Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada

AMANDA DE MATOS BECERRA

Identificação de novas proteínas envolvidas na ativação do inflamassoma de NLRC4

Ribeirão Preto
2022

AMANDA DE MATOS BECERRA

Identificação de novas proteínas envolvidas 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.

Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.
Orientador: Prof. Dario Simões Zamboni.
Coorientador: Warrison Athanásio 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

Becerra, Amanda Matos

Identificação de novas proteínas envolvidas na ativação do inflamassoma de NLRC4, Ribeirão Preto, 2022.

Ribeirão Preto, São Paulo, 2022, 79 f. : il. 30cm

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

Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.
Orientador: Dario Simões Zamboni.
Coorientador: Warrison Athanásio Coelho de Andrade.

1. Inflamassoma; 2. *Legionella pneumophila*; 3. Pak2

Nome: Becerra, Amanda Matos

Título: Identificação de novas proteínas envolvidas na ativação do inflamassoma de NLRC4.

Ribeirão Preto, 2022.

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. Instituição: FMRP - USP

Julgamento:_____ Assinatura:_____

Prof. Dra. Instituição:

Julgamento:_____ Assinatura:_____

Prof. Dr. Instituição:

Julgamento:_____ Assinatura:_____

DEDICATÓRIA

Aos meu pais e a minha avó.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por me guiar e me proteger durante toda minha trajetória.

Agradeço ao meu orientador Dario, pela oportunidade em fazer parte do seu grupo de pesquisa. Obrigada pela confiança em meu trabalho e por toda dedicação durante esse período. Agradeço por todos os momentos de discussões cientificas que foram tão importantes para a formação de nossos pensamentos críticos. Obrigada também por oferecer uma estrutura de alta qualidade para o desenvolvimento desse projeto.

Ao Warrison por toda coorientação durante meu mestrado. Obrigada pela oportunidade em continuar seu projeto e por ter me ensinado grande parte de tudo que eu sei hoje. Obrigada por se fazer presente todos os dias mesmo estando tão longe e por ter tido tanta paciência comigo ao longo desses dois anos. Seus conselhos me ajudam a enfrentar os dias difíceis na ciência. Agradeço também a amizade que construímos além do meio acadêmico.

Aos meus pais, Denise e Alcides por serem minha fonte diária de amor, força e incentivo. São vocês que vibram comigo cada pequena conquista. São vocês que me enriquecem com sábios conselhos e me acalmam com cada palavra de afeto. São vocês que me dão asas para voar, me lembrando sempre das minhas raízes. Então dedico a vocês essa conquista. Obrigada pelo apoio incondicional, vocês são a base de tudo em minha vida.

A minha avó Eunice, por ser o exemplo mais lindo de bondade e humildade. Obrigada por se fazer presente todos os dias e por mais difícil que seja, entender que a distância é necessária para meu crescimento. “De todo o amor que eu tenho, Metade foi tu que me deu”. Você é minha pessoa preferida no mundo e é uma honra ser sua neta.

As minhas irmãs Beatriz e Mariana, que deixam minha vida mais leve e colorida. Que compreendem minha ausência no dia-a-dia e torcem por mim de longe. Vocês são meus maiores presentes. Obrigada por dividirem a vida comigo.

Aos meus avós Aparecida e Alcides e aos meus tios, Marco, Guina e Simone, a minha madrasta Janaina obrigada pelo apoio, carinho e incentivo. Vocês fazem parte de cada conquista minha.

Agradeço à Val e ao Sidney por sempre me incluírem em suas orações. Eu amo vocês.

Aos meus amigos/irmãos de Olímpia, Leticia, Gabriela, Edson, Sofia, Natalia, Raquel, Mariana, Felipe, Luana, Bruna. Obrigada pela amizade de tantos anos. Obrigada por respeitarem minha ausência principalmente durante esse período e por me proporcionarem tantos momentos bons quando estou presente. Vocês são minha segunda família.

À Ana Luiza e Fernanda, por serem as melhores amigas que a UFTM me presenteou. As minhas amigas, Julia e Beatriz por continuarem compartilhando tantas experiencias e momentos pós faculdade. À Juliana e Poliane, pela amizade e carinho, apesar da distância. Vocês são para a vida toda.

Às amizades que construí em Ribeirão: Camila, Leticia, Tamara e Samuel, Mari e Isa. Obrigada por terem deixado meus dias mais leves e por dividirem tantos momentos bons, dentro ou fora do laboratório. Vocês foram indispensáveis nesse período. Agradeço em especial a Tamara por ter me acolhido desde o meu primeiro dia no laboratório e por ter me ensinado tanto durante a pandemia. Em especial também à Camila por ser minha parceirinha em tudo, obrigada por tantos conselhos de vida, sua amizade me acrescenta muito.

Aos meus amigos emocionados, Izadora, Vinicius, Lucas, Gabriel, Warrison e Camila por deixarem meus fins de semanas mais felizes em Ribeirão e por sempre me lembrarem que a vida não é só trabalhar. Vocês são muito importantes pra mim.

Aos meus colegas de laboratório, Leticia, Adriene, Rhanoica, Marco, Carol, Moíses, Keyla, Amanda S, Dani, Joaquim. Obrigada por esses dois anos de convivência, pelas discussões cientificas e por tantos momentos de descontração. Eu aprendo e me divirto muito com cada um de vocês.

À Maira, Amanda, Débora, Josi por todo suporte técnico e por proporcionarem as condições necessárias para o desenvolvimento da pesquisa cientifica em nosso laboratório.

Aos técnicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto que direta ou indiretamente contribuíram para desenvolvimento desse trabalho.

Aos professores do programa de Imunologia Básica e Aplicada.

À Ana Cristine, secretária da pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada pela dedicação e cuidado com cada aluno e por ter me recebido tão bem desde o curso de inverno.

Agradeço aos membros da banca examinadora pela disponibilidade e pelas considerações para melhoria desse trabalho.

À coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**) pelo suporte financeiro.

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original”.

Albert Einstein.

Becerra, Amanda Matos. Identificação de novas proteínas envolvidas na ativação do inflamassoma de NLRC4. 2022, 79p. Dissertação de mestrado (Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

RESUMO

O inflamassoma é uma plataforma multiproteica formada a partir do reconhecimento de diferentes sinais, como o estresse ou dano celular e moléculas microbianas. Dentre os diferentes inflamassomas, NAIP/NLRC4 é um dos mais estudados e está envolvido no reconhecimento de moléculas microbianas no citosol, promovendo resistência do hospedeiro à infecção. Como objetivo principal do trabalho, propusemos identificar novas proteínas envolvidas na ativação do inflamassoma de NLRC4. Para isso, utilizamos a técnica de CRISPR-cas9 para deleção, em macrófagos, de genes previamente identificados em nosso laboratório, para avaliar seus possíveis papéis na ativação do inflamassoma. Dentre os genes, avaliados encontramos uma serina-treonina quinase que demonstrou ter um papel importante na via de ativação de NLRC4. Realizamos ensaios de replicação utilizando *Legionella pneumophila* como modelo, e descobrimos que a serina-treonina quinase tem papel importante no controle da infecção mediada por NAIP/NLRC4 tanto *in vivo*, quanto *in vitro*. Além disto, para investigar se este gene também estaria envolvido na ativação e morte celular por diferentes inflamassomas, macrófagos deficientes para a serina-treonina quinase foram gerados, e estimulados com nigericina, para avaliação do inflamassoma de NLRP3; poly (dA:dT) para avaliação de AIM2; *Legionella pneumophila* de tipo selvagem para avaliar NAIP/NLRC4; e *L. pneumophila* deficiente em flagelina para avaliar a ativação mediada via caspase-11. Nossos resultados demonstram que a serina-treonina quinase está envolvida na ativação de todos os inflamassomas, conforme observado pela redução da produção de IL-1β, caspase-1 e morte celular, além de uma redução na formação de punctas de ASC, indicando que essa proteína é importante para a oligomerização de ASC. Além disto, foi observado que a serina-treonina quinase colocaliza com os punctas de ASC, sugerindo uma interação física entre ela com o inflamassoma.

Palavras chaves: Inflamassoma, *Legionella pneumophila,* Pak2

Becerra, Amanda Matos. Identification of novel proteins involved in NLRC4 inflammasome activation. 2022, 79p. Master's Dissertation (Postgraduate Program in Basic and Applied Immunology) – Ribeirão Preto School of Medicine, University of São Paulo, Ribeirão Preto.

ABSTRACT

The inflammasome is a multiprotein platform formed from the recognition of different signals, such as stress or cellular damage and microbial molecules. Among the different inflammasomes, NAIP/NLRC4 is one of the most studied and is involved in the recognition of microbial molecules in the cytosol, promoting host resistance to infection. As the main objective of the work, we proposed to identify new proteins involved in the activation of the NLRC4 inflammasome. For this, we used the CRISPR-cas9 technique for deletion, in macrophages, of genes previously identified in our laboratory, to evaluate their possible roles in inflammasome activation. Among the genes evaluated, we found a serine-threonine kinase that has been shown to play an important role in the NLRC4 activation pathway. We performed replication assays using *Legionella pneumophila* as a model, and found that serine-threonine kinase plays an important role in controlling NAIP/NLRC4-mediated infection both in vivo and in vitro. Furthermore, to investigate whether this gene is also involved in cell activation and death by different inflammasomes, serine-threonine kinase-deficient macrophages were generated, and stimulated with nigericin, to evaluate the NLRP3 inflammasome; poly (dA:dT) for AIM2 evaluation; wild-type *L. pneumophila* to assess NAIP/NLRC4; and flagellin-deficient *L. pneumophila* to assess caspase-11-mediated activation. Our results demonstrate that serine-threonine kinase is involved in the activation of all inflammasomes, as observed by reduced production of IL-1β, caspase-1 and cell death, in addition to a reduction in ASC puncta formation, indicating that this protein is important for ASC oligomerization. In addition, serine-threonine kinase was observed to colocalize with ASC punctas, suggesting a physical interaction between it and the inflammasome.

Keywords: inflammasome**,** *Legionella pneumophila,* Pak

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura geral dos receptores NLRs 20
Figura 2. Dois sinais extracelulares distintos são necessários para induzir a ativação do inflamassoma**.** 25
Figura 3. Consequências da ativação de diferentes inflamassomas em resposta a *Legionella pneumophila***.**. 28
Figura 4. Genes envolvidos na formação de poro via NLRC4**.**.....46
Figura 5. PAK2 apresenta um papel no controle da replicação por *L. pneumophila* 48
Figura 6. O controle da replicação de *Legionella* é prejudicado em macrófagos nocautes de *Pak2*.. 48
Figura 7. PAK1 não apresenta papel na replicação de *Legionella pneumophila* WT *in vitro* 50
Figura 8. Diminuição de IL-1β e de LDH em macrófagos nocautes de *Pak2* estimulados com *Legionella* WT e *flaA***.**.....51
Figura 9. Diminuição de IL-1β e de LDH em macrófagos nocautes de *Pak2* em diferentes estímulos.. 53
Figura 10. PAK2 apresenta papel principal na ativação dos inflamasomas.. 54
Figura 11. O tratamento com FRAX597 promoveu diminuição na ativação do inflamassoma em macrófagos.....56
Figura 12. PAK2 medeia oligomerização ASC 57
Figura 13. PAK2 interage com os punctas de ASC. 59
Figura 14. O controle da replicação de *Legionella* é prejudicado em animais tratados com inibidor de Pak1-2……...59
Figura 15. *Pak2* é deletado em macrófagos através de CRISPR-cas9. 60
Figura 16. Modelo proposto de ativação de diferentes inflamassomas mediado pela quinase PAK2**.**.....69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lista de genes que potencialmente interagem com o inflamassoma de NLRC4**.** 44

LISTA DE ABREVIATURAS

AIM2	Ausente em melanoma 2
ANOVA	Análise de variância
AP-1	Proteína ativadora 1
ASC	Proteína semelhante a agregado associada à apoptose
ATP	Trifosfato de adenosine
BioID	Identificação de proteinas dependente de aproximação
BirA	Biotinilação enzimática com *E. coli* biotina ligase
BMDMs	Macrófagos derivados de medula óssea
CASP1	Caspase-1
CARD	Domínio de recrutamento de caspase
CAPS	Síndrome Periódica Associada à Criopirina
CLRs	Receptores de lectina tipo C
CRISPR	Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas
CYE	Agar Carvão-Extrato de Levedura
DAMPs	Padrões moleculares associados ao dano
DAPI	4,6-diamidino-2-phenylindole
DCs	Células dendríticas
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DKO	Duplo nocaute
cDNA	DNA complementar
Elisa	Ensaio imunoenzimático
ER	Retículo endoplasmático
FCAS	Síndrome Familiar Autoinflamatória Associada ao Frio
FlaTox	Flagelina fundida à toxina letal de Bacillus anthracis
GFP	Proteina fluorescente verde
GSDMD	Gasdermina-D

