Optimization of the CRISPR-Cas9 gene deletion system in macrophages and evaluation of genes potentially involved in NLRC4 inflammasome activation. 2022, 84 p. Dissertação de mestrado (Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP.

ABSTRACT

The inflammasome is a multiprotein complex involved in the activation of inflammatory caspases in response to environmental signals or pathogens. After ligand recognition, the inflammasome complex is formed and mediates the cleavage and activation of pro-IL-1 β and pro-IL-18, as well as gasdermin-D, leading to the secretion of cytokines in their active forms and inflammatory cell death, known as pyroptosis. Among the different inflammasomes, NLRC4 and NLRP3 are the most studied. The NLRC4 inflammasome plays a crucial role in host defense against intracellular pathogens, including *Salmonella*, *Shigella*, *Legionella* and *Pseudomonas*. Furthermore, mutations in the NLRC4 gene have been described to be linked to the onset and progression of inflammatory diseases such as MAS (Macrophage Activation Syndrome), and neonatal onset enterocolitis. Despite being one of the most studied inflammasomes, mechanisms involved in the activation and regulation of the NLRC4 pathway have yet to be identified. In this work, we optimized the CRISPR-Cas9 technique in bone marrow-derived macrophages for the deletion of genes previously identified in our laboratory, in order to evaluate a possible role in NLRC4 inflammasome activation in response to *Legionella pneumophila* infection. Throughout this project we were able to standardize and optimize the gene deletion protocol by CRISPR Cas9, generating primary bone marrow-derived macrophages nocautes for ASC and NLRC4 genes. Furthermore, we observed that the possible deletion of our genes of interest, did not lead to increased bacterial replication, suggesting that the deleted proteins do not seem to play a relevant role in the functions of the NLRC4 inflammasome.

Keywords: inflammasome, NLRC4, innate immunity, CRISPR-Cas9, genetic deletion

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Os três estágios do Sistema de Imunidade Adaptativa Bacteriana de CRISPR-Cas.....	22
Figura 2. A biologia do Sistema CRISPR-Cas9 (<i>S. pyogenes</i>).....	25
Figura 3. Receptores de Reconhecimento de Padrões Moleculares.....	31
Figura 4. O complexo inflamassoma NLRC4.....	34
Figura 5. Exemplo de oligonucleotídeo desenhado.....	40
Figura 6. Desenho experimental do sgRNA ASC.....	49
Figura 7. Representação esquemática das principais regiões do plasmídeo lentiGuide Puro.....	49
Figura 8. Clonagem do sgRNA de ASC em vetor lentiGuide Puro.....	50
Figura 9. Confirmação da deleção de ASC por Western Blot.....	51
Figura 10. Dosagem de IL-1 β realizada por ELISA confirma a deleção de ASC.....	52
Figura 11. Confirmação da clonagem dos sgRNAs dos genes <i>Ccar1</i> , <i>Smchd1</i> , <i>Pdia3</i> , <i>Ifi204</i> , <i>Hspa9</i> , <i>S100a4</i> , <i>Myh9</i> e <i>Dhx9</i> em vetor lentiGuide Puro.....	56
Figura 12. Ensaio de replicação bacteriana em BMDMs transduzidos com sgRNAs para os genes <i>Ccar1</i> , <i>Smchd1</i> , <i>Pdia3</i> e <i>Ifi204</i>	58
Figura 13. Ensaio de replicação bacteriana em BMDMs transduzidos com sgRNAs para o gene <i>Pdia3</i>	58
Figura 14. Ensaio de replicação bacteriana em BMDMs transduzidos com sgRNAs para os genes <i>Ccar1</i> e <i>Ifi204</i>	59
Figura 15. Ensaio de replicação bacteriana em BMDMs transduzidos com sgRNAs para os genes <i>Hspa9</i> e <i>Smchd1</i>	59
Figura 16. Ensaio de replicação bacteriana em BMDMs transduzidos com sgRNAs para os genes <i>Ccar1</i> e <i>S100a4</i>	60
Figura 17. Ensaio de replicação bacteriana em BMDMs transduzidos com sgRNAs para os genes <i>Myh9</i> e <i>Dhx9</i>	60
Figura 18. Dosagem de IL-1 β por ELISA para investigação do papel de <i>Dhx9</i> e <i>Myh9</i> na via de sinalização dos inflamassomas de NLRP3 e AIM2.....	62
Figura 19. Esquema da via de NAIP5-NLRC4.....	63

Figura 20. Representação esquemática das principais regiões do plasmídeo lentiCRISPR v2.	65
Figura 21. Digestão do plasmídeo lentiCRISPR v2.	66
Figura 22. Confirmação da clonagem dos sgRNAs em vetor lentiCRISPR v2.	67
Figura 23. Ensaio de replicação com <i>L. pneumophila</i> em macrófagos B6 e Cas9 transduzidos com vetores lentiGuide Puro e lentiCRISPR v2.....	69
Figura 24. PCR convencional revela presença da sequência nucleotídica de Cas9 em BMDMs transduzidos com lentiCRISPR v2-sgRNA NLRC4 e lentiGuide Puro-sgRNA NLRC4.	70
Figura 25. PCR convencional revela presença da sequência nucleotídica de Cas9 em BMDMs transduzidos com lentiCRISPR v2-sgRNA NLRC4, sgRNA FKBP4 e sgRNA VCP.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Primers para reações de PCR convencional	43
Tabela 2 - Lista de genes que potencialmente interagem com o inflamassoma de NLRC4.....	53
Tabela 3 - Novos alvos selecionados para estudo da via de sinalização do inflamassoma de NLRC4.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS

A

ALR – *AIM2-like receptors*

AIM2 – *absent in melanoma 2*

ASC – *apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*

B

BMDMs – *Bone Marrow derived Macrophage Cells*

C

Cas – *CRISPR associated protein*

CARD – *Caspase Recruitment Domain*

cDNA- *DNA complementar*

CRISPR- *Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats*

crRNA – *CRISPR-derived RNA*

CLR – *C-type lectin receptors*

D

DNA – *ácido desoxirribonucleico*

H

HDR – *Homology Directed Repair*

HIV – *vírus humano da imunodeficiência*

I

IFN – *Interferon*

IL - *Interleucina*

K

KI – *Knock-in*

KO – *Knock-out*

L

LCV – *Legionella-containing vacuole*

LPS – Lipopolissacarídeo

M

MOI – *multiplicity of infection*

N

NAIP – *Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein*

NHEJ - *Non-homologous end joining*

NLR – *NOD-like receptors*

P

PAM – *Protospacer Adjacent Motif*

PAMPs - Padrões moleculares associados ao patógeno

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PITs – *Pore-Induced Intracellular Traps*

PRR – Receptores de reconhecimento de padrões

R

RLR – *RIG-I-like receptors*

RNA – Ácido ribonucleico

RNAg – RNA guia

S

sgRNA – *single guide RNA*

T

TLR- *Toll like receptors*

tracrRNA – crRNA de ativação em trans

TALENs – *Transcriptional Activator-Like Effector Nucleases*

W

WT – Wild type

Z

ZFNs – *Zinc Finger Nucleases*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
1.1 Descoberta do locus CRISPR	20
1.2 Mecanismo biológico do sistema CRISPR-Cas.....	21
1.3 Classificação dos sistemas CRISPR-Cas	22
1.4 O sistema de CRISPR-Cas9	24
1.5 CRISPR-Cas9 como uma ferramenta de edição gênica.....	25
1.6 Vetores virais e a entrega dos componentes CRISPR	26
1.7. Aplicações da técnica de CRISPR	28
1.8 Imunidade Inata	29
1.9 Receptores de reconhecimento de padrões moleculares	30
1.10 Os complexos de inflamassoma.....	31
1.11 Inflamassoma de NLRC4	32
1.12 O modelo de infecção por <i>Legionella pneumophila</i>	34
2. JUSTIFICATIVA	37
3. OBJETIVOS	39
3.1 Objetivo geral	39
3.2 Objetivos específicos	39
4. MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1 Edição gênica por CRISPR-Cas9.....	40
4.2 Digestão dos plasmídeos lentiCRISPR v2 e lentiGuide Puro.....	41
4.3 Clonagem dos sgRNAs nos vetores plasmidiais	41
4.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	42
4.5 Transfecção em células HEK 293	44
4.6 Uso de animais.....	44
4.7 Diferenciação de macrófagos derivados de medula óssea	44
4.8 Ensaios de replicação bacteriana <i>in vitro</i> utilizando <i>Legionella pneumophila</i>	45
4.9 Ensaio de ativação de diferentes inflamassomas.....	45
4.10 Dosagem de IL-1 β por ELISA.....	45
4.11 Extração de proteínas e Western Blot.....	46
4.12 Extração de DNA genômico	46

4.13	Análise estatística	47
5.	RESULTADOS	48
5.1	Otimização do sistema CRISPRCas9 em macrófagos derivados de medula óssea	48
5.1.1	Clonagem do sgRNA de ASC em vetor plasmidial.....	49
5.1.2	Deleção de ASC em macrófagos primários derivados de medula óssea	50
5.2	Avaliação do papel de novos genes na via de sinalização de NLRC4 por meio do sistema CRISPR-Cas9.....	52
5.2.1	Identificação e seleção de proteínas que interagem com NLRC4	52
5.2.2	Clonagem dos sgRNAs em vetor lentiGuide-Puro	55
5.2.3	Ensaio de replicação bacteriana com <i>L. pneumophila</i> em macrófagos transduzidos com sgRNAs referentes aos genes de interesse	56
5.3	Seleção de novos genes possivelmente envolvidos com a via de sinalização do inflamassoma de NLRC4	63
5.3.1	Clonagem dos sgRNAs em vetor plasmidial lentiCRISPR v2.....	64
5.3.2	Ensaio de replicação bacteriana com <i>L. pneumophila</i> em macrófagos transduzidos com sgRNAs referentes aos novos genes alvo.....	67
6.	DISCUSSÃO	72
7.	CONCLUSÃO.....	76
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

1. INTRODUÇÃO

1.1. Descoberta do lócus CRISPR

No ano de 1987, um grupo de cientistas liderado por Yoshizumi Ishino na Universidade de Osaka (Japão) descobriu uma região singular no genoma de *Escherichia coli*. Em 2002, ela receberia o nome de CRISPR (do inglês *Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats*): uma região composta por sequências repetidas e sequências espaçadoras intercaladas (Ishino et al., 1987; Jansen et al., 2002). Alguns anos depois, um grupo de genes próximo ao lócus CRISPR foi descoberto, sendo denominado genes *Cas* (*CRISPR associated genes*) (Jansen et al., 2002). Este conjunto de genes foi caracterizado e é responsável por codificar enzimas que apresentam domínios nucleases, helicases e polimerases (Bolotin et al., 2005; Mojica et al., 2005; Jansen et al., 2002; Haft et al., 2005). No ano de 2008, foi demonstrado que um RNA maduro é o responsável por direcionar o complexo de proteínas Cas para seu sítio de ação, onde Cas interfere na replicação do fago através da clivagem de seu genoma (Marraffini e Sontheimer, 2008). Posteriormente, a origem deste RNA – então chamado crRNA ou CRISPR-derived RNA – foi descoberta: o crRNA é derivado da transcrição do lócus CRISPR após processamento por enzimas (Makarova et al., 2011). Três grupos independentes de pesquisadores revelaram que as sequências espaçadoras encontradas dentro do lócus CRISPR possuíam uma origem extracromossômica, derivando de plasmídeos ou de vírus. Além disso, também foi descrito que as bactérias que possuem espaçadores cujas sequências são similares a trechos do genoma de determinado vírus não são infectadas pelos mesmos. Com isso, sugeriu-se que o sistema CRISPR-Cas atua como um mecanismo de defesa adaptativa, apresentando a memória de agressões genéticas passadas (Bolotin et al., 2005; Mojica et al., 2005; Pourcel et al., 2005).

1.2. Mecanismo biológico do sistema CRISPR-Cas9

O sistema CRISPR-Cas9 é um mecanismo de defesa adaptativa que leva a uma proteção contra a reinvasão de plasmídeos, bacteriófagos e transpósons (Sampson e Weiss, 2014). Esta imunidade adaptativa ocorre em três estágios: aquisição ou adaptação, biogênese do crRNA e interferência (Figura 1).

Durante a primeira etapa – adaptação – ocorre a integração de sequências de DNA do invasor como espaçadores entre as sequências repetidas no locus de CRISPR, quando a bactéria é infectada pela primeira vez pelo vírus (Makarova et al., 2011). Nesta etapa são necessárias enzimas Cas1 e Cas2, responsáveis por clivar o DNA do patógeno e integrá-los como espaçadores no locus CRISPR.

A segunda etapa – biogênese do crRNA – é marcada pela transcrição dos precursores do RNA de CRISPR (ou pré-crRNA), um longo transcrito do locus CRISPR. O pré-crRNA possui várias sequências repetidas e espaçadores em uma única molécula de RNA. Com a ajuda da enzima RNase III e da molécula de tracrRNA, os pré-crRNAs são processados em crRNAs maduros que correspondem cada um a um espaçador específico. O tracrRNA hibridiza com sequências repetidas presentes no pré-crRNA, sendo indispensável para a maturação em crRNA (Deltcheva et al., 2011).

Na última fase – interferência – o complexo de duplex tracrRNA:crRNAs e Cas9 são formados. Nesta etapa, enquanto o crRNA reconhece por complementariedade as sequências exógenas, a porção do tracrRNA se liga à Cas9 e esta, por sua vez, é capaz de clivar a sequência alvo. Para que haja o reconhecimento do complexo com a sequência, é necessário a presença de uma região PAM adjacente (do inglês *Protospacer Adjacent Motif*). A enzima Cas9 derivada de *Streptococcus pyogenes*, a mais utilizada nos sistemas de edição gênica por CRISPR-Cas9, necessita de uma região PAM NGG adjacente, ou seja, uma sequência com algum nucleotídeo (N) seguido de duas guaninas (GG) para que ocorra a interação com o complexo tracrRNA:crRNA:Cas9.

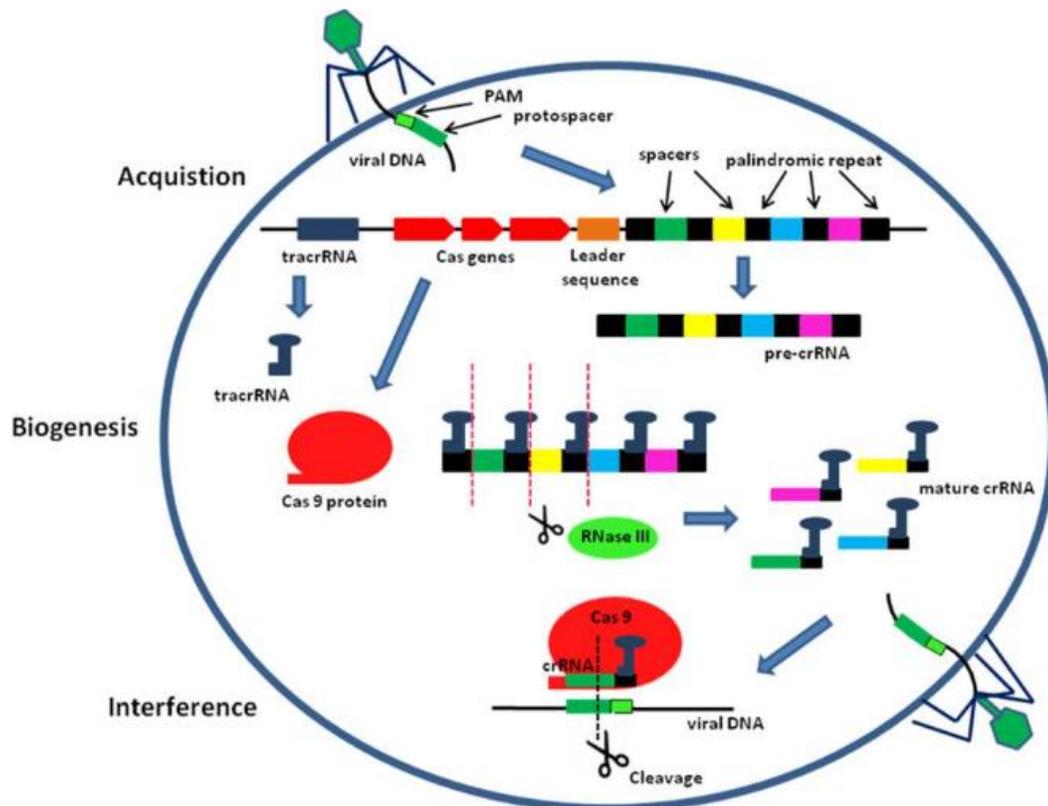


Figura 1. Os três estágios do Sistema de Imunidade Adaptativa Bacteriana de CRISPR-Cas.

Adaptado de Hryhorowicz et al (2017).

1.3. Classificação dos sistemas CRISPR-Cas

A principal classificação do sistema CRISPR-Cas o divide em três grupos distintos baseados na organização de seus lócus e na presença de diferentes enzimas Cas. Essa classificação representa a evolução de um sistema de defesa em mecanismos moleculares específicos tanto para expressão e processamento de crRNAs como para o próprio processo de interferência contra o DNA invasor (Makarova et al., 2011).

O sistema CRISPR-Cas do Tipo I é composto por um complexo associado a CRISPR para defesa antiviral, composto pelas enzimas Cas5, Cas6, Cas7 e Cas8 e pela enzima Cas3 – uma helicase com atividade de ATPase. Em alguns casos, o domínio helicase da Cas3 se encontra fundido a um domínio com atividade de endonuclease, sendo capaz de clivar DNA de forma direcionada (Sinkunas et al., 2011), sendo a responsável pela destruição do material exógeno. O complexo é direcionado ao DNA

exógeno pelo reconhecimento da região PAM (*Protospacer Adjacent Motif*), presente em seu genoma.

O sistema CRISPR-Cas do Tipo II, por sua vez, é considerado o mais simples, tendo seu locus formado pela região de repetição e de três a quatro genes Cas. Os genes Cas1 e Cas2 codificam enzimas necessárias à obtenção dos espaçadores (YOSEF et al., 2012), enquanto o gene Cas9 codifica uma endonuclease capaz de degradar o DNA exógeno. Ao contrário dos outros sistemas que utilizam suas próprias moléculas Cas para clivagem do pré-crRNA, o sistema do tipo II necessita de uma RNase III, uma molécula endógena capaz de realizar a etapa de processamento, gerando os crRNAs maduros (Haurwitz et al., 2010). Além disso, o sistema também conta com uma molécula de RNA não codificante especializado, conhecido como tracrRNA (do inglês *trans-activating* RNA). O gene de tracrRNA se encontra próximo ou dentro do operon dos genes Cas, e é responsável por codificar uma molécula complementar a sequência repetida do pré-crRNA, auxiliando sua maturação por intermédio da RNase III (Deltcheva et al., 2011). Além disso, ainda pareada ao crRNA, o tracrRNA participa do complexo com Cas9 no momento de reconhecimento e interação com o DNA alvo. Assim como no sistema do tipo I, para que o reconhecimento e clivagem da sequência alvo seja eficaz, o sistema tipo II também necessita de um domínio PAM.

Da mesma maneira que o sistema CRISPR-Cas do Tipo I, o Tipo III utiliza um complexo de proteínas Cas para atingir seu alvo, tendo Cas6 como a proteína responsável pela etapa de processamento e Cas10 no processo de interferência (Shabbir et al., 2016). Além disso, ele é subdividido em dois subtipos: III-A e III-B. As diferenças entre esses dois subtipos se resumem aos componentes do complexo Cas e ao alvo de degradação: enquanto o subtipo III-A forma um complexo com a proteína *csm* e é capaz de degradar DNA invasor, o subtipo III-B utiliza a proteína *cmr* e degrada RNA invasor. Em ambos os subtipos a presença de um domínio PAM para o reconhecimento da sequência-alvo e sua clivagem não é necessária (Makarova et al., 2011).

Um dos grandes desafios para a classificação do sistema CRISPR-Cas é a rápida evolução da maioria dos genes Cas, além da grande variabilidade da arquitetura do locus CRISPR-Cas. Apesar de toda variação e acréscimo de novos sistemas com o aumento das descobertas sobre o sistema, um esquema de classificação consistente é

indispensável para o progresso da pesquisa envolvendo o CRISPR (Makarova et al., 2011).

1.4. O Sistema de CRISPR-Cas9

Tendo sido inicialmente descoberto como um mecanismo de defesa bacteriano, logo o sistema CRISPR-Cas9 se tornou a ferramenta de edição gênica mais utilizada da década. Em comparação com os demais sistemas CRISPR, seu mecanismo de ação é considerado simples, sendo composto apenas por algumas moléculas. Em bactérias e arqueias, o sistema CRISPR-Cas9 é composto por três componentes: uma endonuclease Cas9 e duas moléculas de RNA (crRNA e tracrRNA).

A enzima Cas9 conta com aproximadamente 800 a 1400 aminoácidos e apresenta dois domínios com atividades nucleásicas: enquanto o domínio HNH cliva o DNA complementar ao RNA guia, o domínio RuvC é o responsável por clivar a fita de DNA oposta a complementar. Além disso, a Cas9 também apresenta um domínio PI – responsável pela interação com a região PAM da sequência alvo, e um domínio WED, importante para o reconhecimento do RNA guia ou do complexo crRNA:tracrRNA (Makarova et al, 2011; Chen et al., 2014).

O tracrRNA é uma molécula complementar a sequência repetida do pré-crRNA, sendo necessária para o processamento dos pequenos crRNAs e também formando o duplex tracrRNA:crRNA, componente do complexo com a Cas9. Já o crRNA maduro possui aproximadamente 20 pares de base complementares a região alvo no DNA genômico. Além de participar da etapa de maturação dos crRNAs, o tracrRNA é indispensável para a ligação com a enzima Cas9. Sendo assim, enquanto o crRNA se anela por complementariedade a sequência alvo, o tracrRNA se associa a Cas9, levando a formação do complexo que irá clivar a região alvo.

No sistema CRISPR tipo II, para que a enzima Cas9 realize uma quebra de fita dupla do DNA, a presença de um domínio PAM adjacente a sequência alvo é indispensável. A enzima Cas9 de *Streptococcus pyogenes* reconhece a sequência PAM 5'-NGG-3', uma vez que seu domínio PI contém dois resíduos de arginina que interagem com os dinucleotídeos GG dentro da região PAM. A ligação do complexo com a região

PAM inicia a separação das fitas de DNA, facilitando a formação do heteroduplex de RNA-DNA (Anders et al., 2014). A forte ligação do RNA com o DNA alvo leva a separação do DNA e, posteriormente, a ativação dos domínios RuvC e HNH da enzima Cas9 conduzem a quebra de dupla fita do DNA cerca de 3 nucleotídeos da região PAM dentro da sequência alvo (Jinek et al., 2012; Gasiunas et al., 2012) (Figura 2).

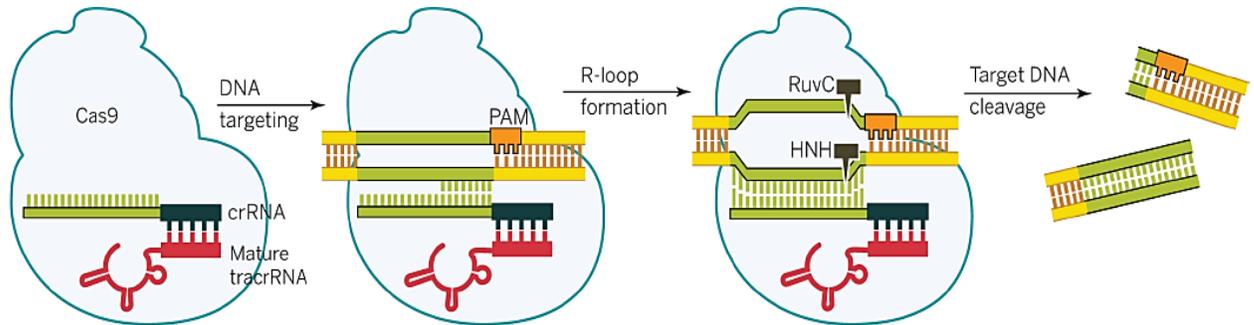


Figura 2. A biologia do Sistema CRISPR-Cas9 (*S. pyogenes*). A formação do complexo Cas-crRNA-tracrRNA leva à identificação de uma sequência complementar adjacente a uma região PAM. O domínio PI da enzima Cas9 é o responsável por reconhecer a região PAM. Posteriormente, a ativação dos domínios RuvC e HNH da enzima Cas9 conduzirá a quebra de fita dupla. Adaptado de Doudna e Charpentier (2014).

A quebra de fita dupla gerada pode levar a danos irreversíveis às células procarióticas e eucarióticas, como apoptose ou senescência. Para se proteger desse processo, as células iniciam mecanismos de reparo do DNA, que ocorrem por meio da junção de pontas não homólogas (NHEJ em inglês, *non-homologous end joining*) ou por reparo direcionado por homologia (HDR em inglês, *homology directed repair*). O reparo por NHEJ liga rapidamente as fitas de DNA danificadas, mas acabam gerando mutações por pequenas inserções ou deleções (*indels*) na região alvo. O mecanismo de reparo por HDR, por sua vez, ocasiona a inserção de sequências de DNA desejadas na região clivada utilizando um template de DNA homólogo a região alvo (Gratz et al., 2013).

1.5. CRISPR-Cas9 como uma ferramenta de edição gênica

Desde o advento dos estudos em biologia molecular, vários cientistas tentaram desenvolver tecnologias capazes de manipular o genoma das células. Com os avanços

realizados nas últimas décadas, ferramentas para editar e regular o genoma se tornaram mais simples e fáceis de serem utilizadas (Wang et al., 2016).

Anteriormente a aplicação do sistema CRISPR-Cas como uma ferramenta de edição gênica, várias outras técnicas foram amplamente utilizadas, como o caso das ZFNs (*Zinc Finger Nucleases*) e TALENs (*Transcriptional Activator-Like Effector Nucleases*). Os sistemas de ZFNs e TALENs são compostos por proteínas capazes de reconhecer sequências específicas de DNA, diferindo do sistema CRISPR-Cas que utiliza uma molécula de RNA para edição (Shabbir et al., 2016).

Após a descoberta da enzima Cas9 e da importância da molécula de tracrRNA para a maturação do crRNA, o sistema CRISPR-Cas9 foi descrito como um mecanismo que utiliza um duplex de tracrRNA:crRNA para direcionar a clivagem do DNA por uma endonuclease Cas9 (Deltcheva et al., 2011; Jinek et al., 2012).

Algum tempo depois, cientistas criaram um RNA quimérico composto pelo crRNA e tracrRNA. O chamado RNA guia, consiste em 20 nucleotídeos na extremidade 5' que determina o alvo ao DNA pelo pareamento de bases e uma estrutura na extremidade 3' capaz de se ligar a enzima Cas9. A criação do RNA guia facilitou a aplicação do sistema CRISPR-Cas9 como uma ferramenta para edição gênica (Jinek et al., 2012).

Com a criação do RNA guia no ano de 2012, vários pesquisadores demonstraram a aplicação do sistema CRISPR como técnica para editar o genoma dos mais diferentes organismos. Um ano após a descoberta, foi demonstrado pela primeira vez que o sistema CRISPR de *Streptococcus pyogenes* pode ser eficientemente utilizado em células de mamíferos para editar seu genoma. Esse estudo viabilizou aplicações da edição gênica em células de mamíferos para diferentes áreas, como ciência básica, biotecnologia e medicina (Cong et al., 2013).

1.6. Vetores virais e a entrega dos componentes CRISPR

Com o advento da utilização do sistema CRISPR-Cas como uma ferramenta de edição gênica, várias formas de entrega de seus componentes para células ou organismos vêm sendo elaboradas. Métodos de entrega por meio de vetores – virais ou

não virais – ou por meio de métodos físicos são amplamente utilizados para aumentar a eficácia do sistema em seus alvos (Chandrasekaran et al., 2018).

Métodos de entrega por vírus são baseados em mecanismos de infecção e replicação: durante a fase de infecção, os vírus são capazes de infectar a célula hospedeira e liberar seu genoma viral no núcleo ou citoplasma, enquanto na fase de replicação ocorre a reprodução dos virions na célula, levando a infecção de células vizinhas e a continuação do ciclo de infecção (Vannucci et al., 2013). Os vetores virais mais utilizados para entregar os componentes CRISPR são os adenovírus, vírus adenoassociados e os lentivírus.

Os adenovírus são vírus não envelopados que apresentam um capsídeo icosaédrico de proteínas com aproximadamente 90 nm de diâmetro (Flint e Nemerow, 2017). O sistema de entrega mediada por adenovírus é empregado tanto para aplicações *in vivo* como *in vitro*. Após infectar a célula alvo, os adenovírus se mantêm como um epissoma dentro do núcleo, diminuindo as chances de integração com o genoma hospedeiro e, conseqüentemente, o risco de inserções mutagênicas indesejadas (Chen et al., 2018). Apesar da alta imunogenicidade limitar a sua utilização em terapias gênicas, seu alto nível de expressão de proteínas virais durante a replicação os tornam vetores virais amplamente utilizadas para diversos experimentos (Chandrasekaran et al., 2018; Vannucci et al., 2013).

Assim como os adenovírus, os vírus adenoassociados apresentam um capsídeo icosaédrico sem envelopamento. Como um sistema de entrega de componentes, os vírus adenoassociados podem integrar no genoma hospedeiro em um sítio específico do cromossomo 19 (19q13.4) ou persistir como epissomas (Samulski e Muzyczka, 2014). Apresentam uma alta eficiência de infecção tanto em células em divisão como quiescentes, além de uma longa expressão de seus transgenes (Mingozzi e High, 2011). Na maioria dos casos, os vírus adenoassociados exibem baixa patogenicidade e citotoxicidade para transdução celular, sendo mais recomendados para entregas *in vivo* que os adenovírus. Uma das maiores desvantagens da aplicação do vírus adenoassociado é seu pequeno tamanho de empacotamento de apenas 5 kb, um fator limitante para aplicações de complexos de genes maiores (Chen et al., 2018).

Os lentivírus, por sua vez, são derivados do vírus da imunodeficiência humana (HIV), compostos pelos seguintes genes: *gag*, *pol*, e *env*. Os genes *gag* codificam proteínas estruturais, os genes *pol* codificam enzimas necessárias a integração no genoma hospedeiro, enquanto que os genes *env* codificam as glicoproteínas do envelope viral (Escors e Breckpot, 2010). Os vetores lentivirais são amplamente utilizados para experimentos *in vitro* por causa de sua capacidade de carregar longos transgenes (cerca de 9.7kb), de se integrar ao genoma do hospedeiro – expressando os transgenes por longos períodos, além de infectar uma grande variedade de células, incluindo células difíceis de transduzir como neurônios, macrófagos e células linfoides (Naldini et al., 1996; Vannucci et al., 2013).

1.7. Aplicações da técnica de CRISPR

Desde os primeiros estudos realizados, a técnica de CRISPR-Cas9 se tornou amplamente utilizada nos mais diferentes laboratórios ao redor do mundo. Sua fácil aplicabilidade permitiu a edição do genoma de diversos tipos celulares e organismos, podendo ser empregado em diferentes contextos, como por exemplo: para analisar a função de genes eucariotos ou procariotos, estudar a progressão do câncer e outras doenças, possibilitar a correção de mutações genéticas responsáveis por doenças hereditárias, criar animais geneticamente modificados, entre outros (Doudna e Charpentier, 2014).

O estudo de uma proteína pode ocorrer de diversas formas, entre elas, por meio da inativação do gene em questão, onde o mesmo pode ser nocauteado ou deletado por inteiro. No primeiro caso, mutações são induzidas no gene alvo, levando a perda da atividade de seu produto final. Com a utilização do sistema CRISPR-Cas9, as mutações são ocasionadas por meio do reparo por NHEJ ou HDR após a clivagem do DNA pela enzima Cas9. No segundo caso, para que um gene seja deletado por inteiro é necessário que uma ou duas quebras de fita dupla sejam geradas (Sander e Joung, 2014; Mei et al., 2016). A aplicação do sistema de CRISPR-Cas9 como uma forma de nocautear ou inserir um gene em células pode ampliar o conhecimento sobre diferentes tópicos, como por exemplo de possibilitar a correção de mutações genéticas responsáveis por doenças

hereditárias (Doudna e Charpentier, 2014).

A versatilidade do sistema CRISPR-Cas possibilitou sua aplicação não apenas em estudos de edição de genes, como também para outras manipulações no genoma e cromatina. Muitas dessas aplicações alternativas são amplamente utilizadas através da utilização da enzima Cas9 cataliticamente inativa. Com a inativação de apenas um domínio da enzima, a Cas9 se torna uma nickase clivando apenas uma fita de DNA. Caso a inativação ocorra em ambos os domínios, a Cas9 – agora chamada de dCas9 – perde toda sua função catalítica, mas mantém a capacidade de ligação ao DNA, podendo ser utilizada para ativar ou reprimir a transcrição de genes, além de ser aplicada na edição epigenética (Dominguez et al., 2016; Adli, 2018).

A necessidade de diagnósticos mais precisos para detecção de doenças e microrganismos também revelou uma nova aplicação para o sistema CRISPR-Cas. A descoberta da enzima Cas13a (Shmakov et al., 2015) e Cas12a (Xie e Yang, 2013) transformou os métodos para detectar ácidos nucleicos. Um dos primeiros métodos descritos, conhecido como SHERLOCK (do inglês *Specific High-Sensitivity Enzymatic Reporter Unlocking*), utiliza o complexo crRNA:Cas13a e resulta em um sinal fluorescente capaz de detectar a presença de RNAs pertencentes a patógenos (Gootenberg et al., 2017). Outras técnicas similares foram descritas, como a DETECTR (*DNA endonuclease-target CRISPR trans repórter*) e HOLMES, onde ambas utilizam um complexo composto da enzima Cas12a e utilizam repórteres fluorescentes para detecção de moléculas de RNA (Chen et al., 2018; Li S-Y et al., 2018). O grande potencial da aplicação do sistema CRISPR-Cas para o rápido diagnóstico de moléculas foi observado durante a pandemia por COVID-19, ocasionada pelo vírus emergente SARS-CoV-2. Diversas ferramentas de diagnóstico foram rapidamente desenvolvidas para testes diagnósticos de alta sensibilidade para o vírus, revelando o grande potencial que esses sistemas possuem para auxiliar a detecção de doenças emergentes e diagnósticos médicos em geral (Broughton et al., 2020; Ding et al., 2020; Lucia et al., 2020).

1.8. Imunidade inata

O sistema imunológico humano pode ser classificado em sistema imune inato e sistema imune adaptativo. Os linfócitos T e B são as principais células do sistema imune adaptativo e são capazes de criar uma defesa específica adquirida após o contato com patógenos. Já o sistema imune inato constitui a primeira linha de defesa do organismo, composto por uma vasta gama de células de origem hematopoética, como macrófagos, células dendríticas, mastócitos, neutrófilos, eosinófilos e células natural killer, e não hematopoiéticas, como células da pele, do trato respiratório, gastrointestinal e geniturinário. O sistema imune inato é composto por uma grande variedade de receptores capazes de detectar estruturas conservadas por vários grupos de patógenos. Após a exposição aos patógenos, as células da imunidade inata iniciam uma resposta inflamatória protetiva que pode culminar com a subsequente ativação da resposta imune adaptativa (Turvey et al., 2010).

1.9. Receptores de reconhecimento de padrões moleculares

Devido a sua relação direta com os hospedeiros, ao longo da evolução os patógenos desenvolveram mecanismos para escapar da detecção dos componentes da imunidade inata. Da mesma forma, o sistema imune inato também evoluiu paralelamente a estes patógenos. Por exemplo, com o tempo foi adquirida a capacidade de reconhecer componentes altamente conservados e essenciais para a viabilidade e virulência desses patógenos, estruturas que não seriam alvos de modificações.

A detecção de patógenos ocorre por meio de receptores de reconhecimento de padrões moleculares (ou PRRs, do inglês *pattern recognition receptors*) presentes em espaços intracelulares ou extracelulares. Os PRRs são ativados por estruturas conservadas presentes em patógenos, conhecidos como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, do inglês *pathogen-associated molecular patterns*) ou por danos moleculares associados a patógenos (DAMPs, do inglês *danger-associated molecular patterns*). Ambas levam a respostas da imunidade inata via ativação de vias de sinalização que culminam com a produção e secreção de citocinas e quimiocinas, além de um processo inflamatório capaz de recrutar e ativar outras células – etapas importantes para o controle de infecções (Kumar et al., 2011; Medzhitov, 2009).

Os PRRs são classificados em cinco grandes famílias: TLRs (*Toll-like receptors*), CLRs (*C-type lectin receptors*), NLR (*NOD-like receptors*), RLRs (*RIG-I-like receptors*) e ALRs (*AIM2-like receptors*) (Kumar et al., 2011). Enquanto os receptores do tipo TLR e CLR são encontrados na superfície das células ou em compartimentos endocíticos, os NLRs, RLRs e ALRs se localizam no citoplasma, reconhecendo patógenos intracelulares (Brubaker et al., 2015) (Figura 3).

Após a indução da resposta imune inata pelo reconhecimento de PAMPs ou DAMPs pelos PRRs ocorre a transcrição de moléculas que levam a produção de citocinas pró-inflamatórias e interferons (IFNs), além da indução de fagocitose, autofagia e morte celular (Brubaker et al., 2015).

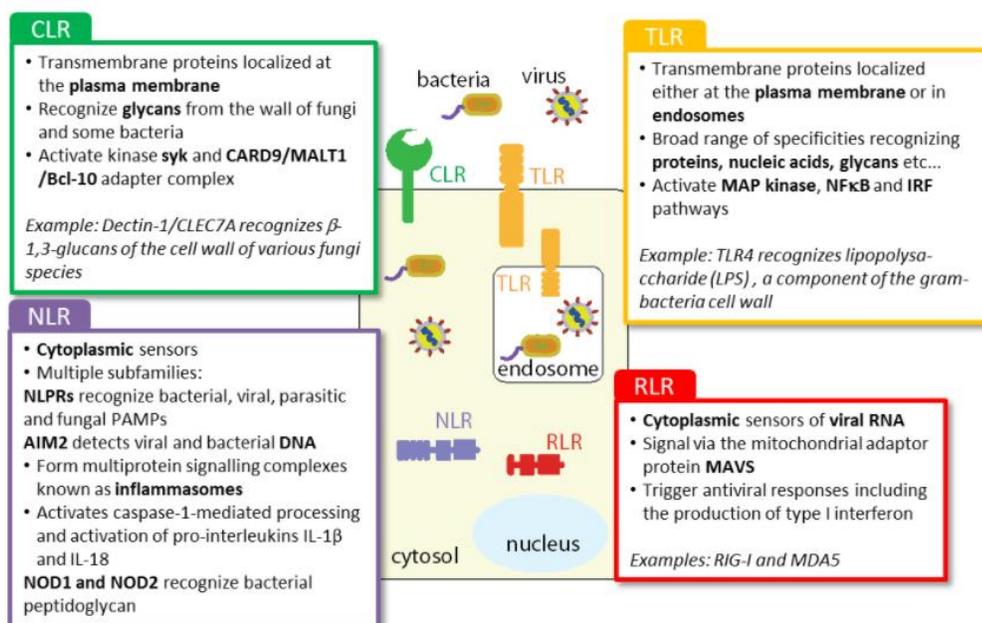


Figura 3. Receptores de reconhecimento de padrões moleculares. Adaptado de *British Society for Immunology*.

1.1. Os complexos de inflamassoma

No ano de 2002, Tschopp e colaboradores descreveram um complexo de alto peso molecular presente no citosol de células do sistema imune, formado após o reconhecimento de diversos sinais, incluindo estruturas presentes em patógenos e ambientais. Esse complexo está envolvido na ativação de caspases inflamatórias, culminando com a produção de citocinas pró-inflamatórias e morte celular conhecida

como piroptose (Martinon et al., 2002).