IL-18	Interleucina-18
IL-1β	Interleucina-1β
IL-1R	Receptor de interleucina 1
IL-6	Interleucina-6
IFN	Interferon
IRF	Fatores reguladores de interferon
LDH	Lactato desidrogenase
Lpn *flaA*	L. pneumophila mutante para flagelina
Lpn WT	L. pneumophila selvagem
LRR	Repetições ricas em leucina
LPS	Lipopolissacarídeo
MAS	Síndrome de ativação de Macrófagos
MyD88	Myeloid differentiation primary response gene
MOI	Multiplicidade de infecção
µg	Micrograma
µL	Microlitros
µM	Micromolar
mg	Miligrama
mM	Milimolar
NAIPs	Proteína inibidora de apoptose neuronal
NEK7	Quinase 7 relacionada a NIMA
NF-κB	Fator nuclear κB
NLRC4	Receptor semelhante a NOD contendo CARD 4
NLRPs	Receptores semelhantes a NOD contendo domínio pirina
NLRs	Receptores semelhantes a NOD
NOD	Domínio de ligação de nucleotídeo e oligomerização
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PAK	Quinases ativadas p21
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PI	Iodeto de propídeo
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrão

PP2A	Proteína fosfatase 2 (PP2A
PKCδ	Proteína Cinase C
PYD	Domínio pirina
RLRs	Receptores semelhantes a RIG
RPMI	Meio Roswell Park Memorial Institute
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RNA	Ácido ribonucleico
RLU	Medição da luminescência
S533	Serina 533
SFB	Soro fetal bovino
sgRNA	RNA guia de fita dupla
TLRs	Receptores semelhantes a Toll
TNF	Fator de necrose de tumores
T3SS	Sistema de secreção do tipo III
UFCs	Unidades formadoras de colônia
LRRK2	Quinase-2 contendo repetições ricas em leucina

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....15
1. INTRODUÇÃO.....17
1.1 Receptores de reconhecimento de padrões do sistema imune inato..... 18
1.2 Receptores do tipo NOD..... 19
1.3 Inflamassoma e seus mecanismos efetores..... 21
1.4 Inflamassoma formados por NLRP3 22
1.5 Inflamassoma formados por NLRC4 26
2. OBJETIVOS.....31
2.1 Objetivo geral. 32
2.2 Objetivos específicos. 32
3. MATERIAIS E MÉTODOS 33
3.1 Animais 34
3.2 Diferenciação de macrófagos a partir de células de medula óssea 34
3.3 Clonagem..... 34
3.4 Cultura de células, transfecção e inibidores..... 35
3.5 Geração de BMDMs nocaute por CRISPR-cas9..... 35
3.6 Cultura e preparação de bactérias 36
3.7 Ativação de inflamassoma e infecções..... 36
3.8 Ensaio de formação de poros 36
3.9 Ensaio de replicação bacteriana em macrófagos..... 37
3.10 Ensaios de replicação in vivo..... 37
3.11 Ensaio para avaliar a atividade da caspase-1..... 38
3.12 Quantificação de lactato desidrogenase (LDH). 38
3.13 Dosagem de IL-1β por ELISA..... 38
3.14 Imunofluorescência para avaliar a formação de punctas de ASC..... 39
3.15 Imunofluorescência para avaliar a colocalização de ASC com PAK2. 39
3.16 Análise de Western blot..... 40
3.17 Crosslinking ASC em macrófagos..... 41
3.18 Análise estatística. 41
4. RESULTADOS 42

4.1 Identificação de possíveis genes envolvidos na via de sinalização do inflamassoma de NLRC4. 43
4.2 *Gsn* e *Pak2* estão envolvidos na formação de poro desencadeado por flagelina. 45
4.3 PAK2 está envolvido no controle da *Legionella pneumophila* in vitro. 46
4.4 Macrófagos deficientes em *Pak2*, mas não *Pak1*, são mais susceptíveis a replicação de *Legionella pneumophila* WT em macrófagos. 49
4.5 Ausência de PAK2 reduz ativação do inflamassoma desencadeado por *L. pneumophila* em macrófagos. 50
4.6 PAK2 está envolvido na ativação de vários inflamassomas. 51
4.7 PAK1 possui um papel secundário na ativação de vários inflamassomas. 54
4.8 A inibição de PAK1/2 com FRAX597 diminui a ativação de várias vias de inflamassomas. 55
4.9 PAK2 está *upstream* a oligomerização e formação de puncta de ASC. 56
4.10 PAK2 é importante para o controle da replicação de *L. pneumophila* mediado pelo inflamassoma de NLRC4 *in vivo*. 59
4.11 Confirmação da deleção de *Pak2* em macrófagos por CRISPR-cas9. 59
5. DISCUSSÃO 61
6. CONCLUSÃO 68
7. REFERÊNCIAS 70

1. INTRODUÇÃO

1.1 Receptores de reconhecimento de padrões do sistema imune inato

Durante a evolução da interação entre patógenos e hospedeiro, bactérias, parasitos e vírus tem interagido com seus hospedeiros em processo que favoreceu o surgimento de diversos mecanismos de defesa do hospedeiro. Por outra lado, os patógenos também desenvolveram estratégias para escapar do reconhecimento pelo hospedeiro[1]. O sistema imunológico dos mamíferos pode ser dividido em duas partes: a imunidade inata e a imunidade adaptativa. A imunidade inata é a primeira linha de defesa do hospedeiro contra patógenos e danos teciduais, e é mediada por fagócitos, como macrófagos e células dendríticas (DCs), células Natural Killer (NKs), proteínas do soro e barreiras físicas. Por outro lado, a imunidade adquirida está envolvida na eliminação de patógenos na fase tardia da infecção, assim como na geração de memória imunológica, mediadas por linfócitos T e B[2].

O reconhecimento de patógenos é mediado por receptores codificados na linhagem germinativa, conhecidos como receptores de reconhecimento de padrões (PRRs). Esses receptores são essenciais para o início da resposta imune inata. PRR reconhecem estruturas moleculares amplamente compartilhadas por patógenos, conhecidos como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) ou padrões moleculares associados ao dano (DAMPs), gerados durante processos infecciosos e inflamação. Após o reconhecimento, os PRRs iniciam cascatas de sinalização levando principalmente à indução de citocinas pró-inflamatórias[3,4].

Os PRRs podem ser encontrados associados as membranas celulares, como por exemplo a membrana plasmática ou endossomos, ou dispersos no citoplasma. Os PRRs são classificados em cinco famílias principais, incluindo os receptores do tipo Toll (TLR do inglês Toll-like receptors), os receptores do tipo RIG (RIG do inglês retinoic acid-inducible gene-I-like receptors- RLRs), os receptores de lectina do tipo C (CLR do inglês C-type lectin), os receptores do tipo ALRs (AIM2-like receptors), e os receptores do tipo NOD (NLR do inglês Nucleotide-binding and oligomerization domain (NOD)-like receptors)[5].

Dentre os PRRs, podemos destacar os receptores do tipo toll, que são proteínas transmembrana do tipo I, formadas por uma porção extracelular contendo regiões ricas

em leucina, responsáveis pela ligação aos PAMPs; um domínio transmembrânico, e um domínio citoplasmático semelhante ao domínio intracelular do receptor para IL-1, responsável pela transdução do sinal intracelular[6]. Dez TLRs foram identificados em humanos e doze em camundongos, sendo que diferentes subclasses desses receptores reconhecem diferentes padrões moleculares de microrganismos, tais como: lipopolissacarídeo (LPS) presente na parede celular de bactérias gram-negativas; flagelina de bactérias; RNA de fita dupla; RNA de fita simples, entre outros[7]. A ativação dos TLRs após o reconhecimento de seu ligante, induz a translocação nuclear de um conjunto de fatores de transcrição como o NF-κB, AP-1 e IRFs, resultando na transcrição de genes de citocinas pró inflamatórias, importantes para a resposta imune[8].

Entretanto, os TLRs reconhecem patógenos na superfície celular ou nas membranas endossomais, sendo incapazes de detectar patógenos presentes no citoplasma. Patógenos intracelulares podem ser detectados por diferentes PRRs citoplasmáticos, sendo as proteínas NOD-LRR a maior família de PRRs citoplasmáticos conhecida atualmente[9].

1.2 Receptores do tipo NOD

Os NLRs apresentam localização citoplasmática e possuem função fundamental no reconhecimento de componentes microbianos citoplasmáticos e/ou sinais de perigo endógenos, iniciando a ativação da resposta imune inata[10,11]. Em humanos, a família dos NLRs é composta por 23 proteínas, sendo que em camundongos existem aproximadamente 34 genes NLR[12]. Os NLRs apresentam uma estrutura característica composta por três domínios: um domínio LRR presente na porção carboxi-terminal, que é responsável pelo reconhecimento do ligante; um domínio NOD ou *nucleotide binding domain* (NBD) localizado centralmente e responsável pela oligomerização do receptor após sua ativação; e um domínio amino-terminal variável, o qual desencadeia a função efetora do receptor[13] **(Figura1).**

Na ausência de PAMPs ou DAMPs, os NLRs encontram-se em uma forma inativa, onde as regiões efetoras permanecem protegidas pela região LRR, bloqueando sua ativação. A detecção de moléculas pelo LRR promove uma modificação estrutural no receptor, resultando na exposição de sítios de ligação ao ATP, permitindo sua ligação ao

domínio NOD, o qual se oligomeriza e promove o recrutamento de proteínas efetoras, culminando na ativação de fatores de transcrição e/ou ativação de caspases[14].

Dentre os membros da família NLR, NOD1 e NOD2 foram os primeiros receptores a serem identificados, e são capazes de reconhecer componentes da parede celular de bactérias no citosol do hospedeiro. NOD1 também conhecido como NLRC1, reconhece ácido γ-D-glutamil- meso- diaminopimélico encontrado predominantemente em bactérias Gram-negativas, enquanto que NOD2 ou NLRC2 detecta o dipeptídeo muramil encontrado nos peptidoglicanos da maioria das bactérias[15,16]. Após o reconhecimento de seus respectivos ligantes, NOD1 e NOD2 se ligam à proteína adaptadora Rip2 por meio de uma interação CARD-CARD, culminando na ativação de NF-κB e produção de citocinas pró inflamatórias[17].

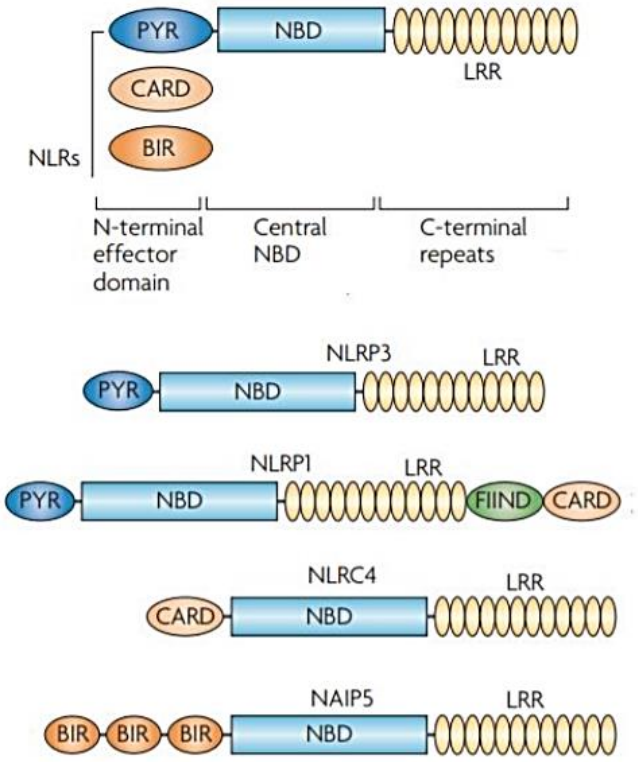


Figura 1: Estrutura geral dos receptores NLRs. Os NLR compartilham uma arquitetura molecular composta por uma porção C terminal rica em repetições de leucina (LRR); um domínio central NBD (também denominado NOD) que atua na oligomerização do receptor e um domínio efetor N-terminal, que pode ser um domínio pirina (PYD), um domínio CARD (domínio de recrutamento de caspases) ou domínio BIR (repetições IAP de baculovírus). Os inflamassomas de NLRP3 e NLRP1 possuem o PYR como domínio

N-terminal, já o inflamassoma de NLRC4 e o NAIP5 possui o CARD e o BIR, respectivamente. Adaptado de: TING, Jenny PY et al. *Nature reviews Immunology*, 2008[18].

1.3 Inflamassoma e seus mecanismos efetores

Os NLRs também participam na formação de um complexo multiproteico chamado inflamassoma. Esse complexo é formado no citosol em resposta a diversos estímulos como patógenos e estresse celular, e está envolvido com clivagem e ativação de caspases, que culminam com a produção de citocinas pró-inflamatórias e morte celular conhecida como piroptose[19].

Existem seis inflamassomas distintos caracterizados: os inflamassomas de 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[20]. O inflamassoma de AIM2 (absent in melanoma 2) está envolvido no reconhecimento de fitas duplas de DNA no citosol[21]. E atualmente, os inflamassomas mais estudados e que serão detalhados a seguir, são os formados pelas proteínas NLRP3 e NLRC4.