Até o momento atual sabe-se da existência de seis inflamassomas: NLRP1, NLRP6, NLRP12, AIM2, NLRC4/IPAF, e NLRP3. O inflamassoma de NLRP1 foi o primeiro NLR (*nucleotide oligomerization domain (NOD)-like receptors*) descoberto a formar o complexo multiprotéico. Sua ativação ocorre após clivagem da porção N-terminal por um componente da toxina produzida por *Bacillus anthracis* (Chavarria-Smith e Vance, 2013). Já o inflamassoma de AIM2 (*absent in melanoma 2*) está envolvido no reconhecimento de fitas duplas de DNA no citosol (Fernandes-Alnemri et al, 2009). NLRP3, atualmente o inflamassoma mais estudado, responde a uma grande variedade de estímulos tais como DNA bacteriano, cristais de ácido úrico, sílica, ATP extracelular, toxinas formadoras de poros, RNA-DNA híbrido, além de diversos patógenos como vírus, bactérias, fungos e protozoários. A ativação de NLRP3 ocorre por meio da alteração nos níveis de cálcio intracelular, efluxo de potássio e ROS (Latz et al., 2013). O inflamassoma de NLRC4, por sua vez, está envolvido principalmente na resposta imune contra bactérias intracelulares, como por exemplo *Salmonella typhimurium*, *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia pestis* e *Shigella flexneri*. Ele reconhece moléculas bacterianas como a flagelina e proteínas presentes no sistema de secreção tipo III (T3SSs) quando presentes no citosol (Mariathasan et al, 2004; Franchi et al, 2006; Miao et al, 2010; Zhao et al, 2011).

1.2. Inflamassoma de NLRC4

A detecção dessas moléculas pelo inflamassoma de NLRC4 é mediada via sensores NAIPs (*apoptosis inhibitory proteins*), proteínas também presentes na família dos NLR (Zhao et al, 2011; Kofoed e Vance, 2011). Após o reconhecimento direto do ligante pelo NAIP, cerca de 10 a 11 moléculas de NLRC4 são recrutadas. Posteriormente, ocorre o recrutamento da proteína ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*) e Caspase-1, levando a consequente formação do inflamassoma de NLRC4. O adaptador ASC consiste em dois domínios: um domínio PYD (*Pyrin Domain*) e um domínio CARD (*Caspase Recruitment Domain*). O domínio CARD de ASC é necessário para o recrutamento de pro-caspase 1 para o complexo, apesar do domínio

CARD presente no próprio NLRC4 também ser capaz de se ligar diretamente ao domínio CARD da pro-caspase 1 e recrutá-la para o complexo. Pro-caspase 1 é clivada para sua forma ativa, que uma vez ativada cliva pró-IL-1 β e pró-IL-18 para suas formas ativas secretadas. Além disso, caspase-1 também cliva a proteína gasdermina D, e seu fragmento N-terminal se oligomeriza na membrana plasmática levando a formação de poros na membrana e morte celular conhecida como piroptose (Broz e Dixit, 2016; Shi et al., 2015). Como mencionado, o inflamassoma de NLRC4 pode ser do tipo ASC-dependente ou ASC-independente. No primeiro caso, o adaptador ASC é necessário para maturação e secreção de citocinas pelo inflamassoma; já no inflamassoma ASC-independente, o domínio CARD presente na parte N-terminal do próprio NLRC4 medeia a ativação de caspase-1, posteriormente induzindo a piroptose (Broz et al., 2010; Mariathasan et al., 2004). Desta forma, a ativação do inflamassoma de NLRC4 leva tanto à produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e IL-18) como a morte celular por piroptose, ambos processos importantes para eliminação de bactérias intracelulares (Figura 4).

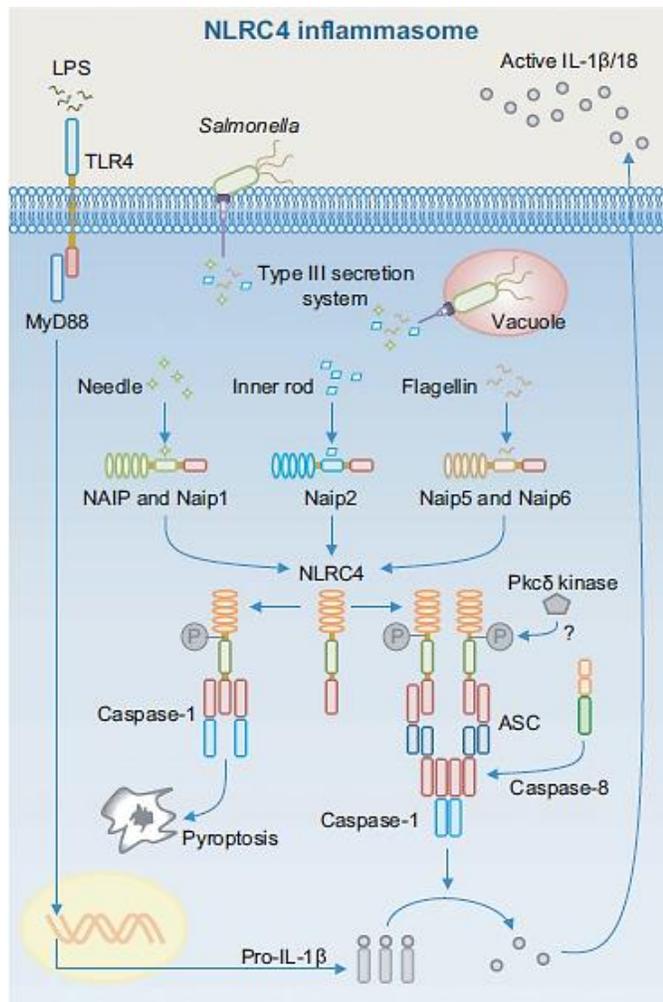


Figura 4. O complexo inflamassoma NLRC4. Adaptado de Man e Kanneganti (2016).

1.3. O modelo de infecção por *Legionella pneumophila*

Foi demonstrado que várias bactérias incluindo *S. typhimurium*, *L. pneumophila* e *Y. pestis* induzem a ativação da caspase-1 via NLRC4, sendo este importante para o controle da infecção (Gong e Shao, 2012). Entre elas podemos destacar a *L. pneumophila*, uma bactéria intracelular gram-negativa, e agente etiológico de duas doenças em humanos: a Doença dos Legionários e a Febre de Pontiac. Enquanto a Doença dos Legionários é considerada uma forma severa da pneumonia que, em sua grande maioria, afeta indivíduos com sistema imune comprometido, a Febre de Pontiac apresenta uma manifestação clínica mais comum, causando sintomas característicos de

infecções por influenza, como febre e dores de cabeça (Brenner, 1987; Horwitz e Silverstein, 1980; Stout e Yu, 1997; Doebbeling e Wenzel, 1987; Palusinska-Szys e Cendrowska-Pinkosz, 2009).

A *Legionella* pode ser encontrada em ecossistemas naturais de água doce, em sistemas de águas artificiais e no solo, onde se reproduzem a temperaturas ótimas de 20°C a 45°C, mas também podem sobreviver a temperaturas de 55°C a 60°C (CHANG; YU, 2005). Para que a infecção ocorra, a água ou solo contaminado com a bactéria devem ser inalados pelo indivíduo. Após a inalação, a bactéria pode infectar e se multiplicar no citoplasma de macrófagos alveolares. Após ser fagocitada pela célula, a bactéria se replica em um vacúolo conhecido como LCV (*Legionella-containing vacuole*), onde a mesma modula o tráfego intracelular de vesículas impedindo a fusão do LCV com outras vesículas, incluindo os lisossomos (Isberg et al., 2009).

Ao longo dos anos, vários estudos foram realizados utilizando macrófagos e *L. pneumophila* como modelo para investigar a biologia e a funcionalidade do inflamassoma de NAIP5/NLRC4. Em 2006, um desses estudos revelou a interação entre NAIP5/NLRC4 e a consequente ativação da caspase-1 em resposta à infecção por *L. pneumophila* (Zamboni et al, 2006). Posteriormente, foi demonstrado que a flagelina é reconhecida por NAIP5 e é necessária para ativação do inflamassoma de NLRC4 por *L. pneumophila*, uma vez que bactérias deficientes em flagelina não são capazes de ativar a plataforma (Amer et al, 2006; Molofsky, 2006). Estudos utilizando macrófagos murinos demonstraram que a proteína adaptadora ASC não é necessária para algumas funções do inflamassoma de NLRC4, como por exemplo a formação de poros, piroptose e consequente controle da replicação de *L. pneumophila*, mas é essencial para a maturação e secreção das citocinas IL-1 β e IL-18 (Zamboni et al., 2006; Pereira et al., 2011; Case et al., 2009; Case e Roy, 2011).

Está bem caracterizado que o reconhecimento da flagelina e a ativação do inflamassoma de NAIP5/NLRC4/Caspase-1 é o principal mecanismo responsável pelo controle da infecção por *L. pneumophila* tanto *in vivo* quanto *in vitro* (Amer, 2006; Molofsky, 2006), mas o mecanismo de controle bacteriano ainda é discutível. Recentemente foi demonstrado que a ativação do inflamassoma em macrófagos infectados por bactérias induz a formação de PITs (*Pore-Induced Intracellular Traps*), que

retêm bactérias no interior do corpo celular, levando à sua eliminação por fagocitose (Jorgensen et al, 2016).

2. JUSTIFICATIVA

As células mielóides fazem parte do sistema imune inato e compõem a primeira linha de defesa contra patógenos. Entre elas estão os granulócitos, macrófagos, monócitos e células dendríticas, células indispensáveis para o microambiente tecidual e sua proteção, atuando como efetores contra patógenos, fagócitos e produtores de fatores inflamatórios (FREUND et al., 2020).

Os macrófagos são células do sistema imune inato que atuam no início e progresso de diversas doenças. Muitas doenças neurológicas e metabólicas estão relacionadas a componentes inflamatórios, como os inflamassomas – complexos presentes nos macrófagos (GUO; CALLAWAY; TING, 2015). O inflamassoma de NLRC4, um complexo formado em macrófagos, está envolvido em diferentes doenças autoinflamatórias em humanos. Por exemplo, uma mutação com ganho de função identificada no NLRC4 causa a Síndrome de Ativação Macrofágica (do inglês *Macrophage Activation Syndrome* ou MAS), uma severa complicação caracterizada pela hiperativação do inflamassoma e resposta inflamatória (CANNA et al, 2014). Estudos demonstraram que a enterocolite de início neonatal também é causada por uma mutação de ganho de função – conhecida como *de novo* – no inflamassoma de NLRC4. Essa mutação causa a produção constitutiva de citocinas da família das interleucinas-1 (IL-1 β e IL-18), e culmina com a morte celular de macrófagos (ROMBERG et al, 2014). Recentemente, outras pesquisas constataram que a obesidade quando relacionada a ativação de NLRC4 é capaz de promover a progressão do câncer de mama (KOLB et al, 2016). O inflamassoma de NLRC4 também foi associado ao glioma, o tumor mais prevalente no sistema nervoso. Sua alta expressão se relacionou com um pobre prognóstico em pacientes portadores da doença, enquanto sua regulação positiva em astrócitos se associou com a baixa sobrevivência dos mesmos (LIM et al, 2019). Além disso, como descrito anteriormente, o inflamassoma de NLRC4 está envolvido na defesa contra diversos patógenos, como nos casos de infecções por *Salmonella enterica* Typhimurium, *Escherichia coli*, *Legionella pneumophila*, *Yersinia pestis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Shigella flexneri* (MARIATHASAN et al, 2004; AMER et al, 2006; FRANCHI

et al, 2006; MIAO et al, 2006; SUTTERWALA et al, 2007; BRODSKY et al, 2010; SUZUKI et al, 2007).

Uma vez descoberta sua participação no início e progressão de diversas doenças de interesse clínico, houve um crescente interesse em encontrar estratégias para estudar as células do sistema imune, como os macrófagos. O advento da engenharia genética facilitou o entendimento de um único gene para todo um organismo, revolucionando a pesquisa biomédica. Os avanços alcançados na engenharia genética por meio de suas técnicas de edição gênica revelaram uma extraordinária utilidade para as áreas de pesquisa básica, biomédica e biotecnologia aplicada (CORNU et al., 2017).

Com o passar do tempo, houve um aprimoramento das ferramentas utilizadas para estudar células do sistema imune. Todavia, células primárias são consideradas difíceis de editar geneticamente, uma vez que são altamente sensíveis a ácidos nucleicos exógenos e a invasão de patógenos como os vetores virais utilizadas como ferramentas de transdução. As células primárias são amplamente utilizadas na pesquisa biomédica por apresentarem uma maior semelhança ao estado natural do organismo a ser estudado.

O sistema CRISPR-Cas9 é considerado uma das ferramentas mais simples e versátil para editar o genoma de diferentes tipos celulares, entre eles as células primárias. O desenvolvimento desta técnica acelerou drasticamente descobertas e análises de vias celulares (FREUND et al., 2020). Desta forma, a otimização de protocolos eficientes utilizando o sistema CRISPR-Cas9 para edição gênica de células como os macrófagos derivados de medula óssea se faz altamente necessário. Com a eficácia de um protocolo de deleção gênica, como o proposto neste projeto, podemos aumentar o conhecimento sobre a via de sinalização de diversos inflamassomas presentes nos macrófagos. A caracterização de novos genes presentes na via de NLRC4, por exemplo, pode facilitar a elucidação de processos envolvidos tanto na defesa contra diversos patógenos, como na indução de doenças autoinflamatórias. Além disso, o potencial inflamatório deste complexo pode torna-lo alvo de intervenções farmacológicas, e descrever novos genes associados a este complexo é de extrema importância para o desenvolvimento de inibidores eficazes da via de sinalização do inflamassoma NLRC4.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Otimização do sistema de deleção gênica por CRISPR-Cas9 e avaliação do papel de novas moléculas envolvidas na ativação e sinalização do inflamassoma de NLRC4.

3.2. Objetivos específicos

- Otimizar o sistema de deleção por CRISPR/Cas9 em macrófagos derivados de medula óssea diferenciados de camundongos KI (*Knock-in*) para Cas9;
- Avaliar o papel de novos genes na via de sinalização do inflamassoma de NLRC4 por meio do ensaio de replicação bacteriana de *L. pneumophila*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Edição gênica por CRISPR-Cas9 e o desenho dos sgRNAs

A técnica de CRISPR-Cas9 utiliza um sgRNA (do inglês *single guide RNA*) com aproximadamente 20 nucleotídeos que irá se parear com a sequência de DNA complementar, direcionando a proteína Cas9 para o sítio de clivagem. Essa sequência recebe uma adição de quatro nucleotídeos na extremidade 5' de cada oligo a ser desenhado, sendo estas sequências complementares às protusões presentes dentro do vetor após a digestão com enzimas específicas (como BsmBI/EspI3). A sequência de CACCG é adicionada a extremidade 5' do oligo *forward* e CAAA ao final 5' do oligo *reverse*. Além disso, nas extremidades 3' serão adicionados nucleotídeos únicos: uma guanina (G) para o oligo *forward* e uma única citosina (C) para o oligo *reverse*. Com todas modificações citadas acima, um oligonucleotídeo de 25 nucleotídeos será gerado, assim como exemplificado na Figura 1.

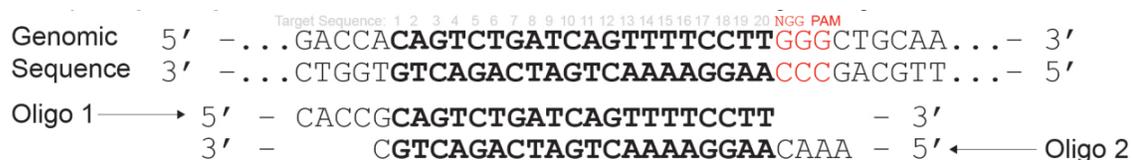


Figura 5. Exemplo de oligonucleotídeo desenhado. Esquema adaptado de Sanjana et al. (2014) e Shalem et al. (2014).

Neste projeto, os RNAs guia utilizados foram desenhados por meio do *software* online gratuito CRISPR Direct (<https://crispr.dbcls.jp/>), um website que leva em consideração alguns fatores, como: a presença de sítios “*off-target*”, sequências presentes no genoma as quais o gRNA pode se associar por homologia parcial, e o anelamento do gRNA ao sítio “*on-target*” – ou seja, a sequência alvo – que pode ser maximizada com a utilização de programas que localizam sequências PAM no genoma e aumentam o potencial de pareamento do sgRNA com a sequência alvo. Para cada gene a ser deletado, dois RNAs guia foram desenhados com o intuito de aumentar a eficiência do nocaute gerando mutações em dois locais distintos do gene.

4.2. Digestão dos plasmídeos lentiCRISPR-V2 e lentiGuide Puro

Para a digestão de 600ng dos plasmídeos (lentiCRISPRv2 ou lentiGuide-Puro) em um total de 20 μ L, foram utilizados: 0,3 μ L da enzima Esp3I (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) ou BsmBI-v2 (New England BioLabs, Massachusetts, EUA), 2 μ L de FastDigest Buffer 10X (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) ou NEBuffer 3.1 (New England BioLabs, Massachusetts, EUA). As amostras foram colocadas em banho maria por 40 a 50 minutos. 4 μ L de FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) e 3 μ L de Buffer FastAP 10X (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) foram adicionados as amostras, seguido por banho maria por 40 minutos para defosforilação do plasmídeo – procedimento necessário para prevenir religação do vetor sem nenhum inserto nos próximos passos.

Após a digestão, as amostras foram purificadas em gel de agarose 0,8% utilizando kit QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha), seguido por eluição em 30 μ L de água destilada.

4.3. Clonagem dos sgRNAs nos vetores plasmidiais

Após o desenho e síntese dos RNAs guia, os mesmos foram clonados no plasmídeo lentiCRISPRv2 (gentilmente cedido por Feng Zhang - Add gene plasmid #52961) ou lentiGuide-Puro (gentilmente cedido por Feng Zhang - Add gene plasmid #52963). O plasmídeo lentiGuide-Puro contém, além de outros componentes, o promotor UG, responsável por controlar a expressão do RNA guia e genes de resistência aos antibióticos ampicilina e puromicina. Já o plasmídeo lentiCRISPRv2, além dos componentes já citados, também apresenta o promotor EFS-NS e, em seguida, um cassete de expressão da enzima Cas9.

Inicialmente, os oligonucleotídeos dos RNAs guias foram submetidos ao protocolo de anelamento para formação de duplex descrito a seguir:

Protocolo de anelamento:

- 1 minuto a 95°C
- Decrescer 5°C a cada 1 minuto até 25°C
- 7 μ l de água livre de nucleases

- 1 μ l Primer *Forward* (100 μ M)
- 1 μ L Primer *Reverse*
- 1 μ L T4 Ligase Buffer (NEB)

Os plasmídeos foram digeridos com a enzima de restrição BsmBI-v2 (New England BioLabs, Massachusetts, EUA) ou Esp3I (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) e, em seguida, os oligonucleotídeos anelados foram ligados ao plasmídeo com a enzima T4 Ligase (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA). O protocolo de ligação está descrito a seguir:

Protocolo de ligação:

- Incubar amostra em termociclador por 4h a 23°C e 16°C overnight
- 50 ng de plasmídeo digerido
- 3 μ L do duplex de oligonucleotídeo
- 1 μ L T4 buffer
- 1 μ L T4 Ligase

Os plasmídeos clonados foram transformados em bactérias Stbl3 (Invitrogen; cat. No. C737303) ou DH5-alfa termocompetentes. As colônias positivas foram selecionadas com o antibiótico ampicilina. O DNA dos plasmídeos presentes nas colônias positivas foram purificados seguindo instruções do fabricante pelo kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen, Hilden, Alemanha). O DNA purificado foi submetido à amplificação por PCR.

4.4. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A amplificação do DNA das células foi realizada por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando Taq DNA polymerase recombinante 5U/uL (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA), 25mM (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA), 10X Taq Buffer (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA). O equipamento utilizado para as amplificações foi o Termociclador Mastercycler Nexus Thermal Cyclers (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). O programa aplicado para a amplificação das amostras foi o seguinte:

1. Desnaturação inicial – 95°C por 2min e 30s;
2. Desnaturação – 95°C por 30s
3. Anelamento/Hibridização – 58°C por 30s
4. Elongação – 72°C por 1min
5. Repição dos passos 2 – 4 por 35 vezes;
6. Elongação final – 72°C por 5min
7. Manutenção das amostras – 10°C até a retirada das amostras;

Os primers utilizados em todas reações de PCR estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Primers para reações de PCR convencional.

Genes	Sequência 5'3'
<i>ASC</i> RNAg forward	AAGGACAGGAACGCGCTCT
<i>Ccar1</i> RNAg 1 forward	TGTACCGTGGAAACGACACGA
<i>Ccar1</i> RNAg 2 forward	TGAACACCAAACGTTGTCTG
<i>Smchd1</i> RNAg 1 forward	TCGACGGCTGTAGGACGGTG
<i>Smchd1</i> RNAg 2 forward	TGTA CTTGTTTGACCGGCG
<i>Pdia3</i> RNAg 1 forward	TGCACAGAGAAGCGAGCGGG
<i>Pdia3</i> RNAg 2 forward	CTTCACCAGAGACTCAATGT
<i>lfi204</i> RNAg 1 forward	ATGGCACAACATCAACTGCA
<i>lfi204</i> RNAg 2 forward	CAGAATCAGAACATTCCCAG
<i>Hspa9</i> RNAg 1 forward	CAACTTGCCATACCTTACCA
<i>Hspa9</i> RNAg 2 forward	CTCAACCCAAGCATCACCAT
<i>S100a4</i> RNAg 1 forward	TCCACCTTCCACAAATACTC
<i>S100a4</i> RNAg 2 forward	GGTGGACACAATTACATCCA
<i>Myh9</i> RNAg 1 forward	GCTGGTACTCACGAATCGAG
<i>Myh9</i> RNAg 2 forward	TGGACTATAAAGCTGACGAG
<i>Dhx9</i> RNAg 1 forward	GTGTTCTTTCGCCGTTCTCG
<i>Dhx9</i> RNAg 2 forward	TCTTTCGCCGTTCTCGTGGA
<i>Parp1</i> RNAg 1 forward	AGAAACTCGGAGGCAAGTTGACAG
<i>Parp1</i> RNAg 2 forward	CTGAGCGGAGGCGGCT
<i>Fkbp4</i> RNAg 1 forward	CTGCTTTGAAGTCGGGGAAGGGG
<i>Fkbp4</i> RNAg 2 forward	GTTTCGAGGTGGGCAGCG
<i>Vcp</i> RNAg 1 forward	CGTGAGCTTCAGGAGTTGTTTCAGTA
<i>Vcp</i> RNAg 2 forward	GGTCGCTTTGACAGAGAGGTAGATA
<i>Ptges3</i> RNAg 1 forward	GCTTAATTGGCTCAGTGTGGACTTCAA TA

Ptges3 RNAg 2 forward	GGAGAATCCGGCCAGTCATGG
LentiGuide Puro Reverse	GATCAATTGCCGACCCC

4.5. Transfecção em células HEK 293

Células HEK 293 foram descongeladas em meio RPMI 1640 +HEPES (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SFB) (Gibco) e 100 U/mL de penicilina. 2×10^6 de células foram plaqueadas em 12mL. Dois dias após o plaqueamento, cada placa de HEK 293 foi transfectada com 3ug do vetor pMD2.G (Add gene #12259), 5ug do vetor psPAX2 (Add gene #12260), 6ug dos RNAs guia e reagente PEI (1:3). No dia seguinte, o meio de cultivo das placas foi substituído por 9mL de RPMI 10% e 1mL de SFB para evitar a citotoxicidade decorrente do reagente polietilimina (PEI).

4.6. Uso de animais

O uso de todos os animais durante esse trabalho esteve em concordância com as diretrizes da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – registro nº 218/2014), que segue as normas recomendadas pelo Conselho Nacional de Controle em Experimentação animal (CONCEA). Foram utilizadas as linhagens de camundongos Cas9 e C57BL/6.

4.7. Diferenciação de macrófagos derivados de medula óssea

Macrófagos diferenciados de células precursoras da medula óssea (BMDMs) serão utilizados para experimentos *in vitro*. Para diferenciação das BMDMs, as células da medula óssea serão obtidas de fêmures e tíbias de camundongos C57BL/6, *Gsdmd*^{-/-} e Cas9, posteriormente diferenciadas *in vitro* em meio RPMI 1640 +HEPES suplementado com 20% de Soro Bovino Fetal (Gibco), 30% de meio condicionado por células L929 (LCCM: fonte de M-CSF, importante para diferenciação de células progenitoras de macrófagos), 2 mM L-Glutamina, 100 U/mL de penicilina/estreptomicina. Após o segundo dia de diferenciação, os macrófagos foram transduzidos com cerca de 8mL do

sobrenadante das células HEK contendo as partículas de lentivírus carregando nossos vetores, 2 mL de soro fetal bovino e 1,5 mL de meio condicionado por células L929.

4.8. Ensaio de replicação bacteriana *in vitro* utilizando *Legionella pneumophila*

Para os experimentos de replicação bacteriana, 1×10^5 BMDMs serão plaqueadas em placas brancas de 96 poços e incubados durante a noite. As células serão infectadas com *L. pneumophila* expressando o cassete para luciferase em um MOI de 0.01. Após 4, 24, 48, 72 e 96 horas a replicação bacteriana será avaliada pela emissão de luminescência a 470 nm medida em um leitor de placas Spectra-L (Molecular Devices, Califórnia, EUA).

4.9. Ensaio de ativação de diferentes inflamassomas

Para avaliar a eficiência da geração de células nocautes para as diferentes moléculas do inflamassoma, utilizamos os seguintes agonistas: 0,1 µg/mL nigericina, 4 µg/mL Poly (dAdT), 5µg/mL Poly (I:C) e *Legionella pneumophila*. 1×10^5 /poço de BMDMs foram plaqueados e estimulados com LPS por 4 horas. Posteriormente, as células foram estimuladas com os ativadores pelo seguintes períodos: 50 minutos para Nigericina e Poly dAdT, 1h30 para *L. pneumophila* WT e 3h para *L. pneumophila* e Poly (I:C). Por fim, a produção de IL-1β foi avaliada por ELISA.

4.10. Dosagem de IL-1β por ELISA

A dosagem da citocina IL-1β na cultura de BMDM estimuladas com nigericina, ou infectados com *L. pneumophila*, serão avaliadas por ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) conforme instruções do fabricante. Resumidamente, placas de 96 poços serão sensibilizadas com anticorpos de captura (50ul/poço) por 18 horas e bloqueados por 2 horas a temperatura ambiente, com 200 uL/poço de tampão de bloqueio específico. Em seguida, diluições do padrão (curva padrão) e as amostras serão adicionadas à placa (50µL/poço) por 2 horas. Após as lavagens, anticorpos de detecção biotinilados serão adicionados aos poços (50µL/poço). Uma solução contendo substrato

cromógeno da peroxidase (*treta-methyl-benzidine*) será adicionada em cada poço para revelar o ensaio, e a reação será finalizada com a adição de H₂SO₄ 2N. A densidade óptica de cada amostra será mensurada por meio do leitor de ELISA em filtro com comprimento de onda de 450nm e a quantificação será realizada conforme curva padrão obtida no leitor SpectraMax i3 MiniMax 300 Imaging Cytometer (Molecular Devices, California, EUA).

4.11. Extração de proteínas e Western Blot

Para essa etapa realizamos a extração proteica de macrófagos primários. Para tanto, realizamos o protocolo de lise e extração de proteínas totais, que consiste em lisar 1x10⁵ células em 200 µL de tampão de lise COIP e 8 µL de coquetel inibidor de proteases (Complete Protease Inhibitor Cocktail, Roche, Basel, Switzerland). Após a etapa de lise, 30 µL da amostra são adicionados a 10 µL de TA e incubados a 100°C por 5 minutos. As amostras foram adicionadas a um gel de poliacrilamida 12% e transferidas para uma membrana de nitrocelulose, sendo posteriormente incubadas com o anticorpo primário monoclonal anti-FLAG-mouse (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) ou anti-ASC (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Califórnia, EUA) em uma diluição 1:1000 em TBS 1X com Tween 0,1% a 20°C sob agitação *overnight*. A membrana foi incubada por 1h com o anticorpo secundário e analisado utilizando o leitor Amersham Imager 600 (GE Healthcare Systems, Chicago, Illinois, EUA).

4.12. Extração de DNA genômico

A extração do DNA genômico foi realizado com o Kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen, Hilden, Alemanha) seguindo as recomendações do fabricante. As amostras de células foram ressuspensas em 200 µL de PBS e lisadas com 20 µL de proteinase K. 200µL de Buffer AL foi adicionada e as amostras foram incubadas por 56°C por 10 minutos. Posteriormente, 200 µL de etanol (100%) foi adicionado e as amostras foram vortexadas. A mistura foi pipetada em uma coluna acoplada a um tubo de 2 mL e centrifugada por 1 minuto a 8000 rpm. A coluna contendo a amostra foi inserido em outro tubo de 2mL, 500 uL de Buffer AW1 foi adicionado, seguido novamente por uma centrifugação a 8000 rpm

por 1 minuto. A mesma coluna foi inserida em um novo tubo de 2mL, 500 uL de Buffer AW2 foi adicionado e as amostras foram centrifugadas a 14000 rpm por 3 minutos. A coluna foi inserida em um tubo de 1.5 mL, 200 uL de Buffer AE foi adicionado e incubado por 1 minuto em temperatura ambiente, seguido por centrifugação a 8000 rpm por 1 minuto para eluição da amostra.

4.13. Análise estatística

Os dados foram plotados e analisados utilizando o *software* GraphPad Prism 5.0. A estatística de significância foi calculada utilizando o teste-t ou a análise de variância ANOVA. Diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando P foi <0.05.

5. RESULTADOS

5.1 Otimização do sistema CRISPR-Cas9 em macrófagos derivados de medula óssea

O sistema CRISPR-Cas9 é um método que permite a edição do genoma de organismos e pode ser utilizada para avaliar a função de um gene de interesse. Nosso projeto visou otimizar a técnica de deleção gênica por CRISPR-Cas9 em macrófagos derivados de medula óssea (BMDMs, do inglês *Bone Marrow Derived Macrophages*), focando na deleção de genes possivelmente envolvidos com a via de sinalização do inflamassoma de NLRC4 por meio do reparo de DNA por Junção de Extremidades Não Homólogas (do inglês *Non-Homologous End-Joining* ou NHEJ).

Inicialmente, buscamos realizar a técnica de deleção para o gene ASC (do inglês *apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*), responsável por codificar uma proteína amplamente estudada em diferentes inflamassomas, capaz de recrutar a molécula de pro-caspase 1 e levar à maturação e secreção de citocinas.

Para gerar uma célula nocaute por meio da técnica de CRISPR-Cas9 é necessário inicialmente desenhar os oligonucleotídeos que irão compor o sgRNA (do inglês *single guide RNA*) ou RNA guia do seu experimento. O RNA guia é uma molécula quimérica formado por uma sequência universal e uma sequência complementar (ou sequência guia). A sequência universal é composta por aproximadamente 80 nucleotídeos e é responsável pela ativação da nuclease Cas9. Por sua vez, a sequência guia é uma sequência de 20 nucleotídeos que irá direcionar a Cas9 e deve ser complementar ao DNA genômico que possui um motivo PAM adjacente. A região PAM é essencial para ancoragem da Cas9 ao sítio de clivagem, por isso a sequência guia deve ser complementar a uma região genômica que a possui por perto.

O sgRNA para deleção do gene ASC foi desenhado, assim como os demais deste projeto, por meio do software *CRISPRdirect* (<http://crispr.dbcls.jp/>), um website que seleciona alvos levando em consideração a proximidade dessa sequência à região PAM e sua especificidade em relação a região do genoma que se pretende deletar, evitando as chamadas edições fora do alvo ou *off-targets* (Figura 6).

NM_023258.4	AATGACTGTGCTTAGAGACATGGGCTTACAGGAGCTGGCTGAGCAGCTGCAAACGACTAA	480
sgRNA	-ATGACTGTGCTTAGAGACAT-----	20

Figura 6. Desenho experimental do sgRNA ASC. Este guia foi desenhado dentro do gene que codifica a proteína ASC. A sequência PAM (GGG) pode ser observada próximo a região em vermelho. As sequências foram alinhadas com o *software* Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

5.1.1. Clonagem do RNA guia de ASC em vetor plasmidial

O RNA guia utilizado para deleção do gene ASC foi clonado no vetor lentiGuide-Puro (Add #52963, gentilmente cedido por Feng Zhang), um vetor lentiviral de terceira geração para edição gênica por meio da técnica de CRISPR-Cas9 (Figura 7). Os vetores lentivirais de terceira geração são compostos por três plasmídeos que carregam diferentes genes virais distribuídos: dois deles carregando o sistema de empacotamento (genes Rev, Gag e Pol) e um plasmídeo de transferência com o sgRNA de interesse. Por não apresentar um cassete de expressão da enzima Cas9, o vetor lentiGuide-Puro é amplamente utilizado para entregar o RNA guia e genes de resistência em células que já expressem constitutivamente a enzima.

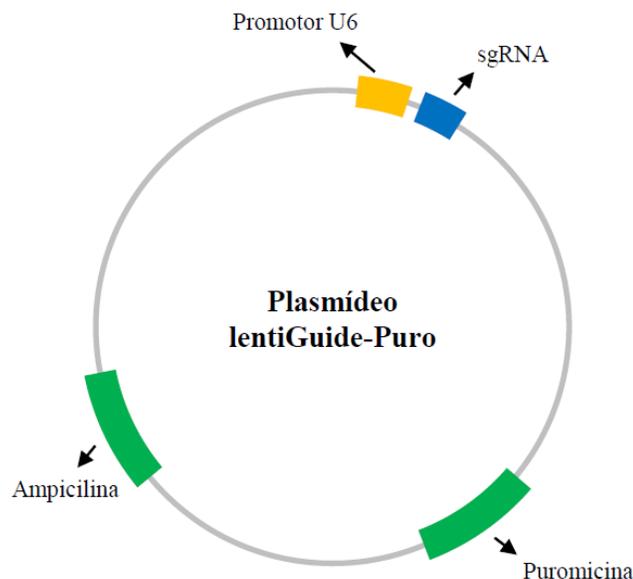


Figura 7. Representação esquemática das principais regiões do plasmídeo lentiGuide Puro. Este plasmídeo possui o sgRNA sob controle do promotor U6 e genes de resistência a puromicina e ampicilina. Apresenta um comprimento total de 10.183 pares de base.

A Figura 8 ilustra o resultado da amplificação, gerando um produto com aproximadamente 500 pares de bases. O produto de amplificação obtido pela PCR teve seu tamanho concordante com o previsto, sem apresentar bandas inespecíficas, indicando o sucesso da clonagem do RNA guia de ASC no vetor lentiGuide-Puro.

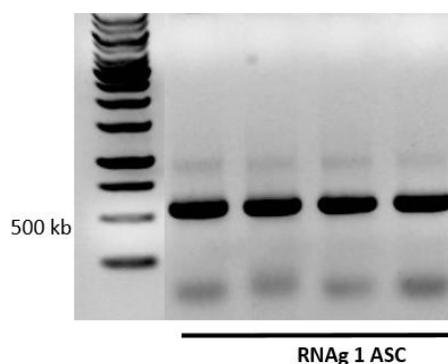


Figura 8. Clonagem do sgRNA de ASC em vetor lentiGuide Puro. A clonagem da sequência do sgRNA foi confirmada após a realização de PCR convencional utilizando primers específicos para a sequência do RNA guia e para o vetor lentiGuide-Puro, no qual o guia foi inserido.

5.1.2. Deleção de ASC em macrófagos primários derivados de medula óssea

Após a clonagem dos RNAs guia, iniciou-se o processo de geração de macrófagos *knockout* para nossos genes de interesse. Para receber nossos sgRNAs, os macrófagos precisam ser transduzidos com lentivírus que carreguem essas sequências. Sendo assim, em conjunto com os vetores de empacotamento psPAX2 e pMD2.G, os plasmídeos contendo nosso RNA guia foram transfectados em células HEK 293 para a formação das partículas lentivirais. Os vetores lentivirais são comumente utilizados para entregar genes de interesse a uma célula hospedeira, uma vez que possuem a capacidade de entrar com eficiência nas células, além de se integrarem ao genoma do hospedeiro, expressando constitutivamente os genes de interesse. Posteriormente, macrófagos derivados de medula óssea (BMDMs) foram transduzidos com os lentivírus

gerados. Os macrófagos foram diferenciados de camundongos que já expressavam constitutivamente a enzima Cas9.

Na Figura 9 podemos observar que não houve expressão da proteína ASC no grupo de células nocauteadas, revelando a eficácia do nosso protocolo de deleção utilizando o sistema de CRISPR-Cas9. Além disso, após estimular nossas células nocaute com Poly (I:C) e Poly (dAdT), observamos uma diminuição da produção e secreção de IL1 β , dado que corrobora com a deleção da proteína ASC observado anteriormente (Figura 10).

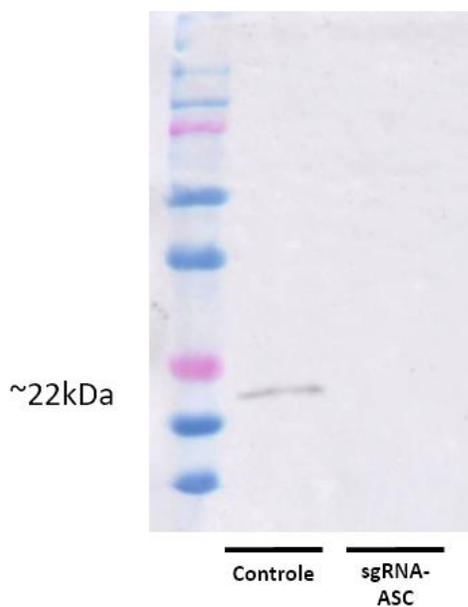


Figura 9. Confirmação da deleção de ASC por Western Blot. Western Blot das células transduzidas com lentiGuide-Puro-sgRNA ASC e células controle.

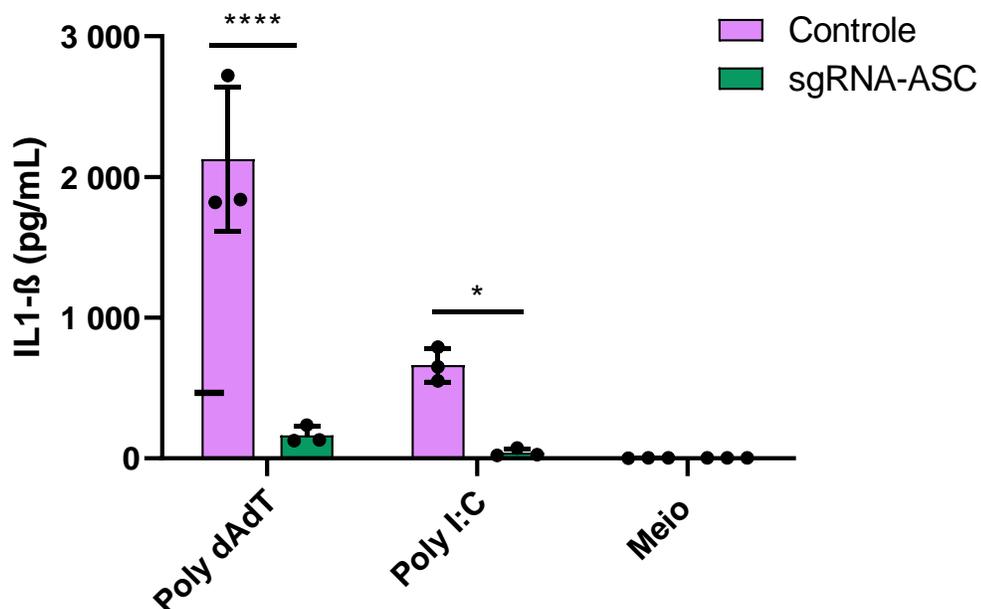


Figura 10. Dosagem de IL-1 β realizada por ELISA confirma a deleção de ASC. BMDMs transduzidos com lentiGuide-Puro sgRNA-ASC e BMDMs transduzidos apenas pelo vetor vazio (sem sgRNA) tiveram seu sobrenadante de cultura coletado e a dosagem de IL1 β foi realizada por ELISA. A diminuição da secreção desta citocina no grupo *Asc*^{-/-} confirma a deleção da proteína por meio do sistema de CRISPR-Cas9.