Em geral, após o reconhecimento do ligante e ativação, o NLR recruta o adaptador apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC), cuja oligomerização permite o recrutamento e ativação de pro-caspase-1 para sua forma ativa. A molécula ASC é formada por um domínio PYD N-terminal e um domínio CARD C-terminal, que permitem a ligação com outras proteínas contendo PYD e CARD através de interações proteína-proteína homotípicas. Vários filamentos ASC se oligomerizam formando um único ponto conhecido como puncta de ASC. A formação desses punctas indica que o inflamassoma foi ativado. Assim, uma vez que caspase-1 é recrutada por ASC e ativada, ela medeia a clivagem das citocinas pró-IL-1β e pró-IL-18 para suas formas ativas secretadas[22,23].

As citocinas IL-1β e IL-18 são importantes para desencadear o início da cascata inflamatória durante a resposta inata do hospedeiro à infecção diferentes infecções. A IL-1β é a citocina mais estudada da família IL-1 devido seu papel na indução da resposta

inflamatória. Através da ligação ao seu receptor IL-1R (receptor interleukin 1), ela induz a produção e liberação de citocinas pró inflamatórias como IL-6 e TNF e de outras quimicionas importantes para fase aguda da infecção. Já a IL-18 tem um papel na diferenciação de células T helper devido sua função de produzir interferon-γ (IFN-γ), além de promover respostas inflamatórias locais[24,25].

Além disso, foi demonstrado que a morte celular em consequência da ativação do inflamassoma ocorre através da atividade proteolítica que caspase-1 e 11 exercem na proteína gasdermina D (GSDMD)[26]. A clivagem de GSDMD por caspase-1/11 leva a formação de um fragmento N-terminal, este se oligomeriza na membrana levando a formação de poros (0-15 nm de diâmetro), permitindo a liberação de IL-1 e o influxo de água, o que leva a ruptura celular e a morte celular inflamatória conhecida como piroptose[27,28].

A morte celular por piroptose tem um papel importante no controle da replicação bacteriana dentro de macrófagos, no entanto apenas a formação de poro não é suficiente para conter a infecção. 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 ao recrutamento de neutrófilos e a eliminação do patógeno por eferocitose[29]. Além disso, também já foi demonstrado que esse mecanismo de controle da infecção é independente das citocinas IL-1β e IL-18[24].

1.4 Inflamassoma formados por NLRP3

O NLRP3 (criopirina) foi identificado como um gene associado a síndrome autoinflamatória chamada CAPS (CAPS do inglês *Cryopyrin-associated periodic syndrome*), que inclui entre elas a síndrome familiar autoinflamatória associada ao frio (FCAS) e a Síndrome de Muckle-Wells (MWS). Posteriormente, foi demonstrado que NLRP3 está envolvido na patogênese de diversas doenças neuroinflamatórias, incluindo as doenças de Alzheimer, Parkinson e Prion, além também de gota, esclerose múltipla, artrite reumatoide, diabetes e aterosclerose[30]. O NLRP3 responde a uma ampla gama de estímulos, incluindo ligantes derivados de patógenos (componentes microbianos da parede celular, RNA, DNA e toxinas formadoras de poros), ligantes ambientais (sílica e

amianto) e sinais de perigo endógenos (ATP, β-amilóide e cristais de ácido úrico)[22]. A falta de semelhança química e estrutural entre esta diversidade de estímulos, sugere que NLRP3 detecte mudanças na homeostase celular desencadeadas após o contato com o estímulo[31].

Vários mecanismos estão sendo propostos como estando envolvidos na ativação do NLRP3. Por exemplo, a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), efluxo de íons potássio e cloreto, DNA mitocondrial oxidado, liberação de catepsinas, alteração dos níveis intracelulares de cálcio[31], todos já foram demonstrados como tendo papel na ativação do inflamassoma de NLRP3, mas nenhum mecanismo unificador foi identificado até hoje. Entretanto, existem evidências de diversos grupos demonstrando que o efluxo de potássio é o mecanismo comum para a ativação do NLRP3, embora já tenha sido demonstrada a ativação de NLRP3 independente do efluxo de potássio[32,33].

O inflamassoma de NLRP3 também pode ser ativado pela via não canônica através do lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano. O LPS é capaz de se ligar diretamente a caspase-11 através do domínio CARD e desencadear sua oligomerização e ativação. Uma vez ativada, caspase-11 cliva gasdermina-D, que leva a formação de poros na membrana, permitindo o efluxo de potássio e ativação do inflamassoma de NLRP3[34]. A piroptose dependente de Caspase-11 via ativação por LPS parece ser totalmente dependente de Gasdermina-D, ao passo que a morte celular via Caspase-1 é parcialmente dependente de Gasdermina-D quando ATP ou Nigericina são utilizados como ativador de NLRP3[35].

Apesar do mecanismo de ativação de NLRP3 ainda ser alvo de muitos estudos, já está bem descrito que a ativação do NLRP3 requer dois sinais. O primeiro estímulo, conhecido como *priming* acontece quando receptores do tipo toll reconhecem seu ligante levando a ativação do fator de transcrição NF-kB, esse por sua vez é responsável pela expressão de pró-IL1β e NLRP3. Já o segundo estímulo, está envolvido na ativação de NLRP3 e indução da montagem do inflamassoma **(Fig. 2).** Além disso, foi demonstrado que o primeiro sinal mediado via sinalização por TLR4/MyD88 também está envolvido no *priming* não transcricional, mediando a desubiquitinação de NLRP3, que é essencial para sua ativação[36]. Também foi demonstrado que NEK7, (NEK7 do inglês *NIMA-related*

kinase 7), uma proteína envolvida na progressão do ciclo celular, está envolvida na ativação do NLRP3. NEK7 interage com o domínio LRR do NLRP3 e é importante para sua oligomerização e ativação[37].

Sob condições de repouso, NLRP3 está localizado principalmente no retículo endoplasmático (ER), e ASC está localizada no núcleo, citosol e mitocôndrias. Devido a essa localização espacial diferente, a translocação das proteínas é necessária para a montagem do inflamassoma. Foi demonstrado que a acumulação de alfa tubulina acetilada medeia o transporte das mitocôndrias para o ER de maneira dependente de dineína, aproximando ASC e NLRP3, e indicando também um papel dos microtúbulos na ativação do inflamassoma de NLRP3[38].

Além dos primeiros e segundos sinais envolvidos na ativação do inflamassoma de NLRP3, modificações pós-traducionais como ubiquitinação/desubiquitinação e fosforilação/desfosforilação também estão envolvidas com a inibição e ativação do inflamassoma. Estes medeiam processos como inibição da interação entre proteínas do complexo, inibição ou indução da degradação via proteassoma, entre outros[39,40]. Diversos trabalhos tem demonstrado o papel das modificações pós-traducionais no controle da ativação do inflamassoma de NLRP3. Por exemplo, três desubiquitinases, A20, BRCC3 e USP50 foram diretamente implicadas no processo de ativação do inflamassoma de NLRP3; enquanto A20 se liga à pró-IL1 e caspase-1 e controla a ativação de NLRP3, ambos BRCC3 e USP50 regulam positivamente o inflamassoma de NLRP3, desubiquitinando o domínio LRR e facilitando sua ativação, e desubiquitinando ASC e mediando sua ligação à NLRP3, respectivamente[41,42].

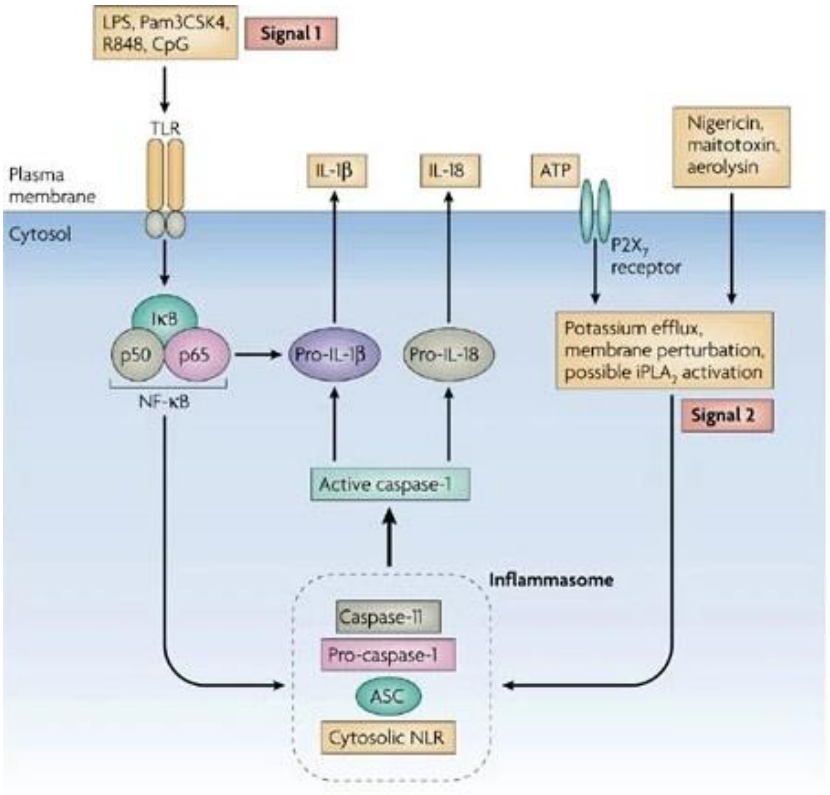


Figura 2: Dois sinais extracelulares distintos são necessários para induzir a ativação do inflamassoma. No primeiro sinal, agonistas do receptor Toll like (TLR), tais como: LPS, Pam3CSK4 e R848 induzem a síntese de pró-interleucina-1β (pró-IL-1β) e componentes do inflamassoma, como a caspase-11, pro-caspase1, ASC entre outros. No segundo sinal, estímulos como ATP, nigericina podem causar danos na membrana que são percebidos pelo NLRP3 no citoplasma. Dessa maneira, NLRP3 se oligomeriza, recruta a molécula adaptadora ASC que por sua vez ativa pró caspase-1, culminando assim na clivagem de pro-IL1β e pro-IL-18 nas suas formas ativas, e levando a morte celular por piroptose através da Gasdermina-D. Fonte: MARIATHASAN, et al, *Nature reviews Immunology*, 2007[43].

A fosforilação por PKA da serina 295 (Serina 291 no NLRP3 de camundongo) presente no domínio NACHT, foi descrita recentemente como regulador chave no processo de ativação do NLRP3, levando a inibição da ativação de NLRP3. Por outro lado, a fosforilação da serina 295 por PKDs foi recentemente relatada como necessária para a ativação do NLRP3. De fato, a fosforilação da serina 295 impede inicialmente o recrutamento de NLRP3 para as mitocôndrias associadas ao ER (MAMs), que é necessário por sua ativação, enquanto a fosforilação da serina 295 posteriormente pelas PKDs, permite a sua liberação dos MAMs para ser ativado no citosol[44,45]. Além disso, a montagem do inflamassoma de NLRP3 também requer a desfosforilação da serina 5 (serina 3 no NLRP3 de camundongo) no domínio PYD, uma vez que a fosforilação da serina 5 impede o recrutamento de ASC por repulsão eletrostática. A inibição da proteína

fosfatase 2 (PP2A) reduz drasticamente a ativação de NLRP3, indicando que PP2A está envolvida na ativação do inflamassoma[46,47]. Devido à grande diversidade de estímulos capazes de ativar a NLRP3, este é o inflamassoma mais estudado, e seu papel foi descrito em uma variedade de infecções e doenças inflamatórias, mas mesmo assim, muitas informações importantes sobre a ativação e inibição do NLRP3 ainda não foram totalmente demonstradas.

1.5 Inflamassoma formados por NLRC4

O inflamassoma de NLRC4 encontra-se expresso principalmente em células mieloides e epiteliais[48]. NLRC4 é formado por um domínio CARD na parte N-terminal que se liga e medeia a ativação de caspase-1 via interação dos domínios CARD-CARD presente em ambas proteínas, sendo ASC portanto dispensável para indução de piroptose por NLRC4. Por outro lado, a maturação e secreção de citocinas pelo inflamassoma de NLRC4 é dependente de ASC[49,50].

A ativação de NLRC4 não é mediada diretamente pelo ligante, ao invés disso, uma família de proteínas chamadas NAIPs (NAIP do inglês *NLR apoptosis inhibitory proteins*) reconhece o ligante e medeia a ativação do NLRC4. Existem três componentes bacterianos distintos que quando presentes no citosol são reconhecidos pelos NAIPs; flagelina, a subunidade monomérica do flagelo bacteriano; as proteínas rod (haste) e needle (agulha) presentes no sistema de secreção do tipo III (T3SS). O NLRC4 é ativado por três componentes bacterianos distintos quando presentes no citosol; flagelina, a subunidade monomérica do flagelo bacteriano; e as proteínas rod (haste) e needle (agulha) presentes no sistema de secreção do tipo III (T3SS)[51-53].

Em camundongos, o componente da agulha e haste do T3SS se ligam a NAIP1 e NAIP2, respectivamente, já a flagelina se liga à NAIP5 e NAIP6, levando a indução da oligomerização de NLRC4[53]. Em humanos, que possuem somente um NAIP, acredita-se que este seja capaz de reconhecer as diferentes moléculas[54]. Após a ligação do NAIP ao seu respectivo ligante e oligomerização de NLRC4, o complexo NAIP-NLRC4 induz o recrutamento de ASC e sua oligomerização, permitindo assim a ativação da Caspase-1. Como dito anteriormente, a montagem do inflamassoma, por sua vez, tem a função de mediar a clivagem proteolítica e a secreção de pró-IL-1β e pró-IL-18 em suas formas

bioativas[22].