5.2. Avaliação do papel de novos genes na via de sinalização de NLRC4 por meio do sistema CRISPR-Cas9

5.2.1. Identificação e seleção de proteínas que interagem com NLRC4

Experimentos realizados previamente por nosso grupo utilizaram a técnica de BioID (*Proximity-Dependent Biotin Identification*) para identificar possíveis alvos envolvidos na via de NLRC4. O método de BioID permite identificar interações entre proteínas, possibilitando um maior entendimento a respeito de diversos processos biológicos complexos, como vias metabólicas, vias de sinalização e outros processos celulares. Nesta técnica, a proteína alvo é fusionada a um mutante da enzima biotina

ligase (BirA) de *Escherichia coli*. A biotina ligase mutada (BirA*) é capaz de biotinar proteínas em sua vizinhança, atuando como uma estratégia eficiente para identificá-las. Posteriormente, as proteínas biotiniladas podem ser precipitadas utilizando *beads* contendo estreptavidina e identificadas por espectrometria de massa. Esta metodologia foi realizada por nosso grupo de pesquisa, no qual o gene NLRC4 foi clonado em fusão com BirA*, e diversos alvos foram identificados por espectrometria de massa. Os genes inicialmente selecionados para o desenvolvimento desse projeto estão listados na Tabela 1, indicando a proteína codificada pelo mesmo, suas respectivas funções previstas de acordo com a plataforma UniProt (uniprot.org) e a sequência dos sgRNAs que foram utilizados para deleção dos mesmos.

Tabela 2. Lista de genes que potencialmente interagem com o inflamassoma de NLRC4.

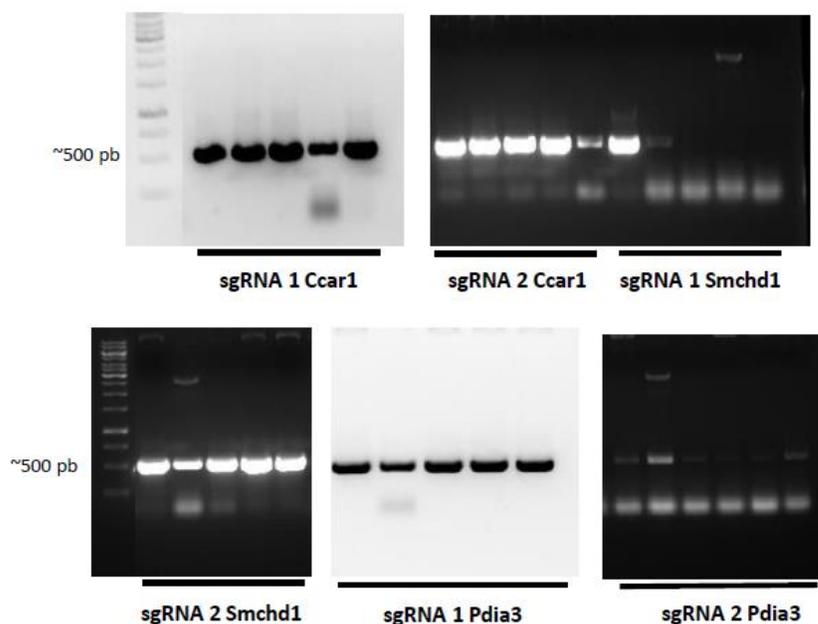
Nome do gene	Nome da proteína	Função	Sequência de sgRNAs (5'3')
<i>Ccar1</i>	Cell division cycle and apoptosis regulator protein 1	Envolvido em processos apoptóticos, de migração celular, proliferação celular, além de atuar como coativador e corepressor de transcrição mediada por AR e como coativador de p53	<u>CACCGTGTACCGTGGAACGACACGA</u> <u>CACCGTGAACACCAAACGTTGTCTG</u>
<i>Smchd 1</i>	Structural maintenance of chromosomes flexible hinge domain-containing protein 1	Atua no silenciamento epigenético; promove a formação de heterocromatina nos autossomos e cromossomos X; desempenha papel no reparo do DNA promovendo o reparo NHEJ	<u>CACCGTCGACGGCTGTAGGACGGTG</u> <u>CACCGTGTACTTGTGGACCGGCGC</u>
<i>Pdia3</i>	Protein disulfide-isomerase A3	Catalisa o rearranjo de ligações –SS- em proteínas; atua em processos biológicos relacionados a homeostase redox de células, resposta celular a IL-	<u>CACCGTGCACAGAGAAGCGAGCGGG</u> <u>CACCGCTTCACCAGAGACTCAATGT</u>

		7 e à vitamina D, e resposta ao estresse do retículo endoplasmático, entre outros	
<i>Ifi204</i>	Interferon-activable protein 204	Atua na inibição de transcrição de RNA ribossômico; inibe o crescimento celular por meio de vias dependentes e independentes de p53/TP53 e RB1; atua como coativador de RUNX2 durante a osteogênese	<u>CACCGATGGCACAACATCAACTGCA</u> <u>CACCGCAGAATCAGAACATTCCCAG</u>
<i>Hspa9</i>	Stress-70 protein, mitochondrial	Atua na biogênese mitocondrial ferro-enxofre; interage e estabiliza as proteínas FXN, NFU1, NFS1 e ISCU; regula a eritropoiese via estabilização do conjunto ISC	<u>CACCGCAACTTGCCATACCTTACCA</u> <u>CACCGCTCAACCCAAGCATCACCAT</u>
<i>S100a4</i>	Protein S100-A4	Regula positivamente a sinalização de IκappaB cinase/NF-kappaB; interage com filamentos de actina, íons de cálcio, íons de metais de transição e com proteínas ou complexos proteicos na presença de cálcio	<u>CACCGTCCACCTTCCACAAATACT</u> <u>CACCGGGTGGACACAATTACATCCA</u>
<i>Myh9</i>	Myosin-9	Atua na reorganização do citoesqueleto (formato celular e localização do fuso mitótico) e em processos relacionados à citocinese, angiogênese, diferenciação	<u>CACCGGCTGGTACTCACGAATCGAG</u> <u>CACCGTGGACTATAAAGCTGACGAG</u>

		de monócitos, fagocitose, reparo de membrana plasmática e transporte de proteínas, entre outros	
Dhx9	ATP-dependent RNA helicase A	Atua em processos de replicação do DNA, ativação transcricional, regulação gênica, tradução de RNAm e silenciamento gênico mediado por RNA	<u>CACCGGTGTTCTTTGCGCCGTTCTCG</u> <u>CACCGTCTTTGCGCCGTTCTCGTGGA</u>

5.2.2. Clonagem dos sgRNAs em vetor lentiGuide-Puro

Em nosso laboratório, como parte do desenvolvimento desse projeto, estamos padronizando a utilização de dois sgRNA para cada grupo de gene, visando aumentar a eficácia do nocaute. Os RNAs guia utilizados neste projeto (Tabela 2) foram desenhados por meio do software *CRISPRdirect* (<http://crispr.dbcls.jp/>). Os oligonucleotídeos gerados foram clonados dentro do vetor plasmidial lentiGuide-Puro (Figura 7). A confirmação de todas as clonagens pode ser observada na Figura 11.



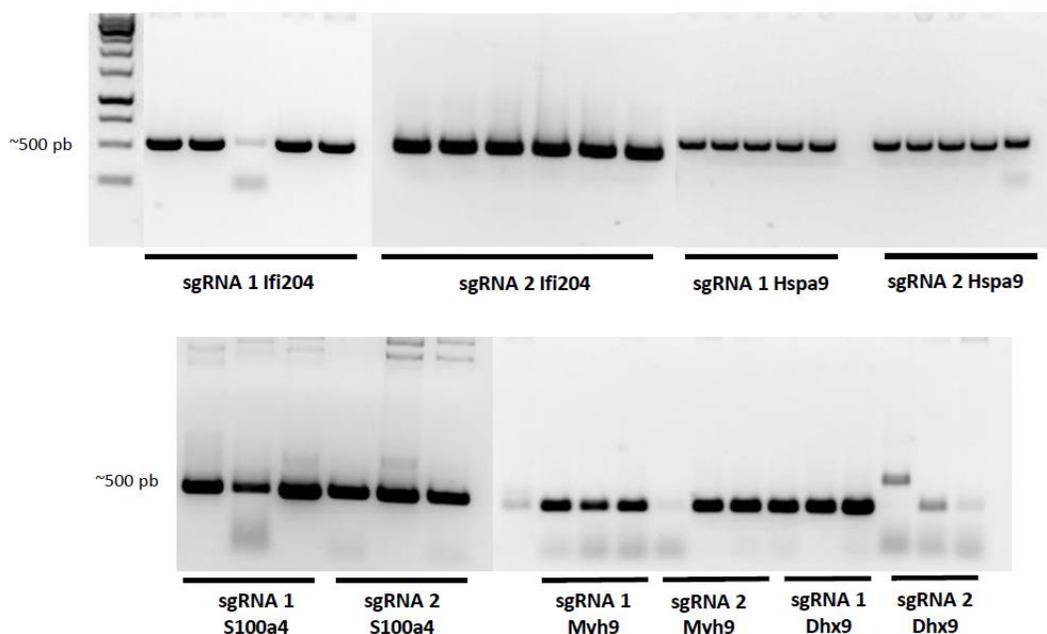


Figura 11. Confirmação da clonagem dos sgRNAs dos genes *Ccar1*, *Smchd1*, *Pdia3*, *Ifi204*, *Hspa9*, *S100a4*, *Myh9* e *Dhx9* em vetor lentiGuide Puro. As sequências dos RNAs guias foram confirmadas após a realização de PCR utilizando primers específicos para a sequência do guia e para o vetor lentiGuide-Puro, no qual os guias foram inseridos.

5.2.3. Ensaio de replicação bacteriana com *L. pneumophila* em macrófagos transduzidos com sgRNAs referentes aos genes de interesse

Após a clonagem dos sgRNAs, iniciou-se o processo de geração de macrófagos *knockout* para nossos genes de interesse. Como descrito anteriormente, células HEK 293 foram transfectadas com os vetores de empacotamento e o vetor com o sgRNA de interesse, levando a produção de lentivírus. Posteriormente, macrófagos derivados de medula óssea foram transduzidos com os lentivírus gerados. Os macrófagos foram diferenciados de camundongos que já expressavam constitutivamente a enzima Cas9 e, por isso, não foi preciso transduzi-la em conjunto com o RNA guia. Cada experimento foi realizado com grupos de macrófagos transduzidos com os sgRNAs dos genes de interesse, sgRNAs de NLRC4 como controle positivo e um controle vazio de macrófagos transduzidos apenas com nosso vetor plasmidial sem a sequência do RNA guia.

Os macrófagos transduzidos foram infectados com a bactéria *Legionella*

pneumophila (MOI 0,01) em sua forma WT e deficiente em flagelina (*flaA*). Ao infectar os macrófagos, a bactéria *L. pneumophila* WT induz a ativação do inflamassoma de NLRC4 levando à morte celular. Por outro lado, a bactéria sem flagelina (*flaA*) não é reconhecida pelo receptor NAIP5 e, conseqüentemente, não ativa o inflamassoma de NLRC4, culminando com uma maior replicação bacteriana de forma independente do NLRC4, sendo utilizada como um controle da replicação.

Demonstramos em nossos resultados a eficiência do sistema de deleção por CRISPR-Cas9 em macrófagos primários ao analisarmos a deleção do gene NLRC4 que levou ao aumento da replicação de *L. pneumophila* nas células infectadas de todos os experimentos realizados. Além disso, nos macrófagos infectados com *L. pneumophila* deficiente em flagelina (*Lp flaA*) constatamos uma replicação comum entre todos os grupos, assim como esperado (Figura 12 a 17).

A Figura 12 representa o primeiro ensaio de replicação realizado com nossos primeiros quatro genes de interesse. Nele, podemos observar que os grupos de macrófagos transduzidos com sgRNAs para os genes de interesse não exibiram aumento da replicação bacteriana, assim como seria esperado caso algum deles apresentasse relevância para a via de sinalização do inflamassoma de NLRC4.

Durante a realização deste primeiro experimento encontramos algumas dificuldades em conseguir a quantidade necessária de células para o ensaio de replicação bacteriana (1×10^5 células/poço), sendo assim, diminuimos a quantidade de grupos infectados para alcançar um número final maior de células após a seleção por antibiótico. As Figuras 13, 14 e 15 representam as repetições do experimento anterior, agora utilizando apenas quatro grupos por ensaio de replicação. Em todos eles podemos observar o aumento da replicação bacteriana nos grupos de células transduzidas com sgRNAs para NLRC4, indicando a eficiência do nocaute deste gene. Nos grupos de macrófagos transduzidos com sgRNAs pra os genes *Ccar1*, *Smchd1*, *Pdia3*, *Ifi204* e *Hspa9* não constatamos o mesmo fenótipo. Na Figura 13, podemos observar que houve uma diferença entre a replicação de *L. pneumophila flaA* entre os grupos, sugerindo que alguns dos grupos de macrófagos transduzidos (principalmente o grupo NLRC4) possa ter sido uma quantidade maior de células no momento de plaqueamento ou recebido mais bactérias durante a infecção que os demais grupos. Todavia, acabamos considerando os

resultados uma vez que o grupo de macrófagos nocaute de NLRC4 seguiu o fenótipo de aumento bacteriano.

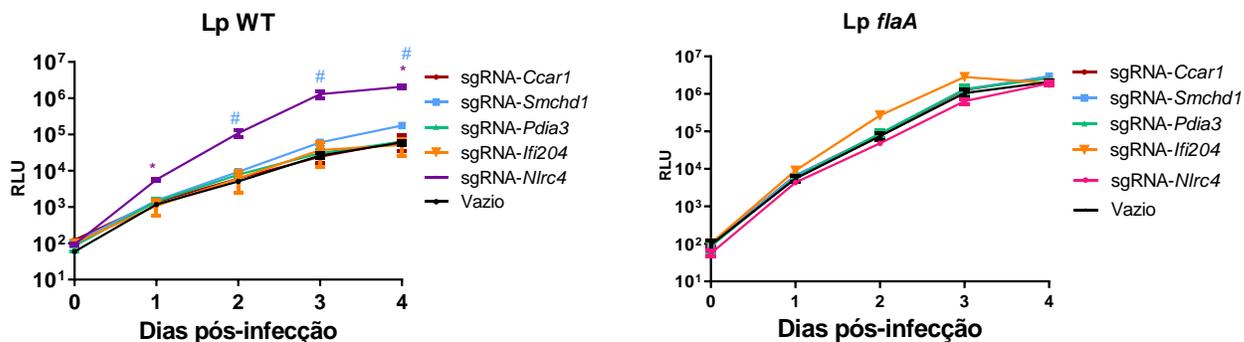


Figura 12. Ensaio de replicação bacteriana em BMDMs transduzidos com sgRNAs para os genes *Ccar1*, *Smchd1*, *Pdia3* e *Ifi204*. BMDMs de camundongos Cas9 transduzidos com sgRNA para os genes *Ccar1*, *Smchd1*, *Pdia3*, *Ifi204* e *Nlrc4* foram infectados com *L. pneumophila* WT (Lp WT) ou deficiente em *flaA* (Lp *flaA*) em um MOI de 0.01. A replicação bacteriana foi estimada por luminescência (RLU) até 4 dias após infecção. *, P<0.05: comparado ao grupo não infectado.

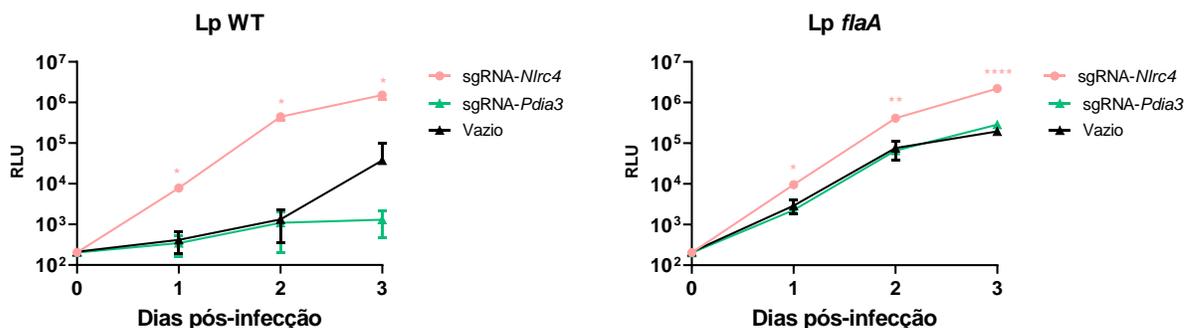


Figura 13. Ensaio de replicação bacteriana em BMDMs transduzidos com sgRNAs para o gene *Pdia3*. BMDMs de camundongos Cas9 transduzidos com sgRNA para os genes *Pdia3* e *Nlrc4* foram infectados com *L. pneumophila* WT (Lp WT) ou deficiente em *flaA* (Lp *flaA*) em um MOI de 0.01. A replicação bacteriana foi estimada por luminescência (RLU) até 4 dias após infecção. *, P<0.05: comparado ao grupo não infectado.

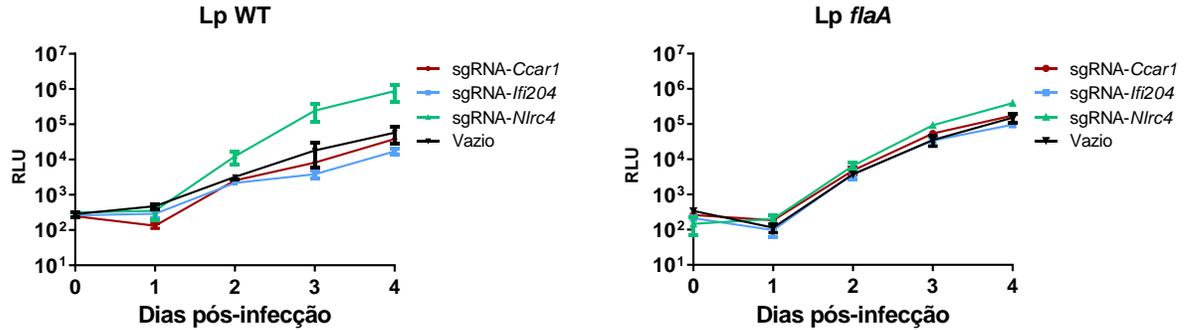


Figura 14. Ensaio de replicação bacteriana em BMDMs transduzidos com sgRNAs para os genes *Ccar1* e *Ifi204*. BMDMs de camundongos Cas9 transduzidos com sgRNA para os genes *Ccar1*, *Ifi204* e *Nlrc4* foram infectados com *L. pneumophila* WT (Lp WT) ou deficiente em *flaA* (Lp *flaA*) em um MOI de 0.01. A replicação bacteriana foi estimada por luminescência (RLU) até 4 dias após infecção. *, $P < 0.05$: comparado ao grupo não infectado.

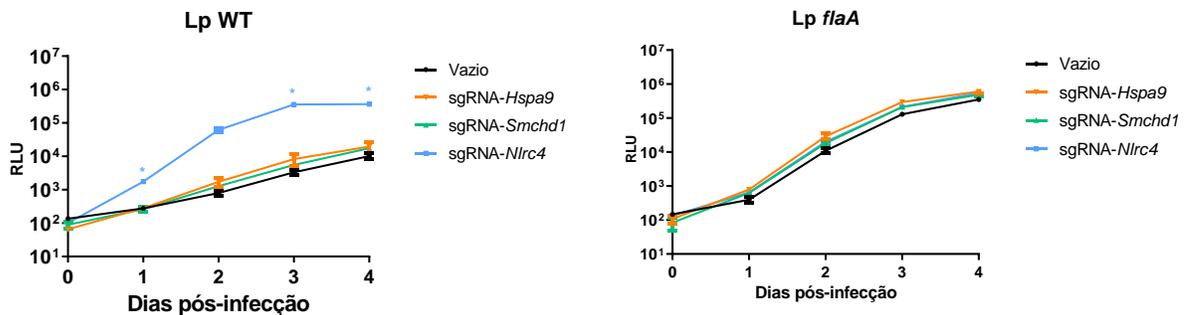


Figura 15. Ensaio de replicação bacteriana em BMDMs transduzidos com sgRNAs para os genes *Hspa9* e *Smchd1*. BMDMs de camundongos Cas9 transduzidos com sgRNA para os genes *Hspa9*, *Smchd1* e *Nlrc4* foram infectados com *L. pneumophila* WT (Lp WT) ou deficiente em *flaA* (Lp *flaA*) em um MOI de 0.01. A replicação bacteriana foi estimada por luminescência (RLU) até 4 dias após infecção. *, $P < 0.05$: comparado ao grupo não infectado.

Nas Figuras 16 e 17 estão representados os ensaios de replicação dos grupos de macrófagos transduzidos com sgRNAs para os genes *S100a4*, *Myh9* e *Dhx9*. Como

podemos observar, assim como os demais, não houve aumento da replicação de *L. pneumophila* nas células. Todavia, demonstramos novamente a eficácia da deleção gênica por CRISPR-Cas9 por meio do nocaute de NLRC4 nos grupos controle.

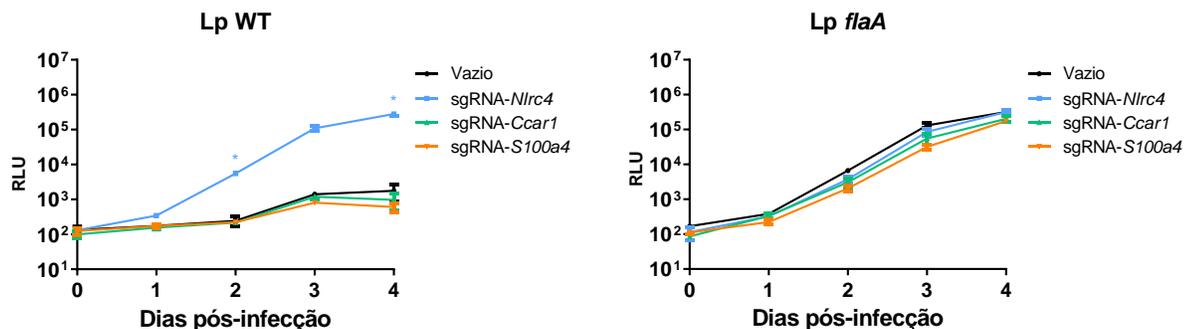


Figura 16. Ensaio de replicação bacteriana em BMDMs transduzidos com sgRNAs para os genes *Ccar1* e *S100a4*. BMDMs de camundongos Cas9 transduzidos com sgRNA para os genes *Ccar1*, *S100a4* e *Nlrc4* foram infectados com *L. pneumophila* WT (Lp WT) ou deficiente em *flaA* (Lp *flaA*) em um MOI de 0.01. A replicação bacteriana foi estimada por luminescência (RLU) até 4 dias após infecção. *, P<0.05: comparado ao grupo não infectado.

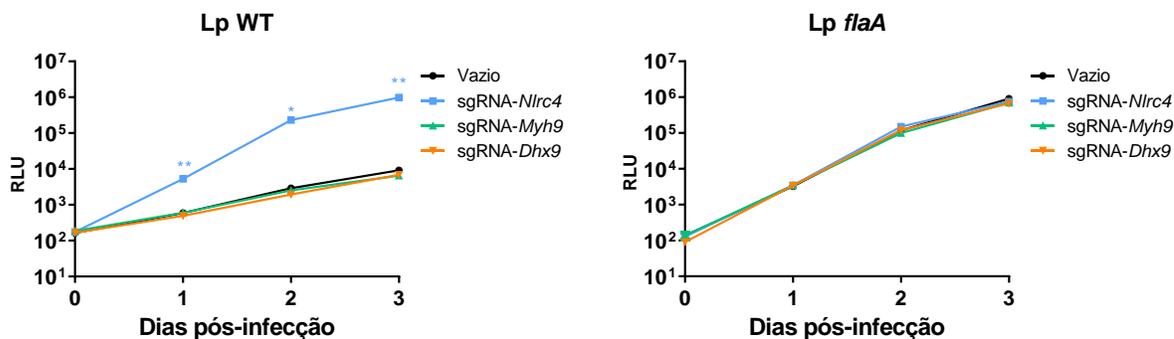


Figura 17. Ensaio de replicação bacteriana em BMDMs transduzidos com sgRNAs para os genes *Myh9* e *Dhx9*. BMDMs de camundongos Cas9 transduzidos com sgRNA para os genes *Myh9*, *Dhx9* e *Nlrc4* foram infectados com *L. pneumophila* WT (Lp WT) ou deficiente em *flaA* (Lp *flaA*) em um MOI de 0.01. A replicação bacteriana foi estimada por luminescência (RLU) até 4 dias após infecção. *, P<0.05: comparado ao grupo não infectado.

O gene *Dhx9* (do inglês *DExD/H-box helicase 9*) codifica uma proteína nuclear identificada como um sensor de ácidos nucleicos virais, atuando como adaptadores de sinalização e reguladores transcricionais de vias de sinalização antivirais. Nos últimos anos, vários estudos investigaram o papel da DHX9 na imunidade inata. Entre eles, um estudo publicado em 2017 demonstrou que a helicase de RNA DHX9 está envolvida com o reconhecimento de trechos curtos de RNA de fita dupla, auxiliando a formação do complexo inflamassoma NLRP9b em conjunto com as proteínas ASC e Caspase-1, promovendo a maturação de IL-18 e piroptose induzida por GSDMD (Zhu et al., 2017). Outro estudo publicado em 2018 revelou que macrófagos deficientes em DHX9 diminuem sua imunidade inata antiviral contra certos vírus, levando ao aumento da replicação viral na célula (Ng YC et al., 2018). Além disso, a proteína DHX33, uma helicase da mesma família da DHX9, também foi alvo de investigações. Um estudo revelou que a diminuição da expressão de DHX33 bloqueou a ativação de caspase-1 e a secreção de IL-18 e IL-1 β em macrófagos humanos estimulados com Poly (I:C), RNA retroviral e RNA bacteriano. Neste estudo também foi demonstrado com DHX33 se liga ao RNA dupla fita e interage com NLRP3, auxiliando na formação do complexo inflamassoma (Mitoma et al., 2013).

Desta forma, buscamos investigar sobre o papel de DHX9 na via de sinalização de alguns inflamassomas estudados em nosso laboratório. Para tanto, estimulamos grupos de macrófagos transduzidos com sgRNAs para *Dhx9* com diversos ativadores, buscando investigar o papel da proteína em diferentes vias de sinalização. Os seguintes ativadores foram utilizados: Poly (I:C), uma molécula que mimetiza um RNA de fita dupla, reconhecida pelo receptor TLR3 e responsável por contribuir para a resposta imune inata contra diversos vírus, além de auxiliar a ativação do inflamassoma de NLRP3 (Li et al., 2012; Rajan et al., 2010); Poly (dAdT), molécula sintética de DNA de fita dupla, capaz de ser reconhecido por AIM2 e ativar o mesmo inflamassoma (Hornung et al., 2009); Nigericina, composto responsável por ativar o inflamassoma de NLRP3; e *L. pneumophila*, bacteria utilizada como modelo para ativação do inflamassoma de NLRC4. Com base no ensaio fenotípico realizado (Figura 18A), podemos observar que não houve diminuição da produção e secreção de IL-1 β mediante os diferentes estímulos utilizados,

fenótipo que seria observado caso a deleção de um gene importante para algum dos inflamassomas testados (AIM2, NLRP3 e NLRC4) tivesse sido deletado.

O gene *Myh9*, por sua vez, codifica a proteína MIOSINA-9, que atua em papéis relacionados à motilidade celular, manutenção da forma celular e citocinese (Althaus e Greinacher, 2009). Buscamos investigar o papel do gene *Myh9* na via de diferentes inflamassomas, assim como realizamos anteriormente com *Dhx9*. Na Figura 18B podemos observar que houve uma redução da produção e secreção de IL-1 β quando o grupo de macrófagos transduzido com sgRNAs de *Myh9* foi estimulado com nigericina, um ativador do inflamassoma de NLRP3. Como este experimento preliminar ainda não foi repetido mais vezes, nossos dados não sustentam a afirmação de que a proteína MIOSINA-9 tenha algum papel relevante na via de sinalização de NLRP3.

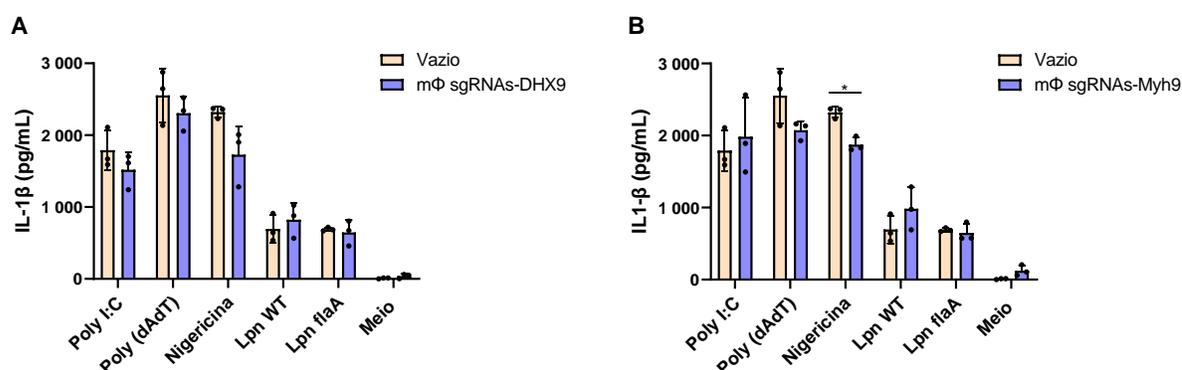


Figura 18. Dosagem de IL-1 β por ELISA para investigação do papel de *Dhx9* e *Myh9* na via de sinalização dos inflamassomas de NLRP3 e AIM2. BMDMs transduzidos com sgRNA-Myh9, sgRNA-DHX9e BMDMs e pelo vetor vazio (sem sgRNA) tiveram seu sobrenadante de cultura coletado após 48h e a dosagem de IL-1 β foi realizada por ELISA. *, P<0.05: comparado ao grupo de macrófagos transduzidos pelo vetor vazio.

5.3. Seleção de novos genes possivelmente envolvidos com a via de sinalização do inflamassoma de NLRC4

As caspases compõem uma família de proteases de cisteína expressas como enzimas inativas que participam de diferentes processos apoptóticos e não apoptóticos. Uma das vias de sinalização do inflamassoma de NLRC4 requer a atuação de diferentes caspases, entre elas a caspase-7, uma protease necessária para a restrição da replicação de *L. pneumophila* por meio do inflamassoma de NLRC4 (Akhter et al, 2009). Estudos anteriores demonstraram que caspase-1 é capaz de ativar gasdermina-D e caspase-7, levando a formação de poros e consequente morte celular piroptótica. Além disso, caspase-7 também pode ser clivada por caspase-8, um mecanismo redundante que assegura o controle da replicação do patógeno mesmo que uma parte da via do inflamassoma (via caspase-1) seja inibida. Apesar de seu papel na indução da morte celular, ainda não está elucidado na literatura quais os substratos de caspase-7 envolvidos e por quais mecanismos de ação estes atuam para levar a formação de poros na membrana (Gonçalves et al, 2019) (Figura 19). Desta forma, neste momento do projeto nos propomos a estudar um pouco mais a respeito dos possíveis substratos de caspase-7 que possam estar desempenhando algum papel relevante para a via de sinalização do inflamassoma de NLRC4. A seleção de novos alvos levou em consideração sua associação com a caspase-7, sendo todos substratos da protease.

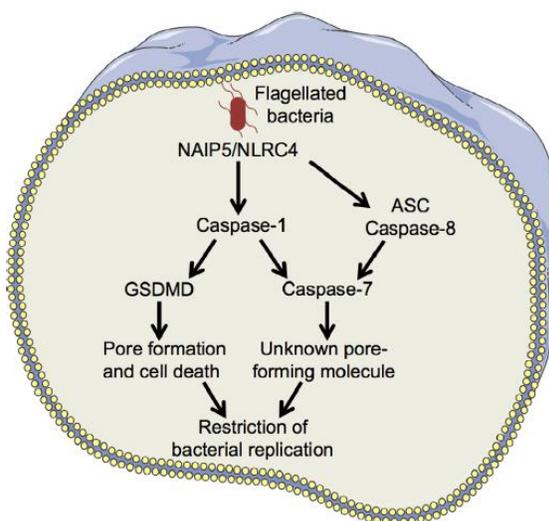


Figura 19. Esquema da via de NAIP5-NLRC4. Adaptado de Andrade e Zamboni (2020).

Um estudo publicado em 2008 identificou diversos substratos de caspase-7 por meio de um ensaio de degradômica, um método capaz de identificar substratos de proteases em amostras biológicas complexas (Jang et al, 2008). Os alvos selecionados estão listados na Tabela 3, sendo eles: *Parp1*, um gene que codifica a proteína Poly [ADP-ribose] polymerase 1 associada a várias atividades celulares como reparo do DNA e regulação de transcrição; FK506-binding protein 4, uma proteína com atividade de co-chaperona envolvida em processos como tráfego intracelular de receptores de hormônios esteroides, regulação da dinâmica de microtúbulos e proteção contra estresse oxidativo na mitocôndria; *Valosin Containing Protein*, relacionada a funções celulares relacionadas com a sinalização por ubiquitina ou para o Sistema Ubiquitina-Proteassoma (UPS), ativação da transcrição, mitose, apoptose, via de reparo do DNA e degradação associada ao Retículo Endoplasmático; e, por fim, a proteína Co-chaperone p23 Hsp90, uma chaperona molecular responsável por facilitar a oxidorredução de PGH2 em prostaglandina E2 e facilitar a hidroxilação de proteínas HIF- α . A Tabela 3 descreve o nome dos genes alvos selecionados e a sequência de sgRNAs sintetizados para os experimentos de deleção gênica, destacando em sublinhado a região de nucleotídeos necessária para construção de um RNA guia.

Tabela 3. Novos alvos selecionados para estudo da via de sinalização do inflamassoma de NLRC4.

Nome do gene	Nome da proteína	Sequência de sgRNAs (5'-3')
PARP1	Poly ADP-ribose	<u>CACCGGGGGGAAACCGACACGTTAG</u> <u>CACCGCAGTAATCTATCCTGAGCGG</u>
FKBP4	FKBP4 binding protein 4	<u>CACCGGGAGCTCTGCTTTGAAGTCG</u> <u>CACCGATCCGCAGAATACGGACTCG</u>
VCP	Valosin containing protein	<u>CACCGCTTCAGGAGTTGGTTCAGGT</u> <u>CACCGTATAGGTCGCTTTGACAGAG</u>
PTGES3	Cochaperona p23 – HSP90	<u>CACCGCTAGCTTAATTGGCTCAGTG</u> <u>CACCGTGTTTGCGAAAAGGAGAATC</u>

5.3.1. Clonagem dos sgRNAs em vetor plasmidial lentiCRISPR v2

Assim como descrito anteriormente, o desenho dos RNAs guia foi realizado pelo software *CRISPRdirect* (<http://crispr.dbcls.jp/>), visando a proximidade com regiões PAM e a especificidade genômica. Os sgRNAs gerados foram clonados dentro do vetor lentiCRISPR-v2 (Addgene plasmid #52961), um vetor lentiviral de terceira geração que apresenta resistência a puromicina e ampicilina, além de um cassete para expressão da enzima Cas9. O inserto de Cas9 possui cerca de 4200 pares de base e uma FLAG fusionada em sua extremidade C terminal (Figura 20). O plasmídeo lentiCRISPR-v2 foi escolhido uma vez que, para este momento de nosso estudo, estaríamos diferenciando macrófagos primários originados de camundongos *Gsdmd^{-/-}* que não expressam constitutivamente a enzima Cas9. Uma vez que já é conhecido que Gasdermina-D é capaz de gerar poros na membrana, a escolha de células *knockout* para a proteína foi necessário para entender melhor a via da caspase-7 no inflamassoma de NLRC4 – que também leva a formação de poros na membrana.

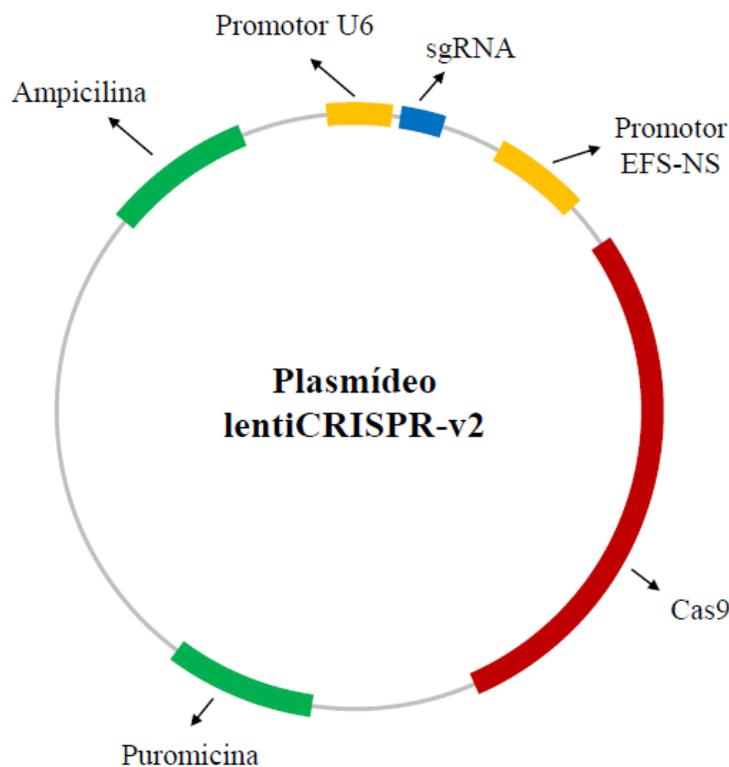


Figura 20. Representação esquemática das principais regiões do plasmídeo lentiCRISPR v2. Este plasmídeo possui o sgRNA sob controle do promotor U6, enquanto a expressão da enzima Cas9 (fusionada a uma FLAG) é controlada pelo promotor EFS-NS. O plasmídeo lentiCRISPR v2 possui o gene de resistência a puromicina e ampicilina, e apresenta um comprimento total de 14.873 pares de base.

Para inserir nossos sgRNAs dentro do vetor em questão, digerimos o plasmídeo com a enzima Esp3I (Figura 21) e seguimos com o protocolo de purificação de DNA em gel de agarose. Após realizar a digestão do vetor, realizamos a clonagem de nossos sgRNAs. Na Figura 22 podemos observar o resultado da amplificação por PCR gerando produtos com cerca de 250 pares de bases. O produto amplificado obtido teve seu tamanho concordante com o previsto, sem apresentar bandas inespecíficas, indicando o sucesso de todos sgRNAs dentro do vetor lentiCRISPR-v2.

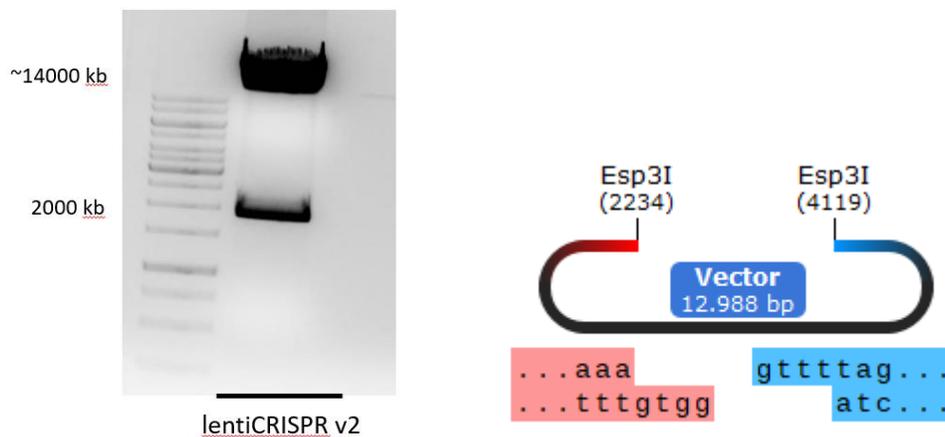


Figura 21. Digestão do plasmídeo lentiCRISPR v2. O vetor lentiCRISPR v2 foi digerido com a enzima Esp3I (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA), gerando um produto com cerca de 13.000 pares de base, assim como ilustrado ao lado da imagem criada pelo *software* SnapGene.