A *Legionella pneumophila* tem sido um bom modelo para avaliar o mecanismo de ativação do inflamassoma de NLRC4. Em modelo murino, foi demonstrado que a ativação da caspase-1 por várias bactérias, incluindo *Salmonella typhimurium, Legionella pneumophila e Yersinia pestis* é dependente do NLRC4, sendo este importante para o controle da infecção[52,54]. Essa atividade na *Legionella* é mediada pelo reconhecimento da flagelina, uma vez que na sua ausência, NLRC4 não é ativado e a bactéria escapa da resposta imune do hospedeiro, propiciando assim a sua replicação dentro da célula[55].

A *Legionella pneumophila* tem sido um bom modelo para avaliar o mecanismo de ativação do inflamassoma de NLRC4. Em modelo murino, foi demonstrado que a ativação da caspase-1 por várias bactérias incluindo *Salmonella* Typhimurium*, Legionella pneumophila e Yersinia pestis* é dependente do NLRC4, sendo este importante para o controle da infecção[52,54]. Essa atividade na *Legionella* é mediada pelo reconhecimento da flagelina, uma vez que na sua ausência, a bactéria consegue escapar da resposta imune do hospedeiro, propiciando assim a sua replicação dentro da célula[55].

Também foi demonstrado que camundongos A/J, que são deficientes para o alelo de NAIP5, são mais susceptíveis a infecção por *L. pneumophila,* quando comparado com animais que possuem o alelo, como os da linhagem C57BL/6[56,57]. Além disso, foi descrito que macrófagos derivados de animais nocautes para NAIP5 e NLRC4, tiveram a ativação de caspase-1 e a liberação de LDH reduzida em resposta à infecção por *Legionella*[58]. Portanto, devido ao seu papel essencial na resposta imune inata à flagelina, NAIP5/NLRC4 tem sido a principal via a ser investigada na infecção por *Legionella*.

Embora o inflamassoma de NLRC4 seja o principal no controle da infecção por *L. pneumophila*, outros inflamassomas também são ativados em resposta a mesma. Um deles é o inflamassoma de AIM2, que reconhece seu DNA de fita dupla no citoplasma, levando ao recrutamento de ASC e consequentemente ativação de caspase-1[59]. O domínio CARD da caspase-11 também é capaz de reconhecer o lipídio A presente na molécula de LPS da *Legionella*[60], após o reconhecimento, a caspase-11 induz a clivagem de Gasdermina-D levando a formação de poros na membrana da célula. Esse processo é importante por desencadear o efluxo de potássio e consequentemente a ativação de

NLRP3 dependente de ASC importantes para a produção de citocinas inflamatórias[61] (**Fig.3**). No entanto, foi demonstrado que o inflamassoma de NLRP3 não é importante para ativação de caspase-1, assim como também não interfere na replicação induzida por *L. pneumophila*[62].

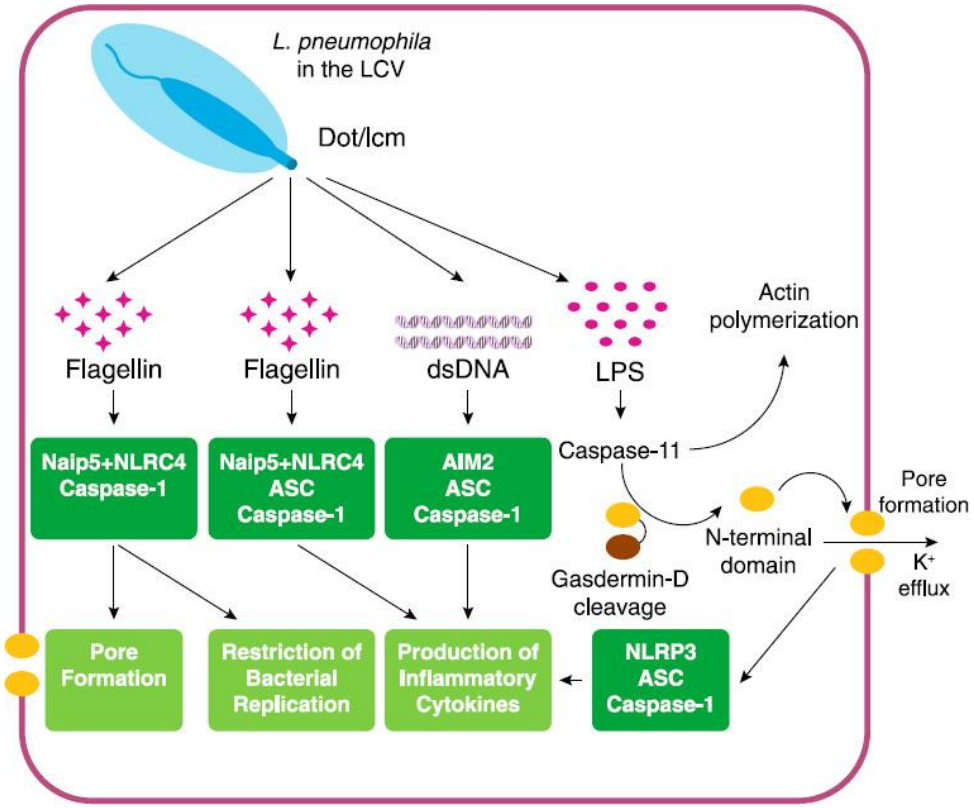


Figura 3: **Consequências da ativação de diferentes inflamassomas em resposta a *Legionella pneumophila*.** O reconhecimento da flagelina via NAIP5/NLRC4 pode acontecer de forma dependente ou não da molécula adaptadora ASC. Na sua ausência, os receptores juntamente com a caspase-1 ativa são capazes de induzir a formação de poro na membrana da célula e de restringir a replicação bacteriana, por outro lado, a presença de ASC induz a produção de citocinas da família IL-1. O inflamassoma de AIM2 é ativado através do reconhecimento de dsDNA da *Legionella*, ele recruta ASC e caspase-1 desencadeando na secreção de citocinas e piroptose. Caspase-11 por sua vez, reconhece o LPS da bactéria e induz a formação de poros na membrana ocasionando a saída de potássio da célula. Dessa forma, o inflamassoma de NLRP3 é ativado em consequência da diminuição desse íon intracelular, levando também a produção de citocinas inflamatórias[61]. (fonte: MASCARENHAS & ZAMBONI, Journal of leukocyte biology, 2017)

Por outro lado, estudos genéticos em humanos identificaram diferentes mutações de ganho de função no NLRC4 associadas a doenças autoinflamatórias. Células contendo mutações apresentaram ativação espontânea de caspase-1 e produção de altos níveis de IL-1β e IL-18, levando a quadros graves de inflamação intestinal, e autoinflamação semelhante a causada pela hiperativação de NLRP3[63-65]. Interessantemente, mutações variadas no NLRC4 podem levar a diferentes doenças autoinflamatórias, como por

exemplo a síndrome de ativação macrofágica, do inglês, MAS (Macrophage activation syndrome), enterocolite neonatal, vasculopatia trombótica fetal entre outras, sugerindo que mutações em sítios diferentes geram respostas e doenças variadas[66].

Além das doenças decorrentes de mutações no NLRC4, também tem sido descrito o papel do inflamassoma de NLRC4 na patogênese do câncer. No melanoma por exemplo, ele demonstrou ter um papel na redução da progressão da doença[67]. Por outro lado, em câncer de mamas relacionados a obesidade, a produção de IL-1β via NLRC4 aumentou a progressão do tumor[68]. Portanto, um maior conhecimento das moléculas envolvidas na ativação e sinalização via NLRC4, pode contribuir para o melhor entendimento de alguns cânceres e de doenças autoinflamatórias mediadas pelo mesmo. Além dos primeiros e segundos sinais envolvidos na ativação do inflamassoma, modificações pós-traducionais como ubiquitinação/desubiquitinação e fosforilação/desfosforilação também estão envolvidas com a inibição e ativação do inflamassoma. Estes medeiam processos como inibição da interação entre proteínas do complexo, inibição ou indução da degradação via proteassoma, entre outros[69,70].

Já foi demonstrado que o NLRC4 murino é fosforilado na Serina 533 (S533) em resposta à infecção por *Salmonella*. Foi demonstrado que macrófagos expressando NLRC4 mutante incapaz de ser fosforilado neste resíduo, não respondem a infecção, inibindo assim a ativação do inflamassoma, produção de IL-1β e morte celular. Neste mesmo trabalho, foi identificado que a isoforma δ da proteína quiniase C (PKCδ) fosforila NLRC4 e é responsável por sua ativação[71]. Entretanto, outro trabalho demonstrou que a PKCδ é dispensável para a ativação de caspase-1 e secreção de IL-1β induzida pela infecção tanto por *Shigella* como por *Salmonella*[72].Recentemente, também foi descrita uma outra quinase, a Kinase-2 contendo repetições ricas em leucina (LRRK2 do inglês Leucine Rich Repeat-containing Kinase-2), que se associa ao NLRC4 e medeia a fosforilação da S533[73]. Embora questões chave sobre a identidade das quinases responsáveis pela fosforilação do NLRC4, e se elas desempenhem um papel predominante ou redundante permaneçam em aberto, os dados funcionais sugerem que este é provavelmente um componente crítico no mecanismo regulador responsável por garantir que o NLRC4 seja ativado adequadamente em resposta a infecção.

A identificação de novos genes envolvidos em vias de sinalização em resposta a diversos estímulos ainda é desafiadora em eucariotos, entretanto a metodologia de *genome-wide screening* utilizando a ferramenta de Crispr-cas9, e descrita há poucos anos atrás, vem causando uma revolução na edição de genomas e avaliação de genes envolvidos em diversos fenótipos. Utilizando esta técnica, o grupo de Monack identificou novas proteínas envolvidas na morte celular dependente de Caspase-11, por exemplo[74]. Interessantemente, dentre os alvos encontrados no screening por NLRC4-BirA, estão incluídas algumas proteinas, como Rho GDP- dissociation inhibitor 1, Ubiquitin thioesterase OTUB1, RAS-related C3 botulinum substrate 3, Gelsolin, Serine/threonine-protein kinase PAK 2, que podem estar envolvidas na ativação de NLRC4.

Em experimentos realizados por nosso grupo, utilizamos a técnica de BioID (*Proximity-Dependent Biotin Identification*) para identificar possíveis alvos envolvidos na via de NLRC4. O método de BioID permite a identificação de interações entre proteínas, possibilitando uma maior compreensão de 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 biotinilar proteínas em sua vizinhança, atuando como uma estratégia eficiente de marcação de possíveis interactores. Posteriormente, as proteínas biotiniladas podem ser precipitadas utilizando *beads* contendo estreptavidina e identificadas por espectrometria de massa[75].

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. Entre os alvos identificados, encontramos uma serina treonina quinase conhecida como Pak2, que demonstrou ter um papel no controle da infecção por *L. pneumophila*, assim como na via de NLRP3, Aim2 e do inflamassoma não canônico. A caracterização de novos genes facilita por exemplo a descoberta e desenvolvimento de novas drogas que possam ser utilizadas para inibição dessa via, e possivelmente no tratamento de doenças autoinflamatórias e neurodegeneratívas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral.

Identificar novas proteínas envolvidas na ativação do inflamassoma de NLRC4.

2.2 Objetivos específicos.

1. Utilizar a técnica de CRISPR-cas9 em macrófagos primários para obtenção de células nocautes para genes que codificam proteínas identificadas em ensaio de BioID.

2. Avaliar o papel dos genes alvos na ativação do inflamassoma de NLRC4.

3. Avaliar o papel dos genes alvos na ativação de outros inflamassomas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Camundongos utilizados neste estudo foram cruzados e mantidos nos biotérios da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP e sua manipulação seguiu as diretrizes de utilização de animais em pesquisa aprovadas pela CETEA (Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, número de protocolo (218/2014), que segue as normas recomendadas pelo CONCEA (Conselho Nacional de Controle em Experimentação Animal). Camundongos foram eutanasiados por asfixia por CO_2 seguido por deslocamento cervical. Foram utilizadas as seguintes linhagens: C57BL/6 (Jax 000664), C57BL/6 Cas9 (Jax024858), *Casp1/11*$^{-/-}$ (LI et al., 1995).

3.2 Diferenciação de macrófagos a partir de células de medula óssea

Macrófagos diferenciados de células precursoras da medula óssea (BMDMs) foram utilizados como modelo para experimentos in vitro. As células precursoras de macrófagos foram obtidas da medula óssea de fêmures e tíbias de camundongos C57BL/6 e cultivadas em meio R20/30, composto por meio RPMI (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Massachussetts, EUA) suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB, Gibco), 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, e 30% de meio condicionado de células L929 (LCCM)[76]. Resumidamente, Camundongos foram anestesiados, eutanasiados e seus fêmures e tíbias extraídos e dissecados. Em seguida, em ambiente estéril, foram seccionados e lavados com o auxílio de uma seringa contendo meio RPMI 1640 incompleto e uma agulha de 26G de diâmetro. A suspensão celular obtida foi centrifugada (400 x g, 10 minutos, 4ºC), ressuspendida em meio R20/30, e distribuída em placas de cultura em volume de 10 mL por placa utilizada (um fêmur = 4 placas). Um total de 10 mL de meio R20/30 foi adicionado após quatro dias de cultura. No sétimo dia os macrófagos foram utilizados para experimentação.

3.3 Clonagem

O gene *Pak2* foi amplificado por PCR usando o primer *Pak2* forward 5'-AACGTACGATGTCAAGCTCTTCCTGG-'3; e primer *Pak2* reverse 5'-

ATGAATTCTTAGCGGTTACTCTTCATT-‘3; e cDNA total de BMDM foi usado como molde.

3.4 Cultura de células, transfecção e inibidores

Linhagem de células de rim humano HEK293T foi cultivada em meio RPMI-1640 suplementado com 10% (v / v) de soro fetal bovino, 100U/ml de penicilina e 100µg/ml de estreptomicina. As células HEK293T foram transfectadas com plasmídeos usando FuGENE (PEI, Life Technologies) de acordo com as instruções do fabricante. Para a inibição de PAK, os BMDMs foram plaqueados e as células foram pré-tratadas por 1 hora com 500 nM FRAX597 (MCE).

3.5 Geração de BMDMs nocaute por CRISPR-cas9

Um RNA guia de fita dupla (gRNA) direcionado a *Pak2* foi projetado usando o servidor web (http://crispr.mit.edu), e pares de oligonucleotídeos para cada gRNA foram sintetizados: sgRNAFPak2; 5’- CACCGAGAACTATTGTGAGCATAGG-‘3, sgRNARPak2; 3’- AAACCCTATGCTCACAATAGTTCTC-‘5. O plasmídeo LentiGuide-puro (Addgene # 52963) foi digerido com BsmBI (NEB, EUA) e hibridizado com o gRNA. O plasmídeo gRNA LentiGuide-puro foi expandido em células competentes de *Escherichia coli* DH5a e a construção de plasmídeos bem-sucedida foi confirmada por PCR. Para a produção dos lentivírus, células HEK293 foram transfectadas com construções de gRNA LentiGuide-puro e plasmídeos de empacotamento psPAX2 (Addgene # 12260) e pMD2.G (Addgene #12259). Sessenta horas após a transfecção, o sobrenadante contendo lentivírus de células HEK293 foi usado para transduzir BMDMs. Para a geração de BMDM deficiente em Pak2, tíbias e fêmures foram removidos de camundongos transgênicos Cas9 e a medula óssea foi lavada. As células foram plaqueadas em meio contendo 30% (v/v) de meio condicionado de fibroblastos de camundongo L929 e 20% de FBS. No terceiro dia de diferenciação, o sobrenadante contendo lentivírus nas células HEK293 foi adicionado à cultura, e após quarenta e oito horas Puromicina (5 µg/ml) foi adicionado à cultura de BMDMs para seleção das células que receberam o vetor contendo os gRNAs. No oitavo dia de diferenciação, as células foram utilizadas no experimento.

3.6 Cultura e preparação de bactérias

Foram utilizadas cepas de *Legionella pneumophila* WT JR32 e mutante isogênico para *flaA*[55]. Para o ensaio de replicação in vitro, cepas de *L. pneumophila* expressando de forma estável o *operon Photorhabdus luminescens* luxCDABE[77]. As bactérias foram cultivadas em Agar Carvão-Extrato de Levedura (CYE), suplementado com 0,4 g/L de L-cisteína e 0,135 g/L de Fe (NO3) 3 a 35°C por 4 dias a partir de estoques congelados. Para o experimento, uma única colônia foi semeada em placas frescas e deixada crescer por 48 horas. Para infecções in vitro, as bactérias cultivadas em placas sólidas foram ressuspendidas em água destilada autoclavada e diluídas em RPMI como indicado.

3.7 Ativação de inflamassoma e infecções

BMDMs 1 x 106 células/mL foram primadas por 3 horas com LPS-B5 ultrapuro (100 ng/ml) de *Escherichia coli* sorotipo 055: B5 seguido por estimulação com os diferentes ativadores de inflamassoma Nigericina (10 µM) ou Poly (dA: dT) (3 µM) por 1 hora. Para a ativação do NLRC4 e inflamassomas não canônicos, os macrófagos foram infectados com *L. pneumophila* por 90 min, e com *L. pneumophila* mutante para *flaA* em MOI 10 por 3 horas, respectivamente. A produção de citocinas foi avaliada 16 horas após a infecção.

3.8 Ensaio de formação de poros

A formação de poros nos macrófagos nos BMDMs foi baseada na incorporação de iodeto de propídeo (PI). O PI é um corante capaz de entrar apenas em células com a membrana danificada, atuando como um indicador de morte celular. Para isso, 1 x 10^5 células/poço foram plaqueadas em placas de 96 poços. Antes da infecção o meio de cultura foi substituído por RPMI sem vermelho de fenol contendo 15 mM de HEPES, 0.038 g/mL de $NaHCO_3$, suplementado com 2% de SBF, 2 mM de L-Glutamina e posteriormente adicionado 6 uL de PI e anticorpo anti-*L. pneumophila*. Os macrófagos foram infectados com MOI 10, e a placa centrifugada a 300 X g por 5 minutos a temperatura ambiente. Os macrófagos infectados foram mantidos a 37ºC, e a morte celular acompanhada em tempo real pela incorporação de PI pelas células mortas. O PI foi excitado a 538 nm e a emissão medida a 617 nm no leitor SpectraMax (Molecular

Devices, California EUA). A formação total de poros foi determinada pela lise das células com adição de 34 μL/poço de Triton X-100 a 9%.

3.9 Ensaio de replicação bacteriana em macrófagos

Para determinação de UFC (unidades formadoras de colônias), $2x10^5$ BMDMs foram plaqueadas em placas de 24 poços. A cultura de BMDMs foi infectada in vitro com *L. pneumophila* WT em uma multiplicidade de infecção (MOI) 0,015. Após a adesão das células, a cultura foi infectada, seguida de centrifugação a 300 x g por 5 minutos a temperatura ambiente. Após 4 e 96 horas, o sobrenadante de cada poço foi coletado e 1 mL/poço de água estéril foi adicionado, e o lisado celular combinado ao sobrenadante do respectivo poço. As combinações de lisado mais sobrenadante de cada poço foram diluídas em água estéril, sendo posteriormente plaqueadas em meio CYE e incubadas por 4 dias a 35ºC para contagem das colônias. Experimentos para medir a replicação bacteriana usando ensaios de replicação baseados em luminescência foram feitos conforme descrito por Coers[78]. Basicamente, $1x10^5$ BMDMs foram plaqueados em placas brancas de 96 poços e incubados durante a noite. As células serão infectadas com *L. pneumophila* expressando o cassete para luciferase e luciferina na MOI 0,015. Após 4, 24, 48, 72 e 96 horas a replicação bacteriana foi avaliada pela emissão de luminescência a 470 nm medida em um leitor de placas Spectra-L (Molecular Devices, Califórnia, EUA).

3.10 Ensaios de replicação in vivo

Camundongos fêmeas de oito a dez semanas de idade foram usados para os experimentos *in vivo*. Os animais foram tratados por injeção intraperitoneal ou via oral com veículo ou 90 mg/kg do inibidor de PAK FRAX597 dois dia antes da infecção e nos dois dias seguintes. Para a infecção, os animais foram anestesiados com cetamina (50mg/kg) e xilazina (10mg/kg) por via intraperitoneal e infectados com *L. pneumophila* WT ou *L. pneumophila FlaA* por via intranasal com 10^5 bactéria em 40µL de PBS. Quarenta e oito horas após a infecção, os pulmões foram coletados e macerados por 30 segundos em 5 mL de água destilada usando um homogeneizador de tecidos (Power Gen 125; Thermo Scientific). As diluições foram plaqueadas em CYE contendo estreptomicina (10 µg/mL) e as placas foram incubadas por 4 dias a 37°C para contagem de UFC.

3.11 Ensaio para avaliar a atividade da caspase-1

BMDMs foram semeados em placas de 24 poços (Becton Dickinson Labware, N.J, USA). No dia seguinte, as células foram ativadas com LPS ultrapuro (100 ηg/ml InvivoGen), tratadas com o inibidor de PAK- FRAX597, e estimuladas com os diferentes estímulos em meio RPMI sem vermelho de fenol pelos tempos indicados, e então os sobrenadantes foram coletados e a ativação da caspase-1 foi avaliada através da incubação com substrato WEHD de Luciferina fornecido pelo Ensaio Caspase-Glo 1 (Promega) e a luminescência foi medida usando o sistema SpectraMax i3 (Dispositivos Moleculares).

3.12 Quantificação de lactato desidrogenase (LDH).

BMDMs foram semeados em placas de 24 poços (Becton Dickinson Labware, N.J, USA). No dia seguinte, as células foram ativadas com LPS ultrapuro (100 ηg/mL, InvivoGen), tratadas ou não com o inibidor Pak FRAX597 dependendo do experimento, e estimuladas com os diferentes estímulos em meio RPMI sem vermelho de fenol pelos tempos indicados, e então os sobrenadantes foram coletados e a morte celular medida pelo LDH ensaio de liberação usando o kit CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega) seguindo as instruções do fabricante. Os valores obtidos foram representados em porcentagem (%) em relação a morte celular induzida pela lise do detergente (3% Triton X-100).

3.13 Dosagem de IL-1β por ELISA.

A dosagem da citocina IL-1β na cultura de BMDM estimuladas com nigericina, poly (dA:Dt) ou infectados com *L. pneumophila*, foram avaliadas por ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) conforme instruções do fabricante (R&D). Resumidamente, placas de 96 poços foram sensibilizadas com anticorpos de captura (50ul/poço) por 18 horas e bloqueados por 2 horas a temperatura ambiente, com 200 µL/poço de tampão de bloqueio específico. Em seguida, diluições do padrão (curva padrão) e as amostras foram adicionadas à placa (50 µL/poço) por 2 horas. Após as lavagens, anticorpos de detecção biotinilados foram adicionados aos poços (50µL/poço). Uma solução contendo substrato cromógeno da peroxidase (treta-methyl-benzidine) foi adicionada em cada poço para

revelar o ensaio, e a reação será finalizada com a adição de H_2SO_4 2N. A densidade óptica de cada amostra foi mensurada por meio do leitor de ELISA em filtro com comprimento de onda de 450nm e a quantificação foi realizada conforme curva padrão obtida.

3.14 Imunofluorescência para avaliar a formação de punctas de ASC.

Para experimentos de formação de punctas, BMDMs nocaute para Pak2 (4 x10^5) foram gerados por CRISPR-cas9 e semeados em placas de 24 poços contendo lamínulas. As células foram primadas com LPS ultrapuro (100 ŋg/ml) por 3 horas e, em seguida, estimulados como descrito anteriormente (ou seja, Nigericina, Poly (dA: dT), *L. pneumophila WT* e *L. pneumophila flaA* mutante). As células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 15 min a temperatura ambiente, lavadas duas vezes com PBS e, em seguida, coradas conforme descrito. As células foram bloqueadas e permeabilizadas usando PBS contendo 5% de soro de cabra e 0,05% de saponina durante 1 hora à temperatura ambiente. O anticorpo primário usados foi anti-ASC de camundongo (Abcam) (1: 500). O anticorpo foi diluído em solução de bloqueio e adicionados a cada lamela. Após 1h de incubação, as amostras foram lavadas três vezes com PBS e incubadas com anticorpo secundário cabra anti-rato 488 (Invitrogen) (1:3000). As lâminas foram lavadas e montadas usando Prolong com DAPI (1 mM) (Invitrogen). O número de punctas foi quantificado em microscópio invertido LEICA DMI 4000B com objetiva de 100X (Leica Microsystems).

3.15 Imunofluorescência para avaliar a colocalização de ASC com PAK2.

Para os experimentos de colocalização, ASC-GFP clonados em vetores pMSCV2.2 (Clontech) foram transfectados em células HEK-293 utilizado o sistema de vetor pCL para o empacotamento do retrovírus. O sobrenadante das células HEK contendo o retrovírus foi coletado e utilizado para a transdução dos BMDMs de animais nocaute de Caspase1/11 (4 x10^5). Após a diferenciação, 4x10^5 foram semeados em placas de 24 poços contendo lamínulas. BMDMs foram primados com LPS ultrapuro (100 ŋg/ml) por 3 horas e, em seguida, estimulados como descrito anteriormente (ou seja, Nigericina, Poly (dA: dT), *L. pneumophila WT* e *L. pneumophila flaA* mutante). As células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 15 min a 4ºC, lavadas duas vezes com PBS

e, em seguida, coradas conforme descrito. As células foram bloqueadas e permeabilizadas usando PBS contendo 5% de soro de cabra e 0,05% de saponina durante 1 hora à temperatura ambiente. O anticorpo primário usado foi anti-Pak2 de coelho (Sigma) (1:500). O anticorpo foi diluído em solução de bloqueio e adicionados a cada lamela. Após 1 h de incubação, as amostras foram lavadas três vezes com PBS e incubadas com anticorpo secundário cabra anti-rato 488 (Invitrogen) (1:3000). As lâminas foram lavadas e montadas usando Prolong com DAPI (1 mM) (Invitrogen). As imagens de microscopia multifóton foram adquiridas utilizando o sistema LSM 780 Zeiss AxioObserver (Zeiss) com lente de oléo de imersão de aumento de 63X e analisadas utilizando o software ImageJ.