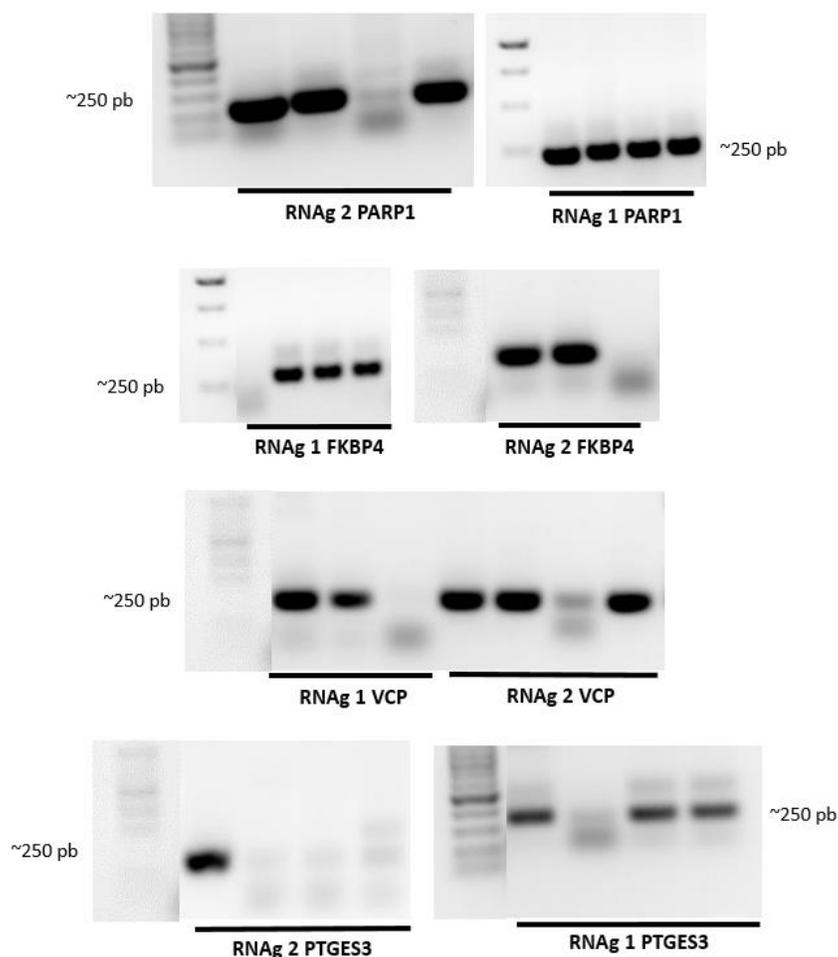


Figura 22. Confirmação da clonagem dos sgRNAs em vetor lentiCRISPR v2. As sequências dos RNAs guia foram confirmadas após a realização de PCR utilizando primers específicos para a sequência do guia e para o vetor lentiCRISPR v2, no qual os sgRNAs foram inseridos. Para cada gene foram desenhados e clonados dois sgRNAs, como apresentado acima.

5.3.2. Ensaio de replicação bacteriana com *L. pneumophila* em macrófagos transduzidos com sgRNAs referentes aos novos genes alvo

Confirmada a eficácia da clonagem molecular de todos nossos sgRNAs (Figura 22), iniciamos o processo de deleção gênica dos nossos genes alvo em macrófagos derivados de medula óssea. Uma vez que nosso atual foco de investigação é a caracterização de genes que codificam proteínas substratos de caspase-7, utilizamos células deficientes em Gasdermina-D para observar o fenótipo de replicação bacteriana após a infecção por *L. pneumophila*. Desta forma, diferenciamos macrófagos derivados

de medula óssea de camundongos *Gsdmd*^{-/-} e realizamos um ensaio de replicação bacteriana.

Como nossos primeiros experimentos não alcançaram o número ideal de macrófagos para infecção por *L. pneumophila* após a etapa de seleção por antibiótico (1×10^5 por poço em placa de 96 poços), chegamos à hipótese de que talvez o problema estivesse no novo vetor utilizado (lentiCRISPR v2). Para investigar esta hipótese, dobramos a concentração dos componentes CRISPR transfectados em células HEK 293, visando aumentar a eficiência da transdução nos macrófagos. Quando conseguimos a quantidade necessária de células, realizamos um experimento de replicação bacteriana teste infectando dois grupos de macrófagos: um que expressava constitutivamente a enzima Cas9 (BMDM Cas9) e outro que não expressava (BMDM B6). Ambos os grupos foram transduzidos com nosso novo vetor carregando o sgRNA de NLRC4, visando a deleção de um gene indispensável para a via do inflamassoma. Como podemos observar na Figura 23, o grupo controle (BMDMs Cas9 transduzidos com o vetor lentiGuide Puro) e o grupo de BMDMs Cas9 transduzidos com nosso vetor lentiCRISPR v2-sgRNA NLRC4 apresentaram um aumento da replicação bacteriana de *L. pneumophila*, indicando que houve a deleção do gene de NLRC4 no pool de células. Já nosso grupo teste (BMDMs B6 transduzidos com o vetor lentiCRISPR v2-sgRNA NLRC4) não obteve o mesmo fenótipo, sugerindo que a deleção de NLRC4 não foi eficaz. Uma vez que o sgRNA do nosso vetor lentiCRISPR v2 levou a deleção do gene em células que expressavam constitutivamente Cas9, hipotetizamos que o sgRNA clonado no vetor é eficaz, enquanto o cassete ou a própria expressão da proteína Cas9 estivesse comprometida.

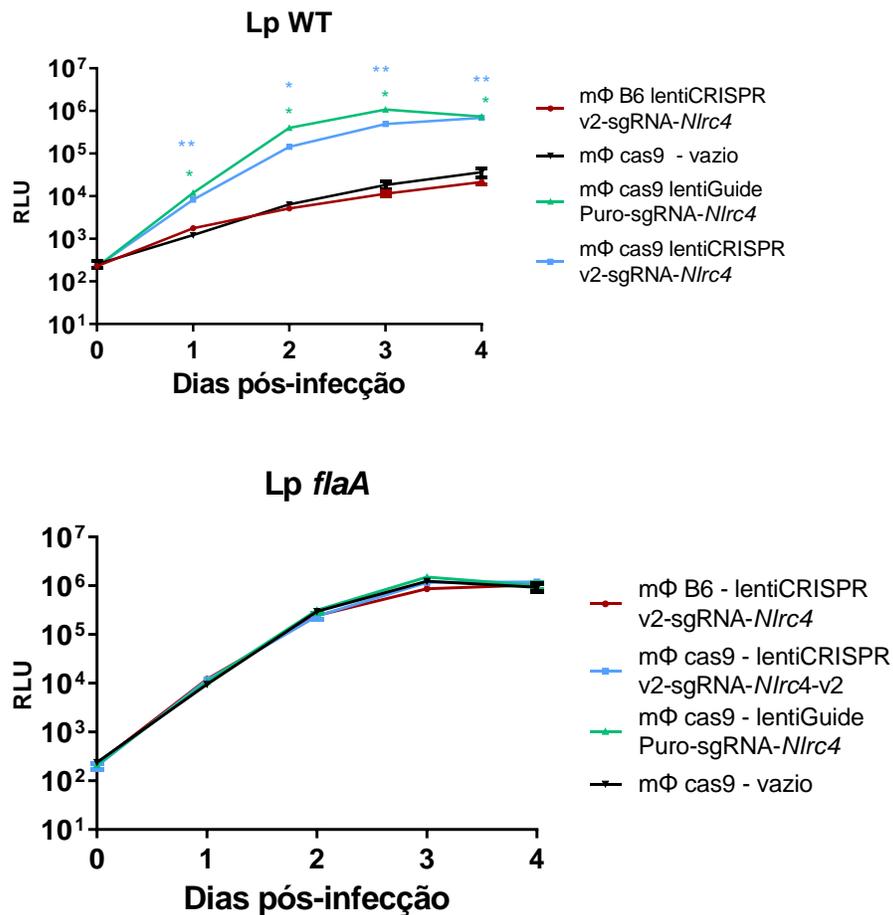


Figura 23. Ensaio de replicação com *L. pneumophila* em macrófagos B6 e Cas9 transduzidos com vetores lentiGuide Puro e lentiCRISPR v2. Macrófagos derivados de medula diferenciados de camundongos selvagem (B6) e Cas9 transduzidos com o vetor lentiCRISPR v2-sgRNA NLRC4. O experimento de replicação bacteriana foi realizado uma vez em triplicata com 1×10^5 células por poço em um MOI de 0,01. Todos grupos foram comparados com o mΦ Cas9 vazio e as diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando P foi <0.05 , como indicado por um asterisco nos gráficos.

Para tanto, realizamos uma PCR convencional para analisar a presença do cassete Cas9 dentro das células do experimento realizado. Na Figura 24 podemos observar que os grupos BMDMs Cas9 transduzidos com o vetor lentiCRISPR v2-sgRNA NLRC4 e lentiGuide Puro-sgRNA NLRC4 apresentam uma marcação de aproximadamente 500 pares de base, confirmando a presença da sequência de

nucleotídeos da proteína Cas9 dentro das células transduzidas com ambos vetores (lentiCRISPR v2 e lentiGuide Puro). O grupo de células BMDMs B6 transduzidas com lentiCRISPR v2-sgRNA NLRC4 apresentou uma banda fraca de mesmo tamanho, sugerindo que as células que não expressavam Cas9 e foram transduzidas apenas com o novo vetor possuíam baixas concentrações do cassete Cas9.

Realizamos outro experimento transfectando BMDMs B6 com o vetor lentiCRISPR v2 carregando os respectivos sgRNAs para os genes de *Nlrc4*, além de *Fkbp4* e *Vcp*. Extraímos o DNA genômico de nossas células para PCR convencional de Cas9, assim como realizado anteriormente. Neste novo experimento, podemos observar que houve a amplificação de Cas9 em todos nossos grupos, dado que corroborou com o resultado anterior, indicando que o cassete de expressão da enzima se encontra presente nas células (Figura 25).

Desta forma, nossos dados indicam que, apesar da ineficiência em gerar células nocaute, a sequência nucleotídica de Cas9 está presente nas células BMDMs B6 transduzidas com nosso vetor lentiCRISPR v2. Baseado em dados anteriores (Figura 23), os sgRNAs clonados no vetor são funcionais quando expressados em células que já codifiquem a enzima Cas9 de forma constitutiva.

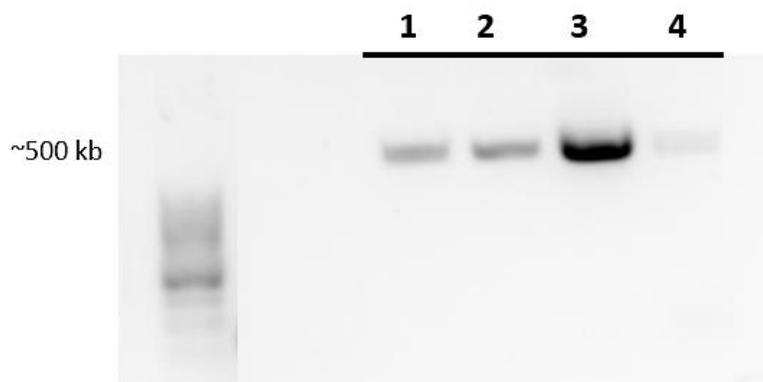


Figura 24. PCR convencional revela presença da sequência nucleotídica de Cas9 em BMDMs transduzidos com lentiCRISPR v2-sgRNA NLRC4 e lentiGuide Puro-sgRNA NLRC4. 1, BMDMs de camundongos Cas9 transduzidos com lentiGuide Puro (controle); 2, BMDMs de camundongos Cas9 transduzidos com lentiGuide Puro-sgRNA NLRC4; 3, BMDMs de camundongos Cas9 transduzidos com lentiCRISPR-sgRNA NLRC4; 4, BMDMs de camundongos C57BL/6 transduzidos com lentiCRISPR-sgRNA NLRC4.

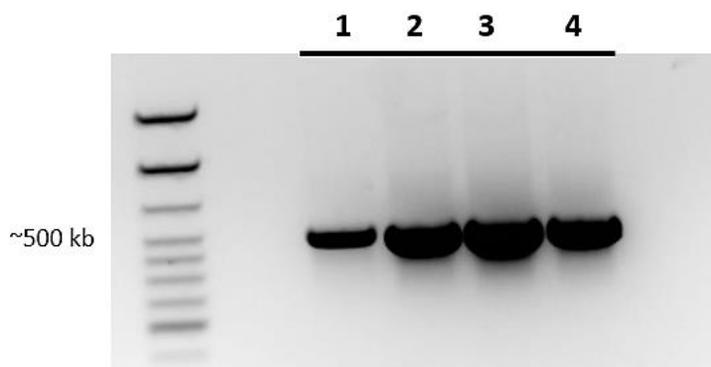


Figura 25. PCR convencional revela presença da sequência nucleotídica de Cas9 em BMDMs transduzidos com lentiCRISPR v2-sgRNA NLRC4, sgRNA FKBP4 e sgRNA VCP. 1, BMDMs C57BL/6 transduzidos com lentiCRISPR v2-sgRNA NLRC4; 2, BMDMs C57BL/6 transduzidos com lentiCRISPR v2 (controle vazio); 3, BMDMs C57BL/6 transduzidos com lentiCRISPR v2-sgRNA FKBP4; 4, BMDMs C57BL/6 transduzidos com lentiCRISPR v2-sgRNA VCP.

6. DISCUSSÃO

Como células do sistema imune inato, os macrófagos são componentes críticos de diversos tecidos. Eles atuam como fagócitos de patógenos e células infectadas, promovendo a produção e secreção de substâncias inflamatórias como citocinas, além de facilitar a interação com outras células do sistema imune. Os macrófagos contribuem para o início e progressão de uma ampla variedade de doenças. Sendo assim, a investigação de novos aspectos de suas funções, assim como de suas características metabólicas e interação com patógenos se faz altamente necessária (Poltavets et al., 2020; Freund et al., 2020; Poltavets et al., 2020).

O sistema de CRISPR-Cas9 revolucionou a engenharia gênica, acelerando drasticamente o estudo sobre funções de genes e sua relação com a funcionalidade celular. Todavia, métodos baseados em CRISPR ainda encontram barreiras que dificultam sua aplicação em algumas células de mamíferos, como os macrófagos primários.

A dificuldade em transfectar e transduzir macrófagos primários com os componentes do sistema CRISPR-Cas9 ocasionam um pequeno número de células sobreviventes após a seleção por antibióticos, limitando abordagens que necessitam de muitos milhões de células (Chan et al., 2020; Roberts et al., 2019). Estes componentes podem ser entregues às células por meio de métodos virais ou não virais. As transfeções celulares não virais normalmente utilizam métodos físicos, como microinjeção de genes, eletroporação, e métodos químicos, como precipitação por fosfato de cálcio ou a utilização de partículas lipídicas chamadas lipossomos (Chong et al., 2021). Os métodos de transferência gênica virais, por sua vez, apresentam uma alta eficiência de transdução, podendo levar a uma longa expressão dos transgenes. Esta técnica envolve a utilização de um vetor viral que carrega uma sequência de interesse a célula alvo, normalmente retrovírus, adenovírus ou vírus adeno-associados.

Muitos dos métodos de transferência gênica não viral comumente utilizados em diversos tipos celulares são considerados ineficientes para macrófagos, levando a uma baixa eficiência de transfecção e expressão dos transgenes nas células (Burke et al., 2002). Por isso, métodos que utilizam vetores virais são os mais recomendados para transduzir células difíceis de transfectar, como células primárias (Chong et al., 2021).

Neste projeto transduzimos nossos macrófagos primários com o sistema de lentivírus de terceira geração. Este sistema é composto por três plasmídeos: um de transferência lentiviral, responsável por codificar nossa sequência de interesse (lentiGuide Puro e lentiCRISPR v2); um plasmídeo de empacotamento psPAX2 composto pelos genes *gag* (proteínas estruturais) e *pol* (enzimas de transcriptase reversa); e um plasmídeo pMD2.G que codifica VSV-G, uma proteína do envelope viral que auxilia a entrada do vírus em uma ampla gama de células (Burns et al., 1993; Milone e O'Doherty, 2018).

Além disso, os macrófagos derivados de medula óssea também são considerados células difíceis de editar geneticamente por causa de seus sensores de imunidade inata. Apesar das partículas lentivirais produzidas em células HEK 293 serem filtradas para remoção de debris celulares, moléculas pequenas e exossomos secretados das células não são totalmente removidos. Desta forma, o sobrenadante contendo as partículas lentivirais são levadas diretamente à cultura de macrófagos em conjunto com esses materiais, levando a potenciais efeitos secundários que afetam a viabilidade celular (Chan et al., 2021).

Muitas das técnicas de manipulação genética de macrófagos envolvem seleção por antibióticos e isolamento de clones individuais, duas etapas que também diminuem drasticamente o número de células, além de atrasar a linha do tempo fenotípica das células, levando a uma perda significativa de suas propriedades originais. Além disso, macrófagos primários apresentam um curto tempo de vida, impedindo outras formas de manipulação genética, como segundos nocautes e superexpressão de proteínas. Por causa dessas limitações, vários estudos utilizam linhagens celulares imortalizadas incapazes de apresentar vias metabólicas e inflamatórias importantes presentes em células primárias (Chan et al., 2021; Roberts et al., 2019).

Apesar das dificuldades encontradas, conseguimos otimizar nosso protocolo de deleção gênica em macrófagos primários utilizando o sistema CRISPR-Cas9, gerando células nocaute para os genes *asc* e *nirc4*. Em um primeiro momento deste projeto, padronizamos o protocolo de deleção gênica em BMDMs que expressavam constitutivamente a enzima Cas9. Para tanto, utilizamos o sistema lentiviral de terceira geração, como explicado anteriormente, utilizando o vetor de transferência lentiGuide

Puro, um plasmídeo capaz de expressar o sgRNA de *S. pyogenes* por meio de um promotor U6. Embora a expressão constitutiva de Cas9 possa levar a um aumento do acúmulo de mutações *off-targets* a longo prazo que comprometem a eficiência do processo de edição (Chan et al., 2020), confirmamos a eficácia de nosso protocolo para deleção gênica em macrófagos primários. A diminuição da produção e secreção da citocina IL-1 β (Figura 10) e o aumento da replicação de *L. pneumophila* (Figuras 12 a 17) validam a eficácia da deleção de *Asc* e *Nlrc4*, respectivamente. Por outro lado, nossos dados demonstraram que macrófagos primários transduzidos com os sgRNAs dos nossos genes de interesse (*Ccar1*, *Smchd 1*, *Pdia3*, *Irf204*, *Hspa9*, *S100a4*, *Myh9* e *Dhx9*) não demonstraram um fenótipo na replicação de *L. pneumophila*. É importante mencionar que não foi possível confirmar a deleção de nossos genes de interesse, uma vez que seria pouco inviável a avaliação da expressão de todos os alvos por Western Blot. Com isso, não podemos afirmar que os genes em questão não possuem relevância para a via do inflamassoma de NLRC4.

Além disso, nos propomos a padronizar um protocolo de deleção gênica utilizando o sistema de CRISPR-Cas9 em células que não expressassem constitutivamente a enzima Cas9. Para tanto, clonamos nossos sgRNAs em um plasmídeo lentiCRISPR v2, um vetor que possui o cassete de expressão da enzima Cas9. Todavia, não alcançamos o resultado esperado, uma vez que não houve deleção dos genes de interesse em macrófagos B6 transduzidos com o vetor lentiCRISPR v2-sgRNA NLRC4 (Figura 23). Apesar de observarmos a presença da sequência nucleotídica da proteína Cas9 (Figuras 24 e 25), não houve aumento da replicação de *L. pneumophila* nas células transduzidas com o vetor, assim como esperado caso a deleção de NLRC4 tivesse sido bem sucedida.

A maior diferença entre os vetores lentiCRISPR v2 e lentiGuide Puro é que o primeiro expressa o cassete de Cas9, enquanto o segundo expressa apenas o sgRNA. Por causa da presença da sequência Cas9, o lentiCRISPR v2 apresenta quase 15.000 pares de bases em comparação com os 10.182 pares de base do lentiGuide Puro. O tamanho dos plasmídeos a serem entregues em uma célula é um fator limitante para alguns sistemas, como no caso da utilização do vetor viral adenoassociado que apresenta um pequeno tamanho de empacotamento – cerca de 5.000 pb. Como explicado anteriormente, vetores lentivirais foram utilizados neste projeto para entregar

os componentes CRISPR às células alvo. Os lentivírus possuem um tamanho de empacotamento maior que os vírus adenoassociados, com cerca de 11.000 pares de base (Perry e Rayat, 2021). Neste sistema, a utilização de vetores longos reduz o título viral, além de reduzirem a eficiência de transfecção, sendo incorporados com menos frequência (Sweeney e Vink, 2021). Vetores com tamanhos maiores também podem encontrar restrições físicas, levando a uma incorporação ineficiente de suas partículas às células (Gélinas e Temin, 1986).