3.16 Análise de Western blot

BMDMs foram semeados em uma placa de 48 poços (1 x 10^6), preparados com LPS ultrapuro (100 ηg/ml) por 3 horas e, em seguida, estimulados com os diferentes ativadores de inflamassoma conforme descrito anteriormente (ou seja, Nigericina, Poly (dA: dT), *L. pneumophila WT* e *L. pneumophila flaA* mutante). Os sobrenadantes foram coletados e as células remanescente nos poços foram lisadas com tampão RIPA (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 1% deoxycholate, e 0.1% SDS) contendo um coquetel de inibidores de protease e fosfatase (Roche). Os lisados e sobrenadantes foram ressuspendidos em tampão de amostra contendo SDS (50 mM Tris; pH 6,8), 2% SDS (USB Corporation, USA), 0,1% azul de bromofenol (Synth, USA), 10% glicerol (USB Corporation, USA), 2,5% β-mercaptoetanol). As proteínas foram, então, transferidas para uma membrana de nitrocelulose (GE Healthcare, USA) utilizando o sistema de transferência Semidry Transfer Cell (Bio-Rad Laboratories, USA) a 15 volts por 40 minutos. Neste sistema foram utilizados tampão de transferência (50 mM Tris, 40 mM glicina e 10% metanol). As membranas foram bloqueadas por 12 horas a 4 oC em tampão Tris (TBS – Tris buffered saline) (25 mM Tris - Hexis Científica, BR, pH 7.4, 0,3 mM KCl - J.T. Backer e 140 mM NaCl – J.T. Bacher) contendo 0,1% Tween-20 (TBS-T) e 5% de leite em pó desnatado. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas com os anticorpos anti-caspase-1 p20 de rato (Genentech) (1:1000), anti-IL-1β de cabra (Santa Cruz) (1:1000), anti-GSDMD de coelho (Abcam) (1:1000), anti-Pak2 (sigma)

(1:1000) por 24h, 4º. As membranas foram lavadas em TBS-T e incubadas por 1 hora a 25ºC com anticorpo secundário apropriado conjugado com peroxidase (diluição 1:3000; KPL, USA). Para a detecção das proteínas ligadas aos anticorpos específicos foi utilizado o reagente ECL luminol (GE Healthcare) e filme Hyperfilm (GE Healthcare).

3.17 Crosslinking ASC em macrófagos.

Após estimulação com os diferentes ativadores de inflamassoma na presença ou não do inibidor PAK FRAX597 (500 ηM), os BMDMs foram lisados com solução hipotônica (Hepes 10 mM - pH 7,9, MgCl2 1,5 mM, KCl 10 mM, PMSF 0,2 mM, 0,5 mM DTT, coquetel de inibidor de protease Roche), incubado em gelo por 15 minutos, homogeneizado e centrifugado por 15 minutos a 8.000 x g. Os precipitados foram ressuspendidos em 500 µl de tampão CHAPs (HEPES-KOH 20 mM - pH 7,5, MgCl2 5 mM, EGTA 0,5 mM, CHAPs 0,1%, PMSF 0,1 mM e coquetel de inibidor de protease), centrifugados por 15 minutos a 8.000 x g e ressuspendidos em 200 µl de tampão CHAPs e 8 µl de uma solução estoque 100 mM DSS para uma concentração final de 4 mM e incubados por 30 min no escuro a 37ºC sob rotação. Os oligômeros foram separados em gel SDS-PAGE a 12% e visualizados por imunotransferência com um anticorpo anti-ASC.

3.18 Análise estatística.

Os dados foram analisados usando o software GraphPadPrism 8.0 e expressos como a média ± erro padrão (SEM). Os dados foram analisados usando o software GraphPadPrism 8.0 e expressos como a média ± erro padrão (SEM). As diferenças nos valores obtidos para dois grupos diferentes foram determinadas usando o teste t de Student. Uma diferença foi considerada estatisticamente significativa quando $P \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Identificação de possíveis proteínas envolvidas na via de sinalização do inflamassoma de NLRC4*.*

A técnica de BioID foi utilizada em experimentos realizados previamente por nosso grupo para identificar possíveis alvos envolvidos na via de NLRC4. Nesta técnica, a proteína alvo, NLRC4, foi fusionada a um mutante da enzima biotina ligase (BirA) de *Escherichia coli* (BirA-NLRC4) para a realização dos experimentos. Brevemente, BMDMs diferenciadas de camundongos NLRC4 nocautes foram transduzidas com vetor retroviral carreando BirA-NLRC4, e posteriormente infectadas com *L. pneumophila* para induzir ativação de NLRC4. As células foram lisadas e os alvos biotinilados foram precipitados com *beads* de estreptavidina e identificados por espectrometria de massas. Dentre os diversos alvos encontrados, alguns genes foram selecionados para avaliarmos a fundo um possível papel na via de NLRC4. Na Tabela 1, descrevemos algumas das proteínas identificadas, suas respectivas funções de acordo com a plataforma UniProt (uniprot.org) e a sequência dos sgRNAs que foram utilizadas para geração das BMDMs nocautes pela técnica de CRISPR-cas9.

Tabela 1. Lista de genes que potencialmente interagem com o inflamassoma de NLRC4.

Gene	Proteína	Função	Sequências de RNAs guia
Rho GDI-1	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	Envolvido na homeostase, estatabilidade, reciclagem e distribuição de Rho GTPases ativadas na célula. Pode exercer papel na motilidade celular também.	5´-CACCGCATTGTGACTCGACTGACCT- ´3 3´-AAACAGGTCAGTCGAGTCACAATGC-´5
Otub1	Ubiquitin thioesterase OTUB1	Atua na renovação de proteínas, evitando a degradação. Regula a ubiquitinação mediada por RNF128. Possui papel na regulação do reparo do DNA.	5´-CACCGCTACCAACAGAAGATCAAGG- ´3 3´-AAACCCTTGATCTTCTGTTGGTAGC - ´5
Rac3	RAS-related C3 botulinum substrate 3	Membro da família Rho-GTPase. Atua na organização do citoesqueleto de actina. Regula positivamente a adesão mediada por integrina. Exerce pequena participação na transdução de sinal mediada por GTPase.	5´-CACCGAGTGCGTGGTGGTTGGCGAT-´3 3´-AAACATCGCCAACCACCACGCACTC -´5
Gsn	Gelsolin	Proteína moduladora de actina regulada por cálcio. Participa de processos apoptóticos e de fagocitose. Atua na regulação da adesão celular e no transporte mediado por vesículas.	5´CACCGGGCATCTGGATTCAAACACG-´3 3´-AAACCGTGTTTGAATCCAGATGCCC-´5
Pak-2	Serine/threonine -protein kinase PAK 2	Atua na regulação do citoesqueleto, motilidade celular, progressão do ciclo celular, apoptose ou proliferação. Participa de processos de fosforilação de proteínas. Está envolvido com a transdução de sinal intracelular e regulação da cascata MAPK.	5’CACCGAGAACTATTGTGAGCATAG- ‘3 3’-AAACCCTATGCTCACAATAGTTCTC- ‘5

4.2 *Gsn* e *Pak2* estão envolvidos na formação de poro desencadeado por flagelina.

Para avaliar o papel dos alvos identificados na via de NLRC4, utilizamos a flagelina de *L. pneumophila* fusionada ao fator letal de *Bacillus anthracis* (*FlaTox*), para avaliar o papel dos genes (**Tabela 1**) na morte celular induzida por esta via. Uma vez que a piroptose é caracterizada pela rápida formação de poros na membrana da célula a partir da ativação de NLRC4[79,80], utilizamos um ensaio de formação de poro em tempo real para avaliação da ativação da via. Para isso, primeiramente geramos macrófagos mutantes para cada gene (*Gdi-1, Otub1, Rac3, Gsn, Pak2*) por meio da técnica de CRISPR-cas9, utilizando sequencias de RNA guia (sgRNA) especificas para cada um dos genes. Em seguida, as células foram estimuladas com *FlaTox* e avaliamos a morte celular através do ensaio de formação de poros. Esse ensaio consiste na análise da emissão de fluorescência baseada na incorporação de iodeto de propídeo pela célula (PI). O PI é um corante capaz de entrar apenas em células com a membrana danificada, atuando como um indicador de morte celular[81,82].

Nós observamos que entre os cinco genes avaliados, os macrófagos nocautes para o gene *Gsn* (**Fig. 4A**) e para *Pak2* (**Fig. 4B**) apresentaram uma redução na incorporação de iodeto de propídio quando comparado ao controle, indicando que esses genes tem um papel na formação de poro induzida por flagelina. Como controle, foram utilizadas células transduzidas com o vírus carreando vetor vazio com e sem estímulo com *FlaTox*, assim como células transduzidas apenas com o sgRNA específico para o gene, sem estímulo.

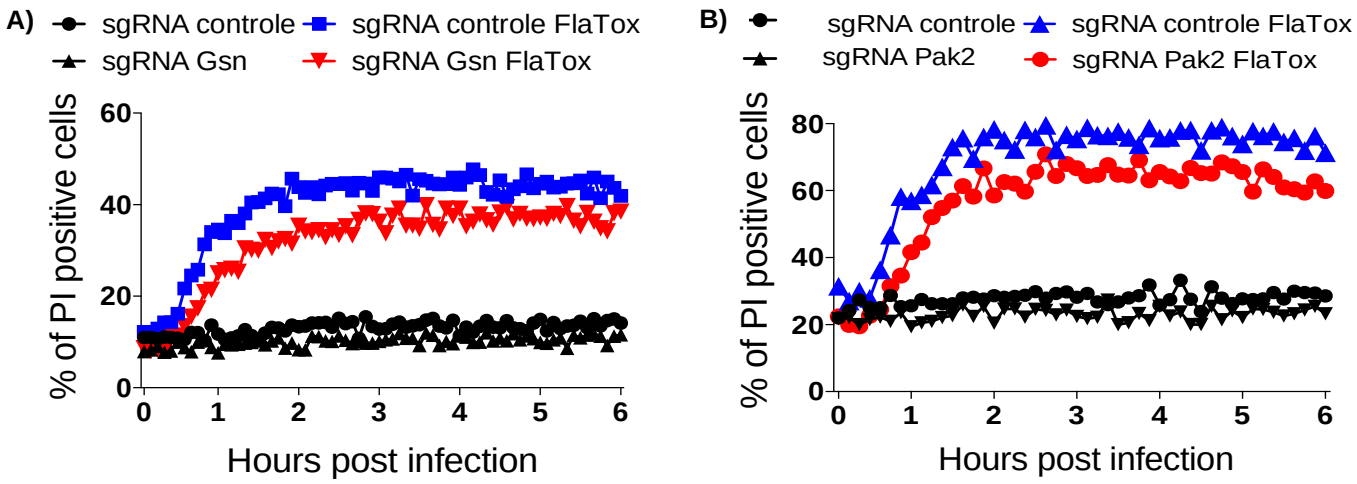


Figura 4 : Genes envolvidos na formação de poro via NLRC4. Macrófagos nocaute de cada gene foram estimulados com a flagelina de *L. pneumophila* com um fator letal de *Bacillus anthracis* (*Flatox)*. A formação de poro foi avaliada através da incorporação de iodeto em tempo real, com auxílio do leitor SpectraMax. As porcentagens foram estimadas em relação às células lisadas com Triton X-100. Os resultados apresentados são representativos de dados de pelo menos três experimentos. * p ≤0,05 indica diferença significativa em comparação entre os grupos.

4.3 PAK2 está envolvido no controle da *Legionella pneumophila* in vitro.

Já foi demonstrado em trabalhos anteriores que o NLRC4 é o inflamassoma mais importante no controle de infecções por *L. pneumophila* em macrófagos murinos[83,84]. Com base nisso, fomos avaliar se nossos alvos selecionados teriam papel no controle da replicação dessa bactéria em macrófagos, indicando, dessa forma, um papel dos genes alvo na ativação do inflamassoma de NLRC4. Para isto, geramos macrófagos nocautes para cada gene através do sistema CRISPR-cas9 e infectamos as células com *L. pneumophila* WT e com *L. pneumophila* mutante para flagelina (MOI 0,015), ambas expressando o operon de *P. luminescens* que codifica luciferase e luciferina. A infecção com *L. pneumophila flaA* serve como um importante controle, visto que na ausência de flagelina, o inflamassoma de NLRC4 não é ativado e a bactéria se replica livremente[55]. Dessa forma, esse controle demonstra que as células transduzidas estão viáveis e capazes de suportar a replicação de *L. pneumophila* apesar do processo de transdução. A replicação bacteriana foi avaliada pela quantificação da luminescência (RLU) emitida por bactérias que expressam luciferase após 24, 48, 72 e 96 horas. Após 4 hrs de infecção foi realizada uma primeira leitura, como tempo inicial (T_0).