Sendo assim, uma das hipóteses que formulamos para a ineficácia da deleção de genes utilizando o lentiCRISPR v2 é que o extenso tamanho do vetor foi um fator limitante para a quantidade de lentivírus formados nas células HEK, levando a uma menor incorporação do vetor nos macrófagos. Todavia, como nossos dados demonstraram, os sgRNAs presentes no vetor estavam funcionais e foram incorporados aos macrófagos B6 (Figura 23). Desta forma, presumimos que o vetor lentiCRISPR v2 com os respectivos sgRNAs se integrou às células, apesar de não ter levado a deleção esperada.

Apesar de termos detectado a presença da sequência nucleotídica da enzima Cas9, indicando que o vetor foi incorporado às células, nossos dados não constataram se a enzima estaria sendo expressa de maneira funcional ou se foi translocada para o núcleo. A sequência de Cas9 em vetores plasmidiais apresenta um sinal de localização nuclear (NLS), responsável por auxiliar a translocação da enzima em células eucarióticas. Caso algo interfira em sua translocação, a enzima não conseguirá chegar ao núcleo e gerar a quebra de fita dupla no DNA. Da mesma forma, caso a enzima não esteja sendo expressa de maneira funcional, o sistema CRISPR-Cas9 estará incompleto e não será capaz de editar o gene.

7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente projeto nos permitem concluir que:

- Os desenhos experimentais de nossos sgRNAs e suas clonagens realizadas em vetores lentiGuide-Puro foram realizadas com sucesso;
- A manipulação genética em macrófagos derivados de medula óssea utilizando nosso protocolo otimizado de CRISPR-Cas9 com o vetor lentiGuide-Puro foi confirmada após a deleção de genes como *Asc* e *Nlrc4*, genes que codificam proteínas importantes para a via de sinalização do inflamassoma de NLRC4;
- Com base nos ensaios fenotípicos realizados, nossos dados não suportam a hipótese que os genes *Ccar1*, *Smchd1*, *Pdia3*, *Ifi204*, *Hspa9*, *S100a4*, *Myh9* e *Dhx9* apresentem relevância para a via de sinalização pelo inflamassoma de NLRC4;
- A clonagem dos novos sgRNAs foi realizada com sucesso no vetor lentiCRISPR v2, todavia, não houve confirmação da geração de células nocaute utilizando este plasmídeo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKHTER, A. et al. Caspase-7 Activation by the Nlr4/IpaF Inflammasome Restricts Legionella pneumophila Infection. **PLoS Pathog**, v.5, n.4, 2009.
- ALTHAUS, K; GREINACHER, A. MYH9-related platelet disorders. **Semin Thromb Hemost**, v. 35, n.2, p. 189-203, 2009.
- AMER, A. et al. Regulation of Legionella phagosome maturation and infection through flagellin and host IpaF. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 46, p. 35217-35223, 2006.
- ANDERS, C. et al. Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. **Nature**, 513:569–73, 2014.
- BARRANGOU, R.; MARRAFFINI, L. A. CRISPR-Cas systems: prokaryotes upgrade to adaptive immunity. **Molecular cell**, v. 54, n. 2, p. 234-244, 2014.
- BRENNER, D. J. Classification of the legionellae. In: **Seminars in respiratory infections**, p. 190-205, 1987.
- BRODSKY, I. E. et al. A Yersinia effector protein promotes virulence by preventing inflammasome recognition of the type III secretion system. **Cell host & microbe**, v. 7, n. 5, p. 376-387, 2010.
- BROUGHTON, J. P. et al. CRISPR–Cas12- based detection of SARS-CoV-2. **Nat Biotechnol**, 16:1-5, 2020.
- BROZ, P. et al. Differential requirement for Caspase-1 autoproteolysis in pathogen-induced cell death and cytokine processing. **Cell host & microbe**, v. 8, n. 6, p. 471-483, 2010.
- BROZ, P.; DIXIT, V. M. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 7, p. 407, 2016.
- CANNA, S. W. et al. An activating NLRC4 inflammasome mutation causes autoinflammation with recurrent macrophage activation syndrome. **Nature genetics**, v. 46, n. 10, p. 1140-1146, 2014.
- CASE, C. L.; ROY, C. R. Asc modulates the function of NLRC4 in response to infection of macrophages by Legionella pneumophila. **MBio**, v. 2, n. 4, p. e00117-11, 2011.

CASE, C. L.; SHIN, S.; ROY, C. R. Asc and Ipaf Inflammasomes direct distinct pathways for caspase-1 activation in response to Legionella pneumophila. **Infection and immunity**, v. 77, n. 5, p. 1981-1991, 2009.

CHAN, W. et al. Efficient Immune Cell Genome Engineering with Enhanced CRISPR Editing Tools. **Immunohorizons**, v. 5, n.2, p.117-132, 2021.

CHANDRASEKARAN, A. P. et al. Different Methods of Delivering CRISPR/Cas9 Into Cells. **Prog Mol Biol Transl Sci**, v.159, p1.57-176, 2018.

CHANG, F.; YU, V. L. Legionella Infection In Harrison's principles of internal medicine. **Medical Publishing Division**, p. 871-874, 2005.

CHAVARRÍA-SMITH, J.; VANCE, R.. E. Direct proteolytic cleavage of NLRP1B is necessary and sufficient for inflammasome activation by anthrax lethal factor. **PLoS pathogens**, v. 9, n. 6, 2013.

CHEN, J. S. et al. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate singlestranded DNase activity. **Science**, v.360, p.436–439, 2018.

CHEN, Y. H., et al. Viral vectors for gene transfer. **Current Protocols in Mouse Biology**, 2018.

CONG, L. et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. **Science**, v. 339, n. 6121, p. 819-23, 2013.

COOKSON, B. T.; BRENNAN, M. A. Pro-inflammatory programmed cell death. **Trends in microbiology**, v. 3, n. 9, p. 113-114, 2001.

CORNU, T. I. et al. Refining strategies to translate genome editing to the clinic. **Nat. Med**, v. 23, p. 415–423, 2017.

DAYA, S.; BERNIS, K.I. Gene therapy using adeno-associated virus vectors. **Clin Microbiol Rev**, v.21, p.583–93, 2008.

DELTCHEVA, E. et al. 2011. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. **Nature**, v. 471, p. 602–7, 2011.

DELTCHEVA E. et al. CRISPR RNA maturation by trans-coded small RNA and host factor RNase III. **Nature**, 2011.

DING, X. et al. All-in-One dual CRISPR-cas12a (AIOD-CRISPR) assay: a case for rapid, ultrasensitive and visual detection of novel coronavirus SARS-CoV-2 and HIV virus. **bioRxiv**, 2020.

DOEBBELING, B. N.; WENZEL, R. P. The epidemiology of Legionella pneumophila infections. In: **Seminars in respiratory infections**, p. 206-221, 1987.

DOMINGUEZ, A. et al. Beyond editing: repurposing CRISPR-Cas9 for precision genome regulation and interrogation. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 17, n.1, p. 5-15, 2016.

DOUDNA, J. A.; CHARPENTIER, E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. **Science**, v. 346, n. 6213, p. 1258096, 2014.

E. DELTCHEVA et al., CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. **Nature**, v.471, p.602–607, 2011.

ESCORS, D.; BRECKPOT, K. Lentiviral vectors in gene therapy: their current status and future potential. **Arch Immunol Ther Exp**, v. 58, p. 107-19, 2010.

FERNANDES-ALNEMRI, T. et al. AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. **Nature**, v.458, n. 7237, p. 509-13, 2009.

FINK, S. L.; COOKSON, B. T. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. **Infection and immunity**, v. 73, n. 4, p. 1907-1916, 2005.

FINK, S. L.; COOKSON, B. T. Caspase - 1 - dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages. **Cellular microbiology**, v. 8, n. 11, p. 1812-1825, 2006.

FLINT, J.; NEMEROW, G. R. Adenovirus composition, structure, and biophysical. In (New Jersey: World Scientific) **Human Adenoviruses: From Villains to Vector**, v. 53, p. 15–42, 2017.

FRANCHI, L. et al. Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1 β in salmonella-infected macrophages. **Nature immunology**, v. 7, n. 6, p. 576-582, 2006.

FREUND, E. C. et al. Efficient gene knockout in primary human and murine myeloid cells by non-viral delivery of CRISPR-Cas9. **J Exp Med**, v. 217, n. 7, 2020.

GASIUNAS, G. et al. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. **PNAS**, 109:E2579–86, 2012.

GONÇALVES, A. V. et al. Gasdermin-D and Caspase-7 are the key Caspase-1/8 substrates downstream of the NAIP5/NLRC4 inflammasome required for restriction of *Legionella pneumophila*. **PLoS Pathog**, 15(6):e1007886, 2019.

GONG, Y.N.; SHAO, F. Sensing bacterial infections by NAIP receptors in NLRC4 inflammasome activation. **Protein & cell**, v. 3, n. 2, p. 98-105, 2012.

GOOTENBERG, J.S. et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. **Science**, v. 356, p. 438–442, 2017.

GRATZ, S.J. et al. Genome engineering of *Drosophila* with the CRISPR RNA-guided Cas9 nuclease. **Genetics**, v.194, p.1029–1035, 2013.

GUO, L. et al. Optimizing conditions for calcium phosphate mediated transient transfection. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 24, n. 3, p. 622–629, 2017.

HORII, T. et al. Validation of microinjection methods for generating knockout mice by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. **Sci Rep**, v. 4, n. 4513, 2014.

HORNUNG, V. et al. AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. **Nature**, v. 458, n. 7237, p. 514-518, 2009.

HRYHOROWICZ, M et al. CRISPR/Cas9 Immune System as a Tool for Genome Engineering. **Arch Immunol Ther Exp**, v. 65, n. 3, p.233-240, 2017.

HORWITZ, M. A.; SILVERSTEIN, S. C. Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) multiplies intracellularly in human monocytes. **The Journal of clinical investigation**, v. 66, n. 3, p. 441-450, 1980.

ISBERG, R. R. et al. The *Legionella pneumophila* replication vacuole: making a cosy niche inside host cells. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 1, p. 13-24, 2009.

ISHINO, Y. et al. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. **Journal of bacteriology**, v. 169, n. 12, p. 5429-5433, 1987.

JANG, M. Mining of caspase-7 substrates using a degradomic approach. **Mol Cells**, v. 26, n. 2, p. 152-7, 2008.

JINEK, M. et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. **Science**, v. 337, n. 6096, p. 816-21, 2012.

JORGENSEN, I. et al. Pyroptosis triggers pore-induced intracellular traps (PITs) that capture bacteria and lead to their clearance by efferocytosis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 213, n. 10, p. 2113-2128, 2016.

KIM, D.; ROSSI, J. RNAi mechanisms and applications. **Biotechniques**, v. 44, n. 5, p.613-616, 2008.

KIM, S. et al. Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. **Genome Res**, v. 24, p. 1012–9, 2014.

KOFOED, E. M.; VANCE, R. E. Innate immune recognition of bacterial ligands by NAIPs determines inflammasome specificity. **Nature**, v. 477, n. 7366, p. 592-595, 2011.

KOLB, R. et al. Obesity-associated NLRC4 inflammasome activation drives breast cancer progression. **Nature communications**, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2016.

LATZ, E. et al. Activation and regulation of the inflammasomes. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 6, p. 397-411, 2013.

Li, S-Y. et al. CRISPR-Cas12a assisted nucleic acid detection. **Cell Discov**, v. 4, n. 1, p. 1-4, 2018.

LI, YG. et al. Poly (I:C), an agonist of toll-like receptor-3, inhibits replication of the Chikungunya virus in BEAS-2B cells. **Virology Journal**, v. 9, n. 114, 2012.

LIM, J. et al. Upregulation of the NLRC4 inflammasome contributes to poor prognosis in glioma patients. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-10, 2019.

LINO, C. A. et al. Delivering CRISPR: a review of the challenges and approaches. **Drug Deliv**, v. 25, n. 1, p 1234-1257, 2018.

LUCIA, C. et al. An ultrasensitive, rapid, and portable coronavirus SARS-CoV-2 sequence detection method based on CRISPRCas12. **bioRxiv**, 2020.

MAKAROVA, K. S. et al. Unification of Cas protein families and a simple scenario for the origin and evolution of CRISPR-Cas systems. **Biol Direct**, v. 6, n. 38, 2011.

MAKAROVA, K. S. et al. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. **Nat Rev Microbiol**, v. 9, p. 467-77, 2011.

MAKAROVA, K. S.; KOONIN, E. V. Annotation and Classification of CRISPR-Cas Systems. **Methods Mol Biol**, 1311:47-75, 2015.

MARIATHASAN, S. et al. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. **Nature**, v. 440, n. 7081, p. 228-232, 2006.

MARIATHASAN, S. et al. Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. **Nature**, v. 430, n. 6996, p. 213-218, 2004.

MARTINON, F. et al. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. **Nature**, v. 440, n. 7081, p. 237-241, 2006.

MARTINON, F., BURNS, K. & TSCHOPP, J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of pro IL-1 β . **Molecular Cell**, v.10, n.2, p. 417–426, 2002.

MASCARENHAS, D. P. A; ZAMBONI, D. S. Inflammasome biology taught by Legionella pneumophila. **Journal of leukocyte biology**, v. 101, n. 4, p. 841-849, 2017.

MASCARENHAS, D. P. A. **A ativação de caspase-8 no inflamassoma de Naip5/NLRC4 em resposta a infecção por Legionella pneumophila**. Tese (Doutorado) – Biologia Celular e Molecular, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

MIAO, E. A. et al. Caspase-1-induced pyroptosis is an innate immune effector mechanism against intracellular bacteria. **Nature immunology**, v. 11, n. 12, p. 1136, 2010.

MIAO, E. A. et al. Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1 β via Ipaf. **Nature immunology**, v. 7, n. 6, p. 569-575, 2006.

MIAO, E. A. et al. Innate immune detection of the type III secretion apparatus through the NLRC4 inflammasome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 7, p. 3076-3080, 2010.

MINGOZZI, F.; HIGH, K. A. Therapeutic in vivo gene transfer for genetic disease using AAV: progress and challenges. **Nat Rev Genet**, v. 12, n. 5, p. 341–355, 2011.

MITOMA, H. et al. The DHX33 RNA helicase senses cytosolic RNA and activates the NLRP3 inflammasome. **Immunity**, v. 39, n. 1, p. 123-35, 2013.

MOJICA, F. J. M. et al. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. **Molecular microbiology**, v. 36, n. 1, p. 244-246, 2000.

MOJICA, F. J. M. et al. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. **Journal of molecular evolution**, v. 60, n. 2, p. 174-182, 2005.

MOLOFSKY, A. B. et al. Cytosolic recognition of flagellin by mouse macrophages restricts *Legionella pneumophila* infection. **The Journal of experimental medicine**, v. 203, n. 4, p. 1093-1104, 2006.

NALDINI, L. et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. **Science**, v. 272, n. 5259, p. 263–267, 1996.

NG, YC. et al. A DNA-sensing-independent role of a nuclear RNA helicase, DHX9, in stimulation of NF- κ B-mediated innate immunity against DNA virus infection. **Nucleic Acids Res**, v. 46, n. 17, p. 9011-9026, 2018.

PALUSIŃSKA-SZYSZ, M.; CENDROWSKA-PINKOSZ, M. Pathogenicity of the family Legionellaceae. **Archivum immunologiae et therapiae experimentalis**, v. 57, n. 4, p. 279-290, 2009.

PEREIRA, M. S. F. et al. Activation of NLRC4 by flagellated bacteria triggers caspase-1–dependent and–independent responses to restrict *Legionella pneumophila* replication in macrophages and in vivo. **The Journal of Immunology**, v. 187, n. 12, p. 6447-6455, 2011.

PEREIRA, M. S. F. et al. The Nlrc4 inflammasome contributes to restriction of pulmonary infection by flagellated *Legionella* spp. that trigger pyroptosis. **Frontiers in microbiology**, v. 2, p. 33, 2011. 19

PERRY, C.; RAYAT, A. C. M. E. Lentiviral Vector Bioprocessing. **Viruses**, v. 13, n. 2, p. 268, 2021.

PRASANNA, G. L.; PANDA, T. Electroporation: basic principles, practical considerations and applications in molecular biology. **Bioprocess Engineering**, v. 16, n. 5, p. 261–264, 1997.

RAJAN, J.V. et al. Activation of the NLRP3 inflammasome by intracellular poly I:C. **FEBS Lett**, v. 584, n. 22, p. 4627-32, 2010.

RICHTER, H. et al. Exploiting CRISPR/Cas: interference mechanisms and applications. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 7, p. 14518-14531, 2013.

ROBERTS, A. W. et al. Cas9+ conditionally-immortalized macrophages as a tool for bacterial pathogenesis and beyond. **eLife**, v. 8, e45957, 2019.

SANDER, J.D.; JOUNG, J. K. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. **Nature biotechnology**, v. 32, n. 4, p. 347, 2014.

SANJANA, N. E. et al. Improved lentiviral vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. **Nature Methods**, 2014.

SCHUMANN, K. et al. Generation of knock-in primary human T cells using Cas9 ribonucleoproteins. **Proc Natl Acad Sci**, 112:10437–42, 2015.

SHABBIR, M. A. et al. Survival and Evolution of CRISPR-Cas System in Prokaryotes and Its Applications. **Front Immunol**, v. 7, 2016.

SHALEM, O. et al. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. **Science**, v. 343, p. 83-7, 2014.

SHI, J. et al. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. **Nature**, v. 526, n. 7575, p. 660-665, 2015.

SHMAKOV, S. et al. Discovery and functional characterization of diverse class 2 CRISPR-Cas systems. **Mol Cell**, v. 60, n. 3, p. 385–97, 2015.

SINKUNAS, T. et al. Cas3 is a single-stranded DNA nuclease and ATP-dependent helicase in the CRISPR/Cas immune system. **EMBO J**, v. 30, n. 7, p. 1335-42, 2011.

STOUT, J. E.; YU, V. L. Legionellosis. **New England Journal of Medicine**, v. 337, n. 10, p. 682-687, 1997.

SUTTERWALA, F. S. et al. Critical role for NALP3/CIAS1/Cryopyrin in innate and adaptive immunity through its regulation of caspase-1. **Immunity**, v. 24, n. 3, p. 317-327, 2006.

SUTTERWALA, F.S. et al. Immune recognition of *Pseudomonas aeruginosa* mediated by the IPAF/NLRC4 inflammasome. **The Journal of experimental medicine**, v. 204, n. 13, p. 3235-3245, 2007.

SUZUKI, Toshihiko et al. Differential regulation of caspase-1 activation, pyroptosis, and autophagy via IpaF and ASC in *Shigella*-infected macrophages. **PLoS pathogens**, v. 3, n. 8, 2007.

TURVEY, S. E.; BROIDE, D. H. Innate immunity. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, p. 24-32, 2010.

VAN DER OOST, J. et al. Unravelling the structural and mechanistic basis of CRISPR–Cas systems. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 7, p. 479-492, 2014.

VANNUCCI, L. et al. Viral vectors: a look back and ahead on gene transfer technology. **New Microbiol**, v. 36, n. 1, p. 1–22, 2013.

WU, Z. et al. Effect of genome size on AAV vector packaging. **Mol Ther**, v. 18, p. 80–6, 2010.

XIE, K.; YANG, Y. RNA-guided genome editing in plants using a CRISPR–Cas system. **Mol Plant**, v. 6, n. 6, p. 1975–83, 2013.

ISHINO, Y. et al. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in Escherichia coli, and identification of the gene product. **J. Bacteriol**, v. 169, p. 5429–5433, 1987.

YANG, H. et al. One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. **Cell**, v. 154, p. 1370–9, 2013.

ZAMBONI, D. S. et al. The Birc1e cytosolic pattern-recognition receptor contributes to the detection and control of Legionella pneumophila infection. **Nature immunology**, v. 7, n. 3, p. 318-325, 2006.

ZHAO, Y. et al. The NLRC4 inflammasome receptors for bacterial flagellin and type III secretion apparatus. **Nature**, v. 477, n. 7366, p. 596-600, 2011.

ZHU, S. et al. Nlrp9b inflammasome restricts rotavirus infection in intestinal epithelial cells. **Nature**, v. 546, n. 7660, p. 667-670, 2017.