Como podemos observar, apenas os macrófagos nocautes para Pak2 apresentaram um aumento na replicação (**Fig. 5A**). Além dos cinco genes alvos, geramos macrófagos nocautes para o inflamassoma de NLRC4, os quais são sabidamente permissivos à replicação[84], e por isso podem ser usados como um controle positivo (**Fig. 5A**). Nossos dados demonstram que macrófagos nocaute para *Pak2* foram mais susceptíveis a replicação bacteriana, e de maneira semelhante aos macrófagos nocautes para NLRC4, indicando um possível de PAK2 envolvimento na restrição da infecção mediada por NLRC4. Por outro lado, todos os outros quatro genes (*Gdi-1, Otub1, Rac3, Gsn*) apresentaram um fenótipo semelhante ao controle negativo, composto por macrófagos carreando o vetor vazio (sgRNAø), sugerindo que estes genes (Gdi-1, Otub1, Rac3 e Gsn) não possuem papel no controle da replicação de *L. pneumophila* WT (**Fig. 5A**). Na infecção pela *L. pneumophila* mutante para *flaA*, todos os genes alvos apresentaram um perfil de replicação semelhante, devido a capacidade dessa bactéria

de evadir do reconhecimento por NAIP5/NLRC4, e replicar-se de forma eficaz dentro do macrófago, independentemente do genótipo (**Fig. 5B**)[55].

Como o objetivo de nosso trabalho é a identificação de novos genes envolvidos na ativação de NLRC4, prosseguimos com a caracterização do papel do gene Pak2 na via, uma vez que nenhum fenótipo foi observado com os outros alvos. Dessa forma, para confirmar nossos dados, repetimos o ensaio de replicação de *L. pneumophila* WT e *L. pneumophila flaA* em macrófagos nocaute de *Pak2*, em comparação com macrófagos nocautes para *Nlrc4* e macrófagos transfectados com vetor vazio (**Fig. 5C**). De fato, os resultados obtidos indicam que PAK2 desempenha um papel protetor na infecção, sugerindo seu envolvimento na resposta desencadeada pelo complexo de NLRC4.

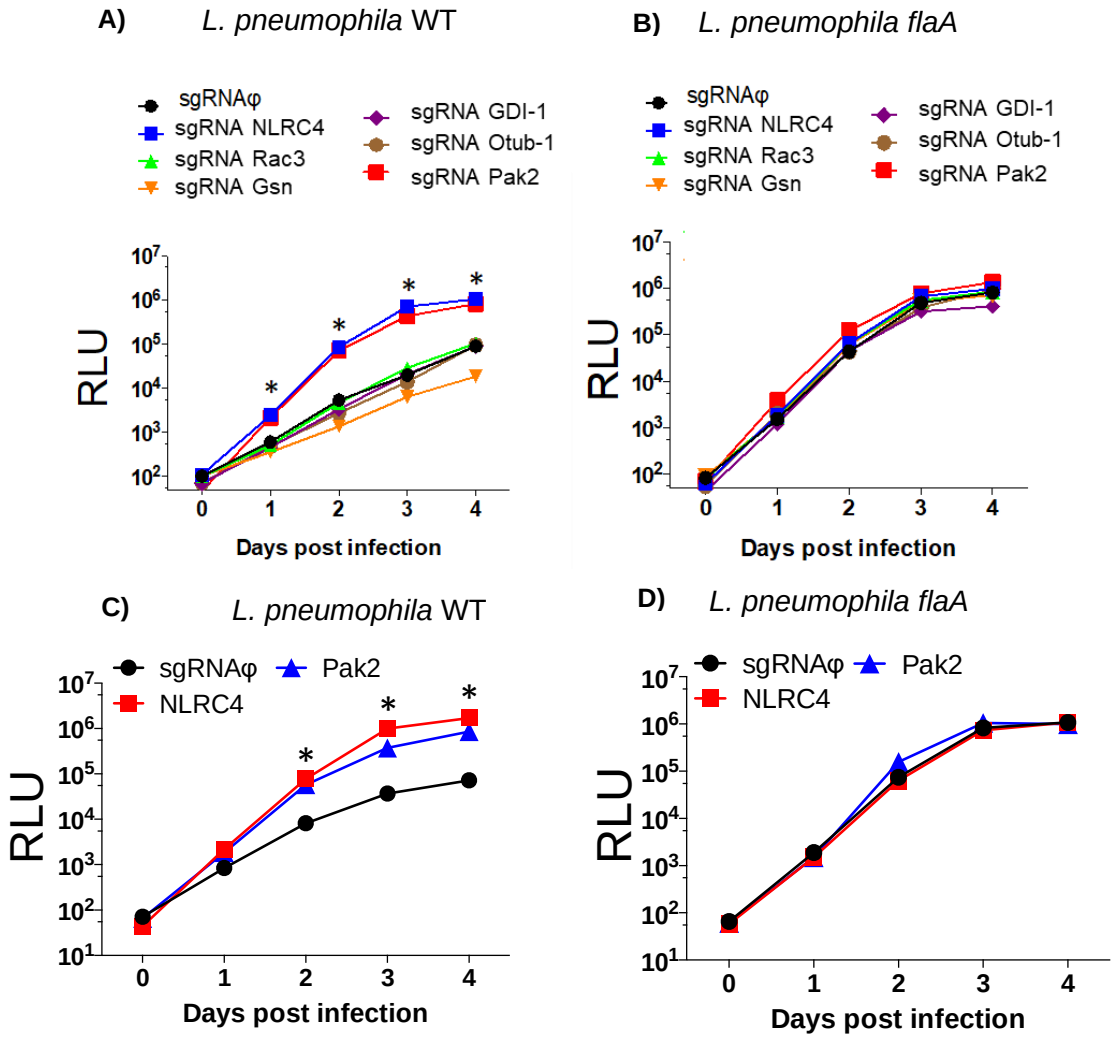


Figura 5: PAK2 apresenta um papel no controle da replicação por *L. pneumophila.*: A-B: Macrófagos nocaute de cada gene foram infectados com *L. pneumophila* WT e *L. pneumoplhila flaA* expressando luciferase em um MOI de 0,015 e a replicação bacteriana foi estimada medindo a luminescência (RLU) de cada poço ao longo de 4 dias de infecção. **C-D**: Macrófagos transfectados com vetor vazio, *Pak2*$^{-/-}$ e *Nlrc4*$^{-/-}$ foram infectados com *L. pneumophila* WT e *L. pneumophila flaA* expressando luciferase em um MOI de 0,015 e a replicação bacteriana foi estimada medindo a luminescência (RLU) de cada poço ao longo de 4 dias de infecção. * p ≤0,05 indica diferença estatística significativa em comparação com grupo controle. Os resultados apresentados são representativos de dados de pelo menos três experimentos.

Para confirmar o fenótipo de replicação, utilizamos outro ensaio de replicação in vitro, onde quantificamos as unidades formadoras de colônia (UFC) de *L. pneumophila* WT em placas CYE após 1, 2 e 3 dias de infecção. Esse ensaio é considerado padrão ouro para avaliar a replicação bacteriana. Como pode ser visto na figura 6, os macrófagos controle (sgRNAø), apresentaram uma UFC menor quando comparado com os outros genótipos, uma vez que os mesmos possuem a via de NLRC4 funcional. Por outro lado, macrófagos nocautes para *Pak2* apresentaram uma replicação intermediária quando comparado ao controle vazio e deficiente em NLRC4, indicando um papel de PAK2 na ativação do inflamassoma de NLRC4. Esses dados corroboram os resultados obtidos anteriormente, e confirmam que PAK2 está envolvido no controle da infecção por *L. pneumophila* (**Fig. 5A, 5C e Fig. 6**).

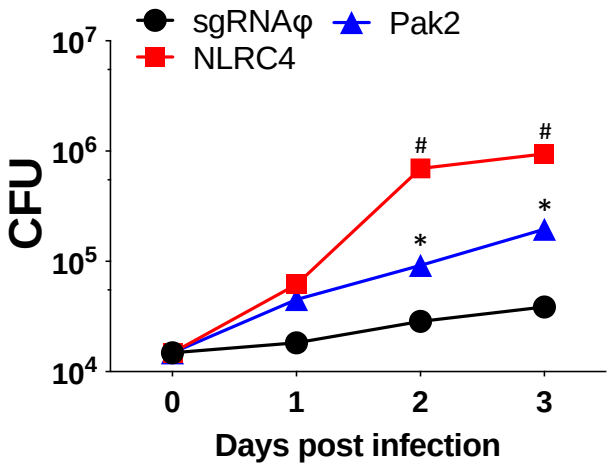


Figura 6: O controle da replicação de *Legionella* é prejudicado em macrófagos nocautes de *Pak2*. Macrófagos *Pak2*$^{-/-}$, *Nlrc4*$^{-/-}$ e transfectados com vetor vazio foram infectados com *L. pneumophila* WT. Após 24h, 48h, 72h, 78h as células foram lisadas, plaqueadas em meio CYE e incubadas por 4 dias a 35ºC para contagem das colônias (UFC). * p ≤0,05 indica diferença estatística significativa em comparação com grupo controle. Os resultados apresentados são representativos de um experimento.

4.4 Macrófagos deficientes em *Pak2*, mas não *Pak1*, são mais susceptíveis a replicação de *Legionella pneumophila* WT em macrófagos.

As proteínas PAKs (quinases ativadas por p21) são membros da família serina treonina quinase e desempenhem papéis críticos na regulação do citoesqueleto de actina, sinalização e sobrevivência celular. Atualmente existem seis PAKs em mamíferos, PAK1 a PAK3 são classificadas no grupo A, já as PAK4 a PAK6 pertencem ao grupo B[85], sendo que as três isoformas do grupo A são as mais estudadas. Além disso, é importante ressaltar que PAK2 possui cerca de 76% de similaridade à PAK1, e são expressas de forma ubíqua[86-88].

Com base nesses dados, decidimos investigar se Pak1 também apresentaria um papel no controle da replicação de *L. pneumophila*, ou se na ausência de uma das proteínas, a outra poderia apresentar um papel compensatório. Para avaliar essa hipótese, geramos macrófagos nocautes de *Pak2*, macrófagos nocautes de *Pak1*, e macrófagos duplo nocaute (*Pak1/Pak2*). Como feito anteriormente, as células foram infectadas com *L. pneumophila* WT e com *L. pneumophila flaA*, e a replicação avaliada por 4 dias.

Como podemos observar, os macrófagos nocautes para *Pak2* e os duplo nocaute *Pak1/2* foram mais susceptíveis à infecção pela *L. pneumophila*, mas não foi observada diferença entre os 2 grupos (**Fig. 7A**). Por outro lado, na ausência de *Pak1*, a replicação se manteve igual ao controle vazio. Esses dados sugerem que PAK2 tem um papel principal no controle da infecção, sendo o responsável pelo fenótipo de replicação observado nas células duplo nocaute. Como controle, os macrófagos também foram infectados com a *L. pneumophila flaA*. Como podemos observar, não houve diferença na replicação da bactéria nos diferentes genótipos (**Fig. 7B**), devido ao não reconhecimento da flagelina pelo NLRC4, como mencionado anteriormente.

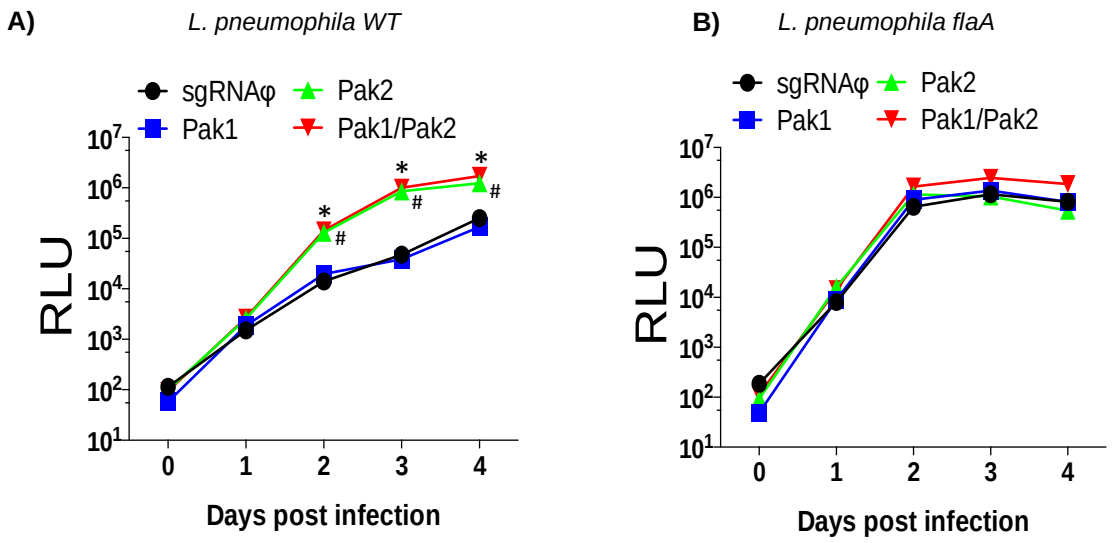


Figura 7: PAK1 não apresenta papel na replicação de *Legionella pneumophila* WT *in vitro*. Macrófagos transfectados com vetor vazio, *Pak1*$^{-/-}$ *Pak2*$^{-/-}$ e *Pak1/2*$^{-/-}$ foram infectados com *L. pneumoplhila* WT e *L. pneumoplhila flaA* expressando luciferase em um MOI de 0,015 e a replicação bacteriana foi estimada medindo a luminescência (RLU) de cada poço ao longo de 4 dias de infecção. * p ≤0,05 indica diferença estatística significativa em comparação com grupo controle. Os resultados apresentados são representativos de dados de pelo menos três experimentos.

4.5 Ausência de PAK2 reduz ativação do inflamassoma desencadeado por *L. pneumophila* em macrófagos.

A produção de IL-1β é um dos indicadores da ativação do inflamassoma, uma vez que a caspase-1 cliva a pro-IL1β culminando na secreção dessa citocina na sua forma ativa[19]. Além disso, a liberação de LDH pela célula sugere a ocorrência de um tipo de morte celular inflamatória chamado piroptose[26-28]. Devido a isso, utilizamos os ensaios de dosagem de IL-β e de liberação de LDH para avaliar a função de PAK2 na regulação da ativação do inflamassoma. Dessa forma, geramos macrófagos nocautes para *Pak2* e *Nlrc4* e infectamos com *L. pneumophila* WT e L. *pneumophila flaA* e avaliamos ambos a produção de IL-1β e de liberação de LDH.

Em comparação com controle vazio, os macrófagos deficientes em *Pak2* apresentaram uma redução na produção de IL-1β em resposta a com *L. pneumophila* WT. Como esperado, observamos uma redução acentuada nas células nocaute de *Nlrc4* frente ao estímulo (**Fig. 8A**). Além disso, avaliamos a via não canônica mediada pela caspase-11 através da infecção pela *L. pneumophila flaA*. Embora essa cepa mutante não expressa flagelina, ela possui LPS em sua superfície, que é reconhecido pela

caspase-11 levando a ativação do inflamassoma. Como podemos observar na figura 8A, houve uma diminuição na dosagem de IL-1β nos macrófagos nocautes de *Pak2* infectados com *L. pneumophila flaA*, quando comparado ao controle vazio, mas não nos nocautes de *Nlrc4*, uma vez que a clivagem e liberação dessa citocina foi proveniente da ativação da via não canônica do inflamassoma de NLRP3 e não via inflamassoma de NLRC4.

Quando avaliamos a liberação de LDH, observamos um fenótipo similar ao da produção de IL-1β. A liberação de LDH pelos macrófagos nocautes de *Pak2* foi reduzida em comparação ao controle, em ambas infecções (**Fig.8B**). Esses dados sugerem que PAK2 também está envolvido na morte celular via NLRC4, assim como na via não canônica dependente de Caspase-11, avaliados pelos modelos de infecção de *L. pneumophila* WT e *L. pneumophila flaA*, respectivamente.

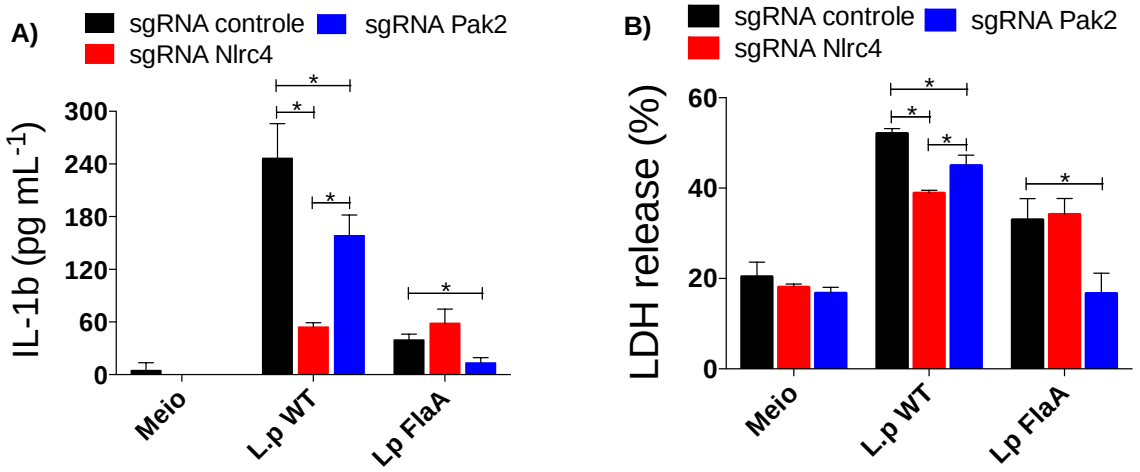


Figura 8: A atividade PAK2 é necessária para à ativação do inflamassoma mediado por NLRC4 e pela via não canônica de NLRP3. Macrófagos *Pak2* $^{-/-}$, *Nlrc4*$^{-/-}$ e transfectados com vetor vazio foram infectados com *L. pneumoplhila* WT e *L. pneumoplhila flaA*. O sobrenadante foi coletado 1h e 3h após à infecção, respectivamente para detecção de citocina como IL-1β e dosagem de LDH. A porcentagem de liberação de LDH foi estimada em relação as células lisadas com 3% Triton-100. Ambos ensaios foi avaliado pela emissão de absorbância medido em um leitor de placas Spectra-L. * p ≤0,05 indica diferença estatística significativa em comparação com grupo controle. Os resultados apresentados são representativos de dados de pelo menos três experimentos.

4.6 PAK2 está envolvido na ativação de vários inflamassomas.

Levando em consideração nosso resultado anterior, o qual sugeri que macrófagos nocaute de *Pak2* apresentam uma redução na ativação da via não canônica do

infamassoma mediado por caspase-11, decidimos investigar se PAK2 também teria um papel na ativação de outros inflamassomas como NLRP3 e AIM2.

A nigericina, uma toxina bacteriana que induz a formação de um poro, leva a ativação de NLRP3 em vem sendo usada intensamente como ativador de NLRP3[89,90]. Para o inflamassoma de AIM2, que é ativado por dupla fita de DNA, utilizamos uma sequência de DNA de fita dupla sintética conhecida como Poly(dA:dT)[91,92]. Para avaliação do papel de Pak2 nestas vias, macrófagos nocaute de *Pak2* e o controle vazio foram gerados e estimulados inicialmente com LPS. Esse estímulo de TLR conhecido como *priming*, é essencial para a expressão dos componentes que serão necessários para montagem do inflamassoma, como a pro-Caspase-1, pro-IL-1 e NLRP3[43]. Após 4 horas, as células foram estimuladas com Nigericina ou Poly dA:dT por 1 hora. Para ativação de NLRC4 e da via não canônica do inflamassoma, utilizamos novamente a infecção por *L. pneumophila* WT e pela *L. pneumophila flaA*, respectivamente. Os sobrenadantes e o lisado das células foram coletados para dosagem de IL-1β, morte celular por liberação de LDH e clivagem de Caspase-1 por Western Blot. Observamos uma diminuição na liberação de IL-1β nas células nocaute de *Pak2* em todos os estímulos, quando comparado aos controles (**Fig. 9A**). Da mesma forma, a liberação de LDH por essas células também foi reduzida (**Fig. 9B**). Além disso, quando examinamos a ativação de Caspase-1 por Western blot, observamos uma redução de sua clivagem em todos estímulos utilizados (**Fig. 9C**). Nossos dados demonstram um papel importante de PAK2 na ativação de todos os inflamassomas avaliados, como podemos observar pela redução nos níveis de IL-1β, LDH e caspase-1 ativa (p20).

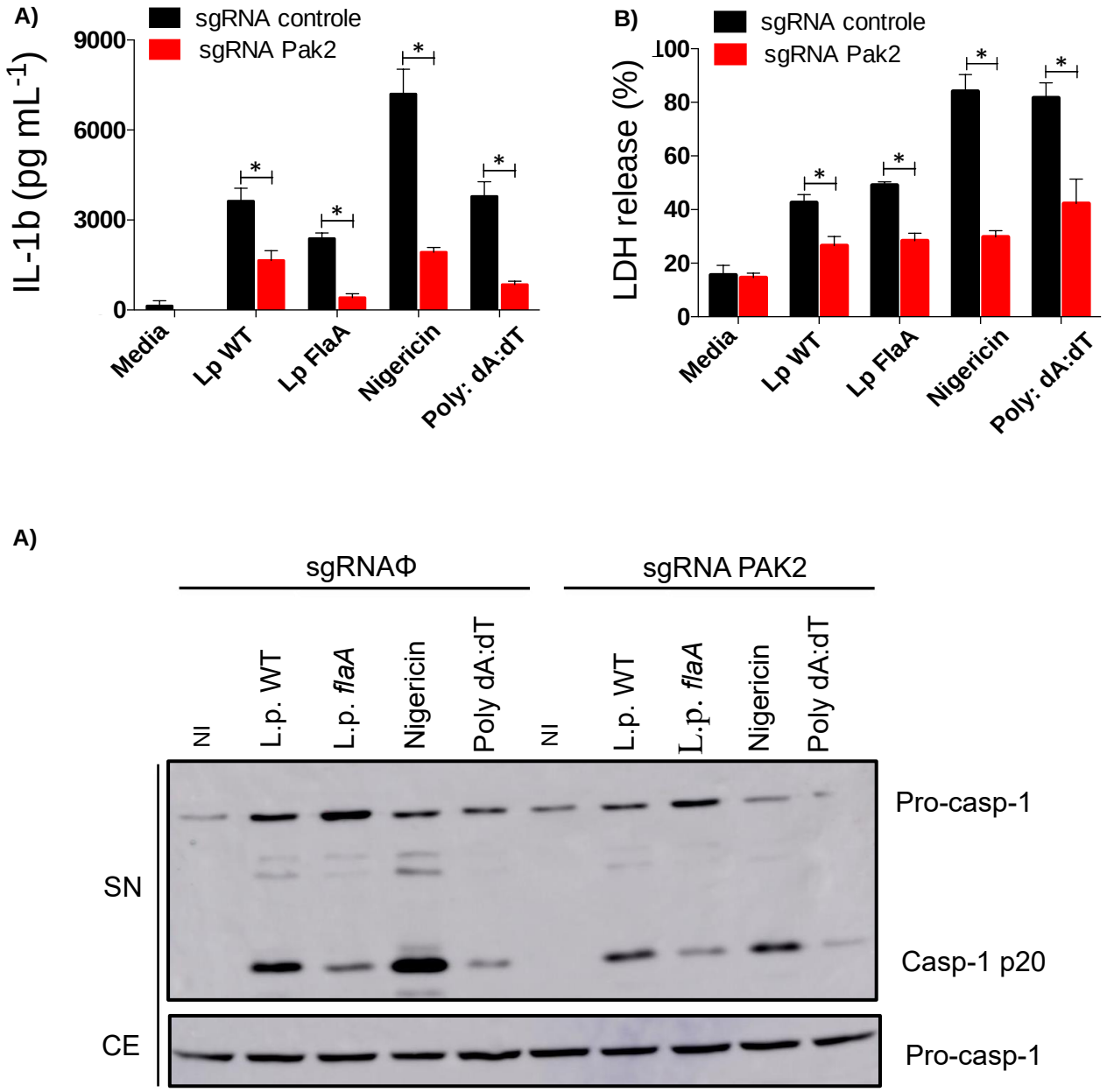


Figura 9: Diminuição de IL-1β, LDH e de caspase-1 clivada em macrófagos nocautes de *Pak2* em todas as vias. A-B Macrófagos nocaute de *Pak2* e o controle vazio usado como controle foram primados com LPS-B5 Ultrapuro (100 µg /ml) e estimulados com Nigericina (10 µM) ou Poly dA:dT (3 µM) por 1 hora ou infectados com *L. pneumophila* por 90min, e com *L. pneumophila* mutante para *flaA* em MOI 10 por 3 horas, respectivamente. O sobrenadante para detecção de citocina como IL-1β e dosagem de LDH. A porcentagem de liberação de LDH foi estimada em relação as células lisadas com 3% Triton-100. Ambos ensaios foi avaliado pela emissão de absorbância medido em um leitor de placas Spectra-L. β ns: não significativo. **C** Macrófagos nocaute de *Pak2* e o controla vazio foram tratados conforme descrito anteriormente. O sobrenadante e os lisados celulares foram analisados por immunoblots. Os resultados apresentados são representativos de dados de pelo menos três experimentos

4.7 PAK1 possui um papel secundário na ativação de vários inflamassomas.

Embora PAK1 não tenha apresentado papel no controle bacteriano, o qual é mediado pelo inflamassoma de NLRC4, decidimos investigar se PAK1 teria papel na ativação de outros inflamassomas. Novamente, macrófagos nocautes para *Pak1*, *Pak2*, *Pak1/2* foram gerados por CRISPR-cas9, primados com LPS e tratados com os respectivos agonistas conforme descrito anteriormente. Como podemos observar, a estimulação de macrófagos nocautes de *Pak1* com os diferentes agonistas levou a uma redução discreta na liberação de IL-β em comparação ao controle (**Fig. 10**). Por outro lado, como observado anteriormente, células deficientes para *Pak2* apresentaram grande redução na produção de IL-β com todos estímulos utilizados. Corroborando o papel principal de PAK2 na ativação dos inflamassomas, células duplo nocaute apresentaram um fenótipo semelhante às células nocautes para *Pak2*. Dessa forma, nossos dados indicam que PAK2, mas não PAK1, apresenta um papel essencial na ativação de NLRP3, NLRC4, AIM2 e do inflamassoma não canônico mediado por Caspase-11.

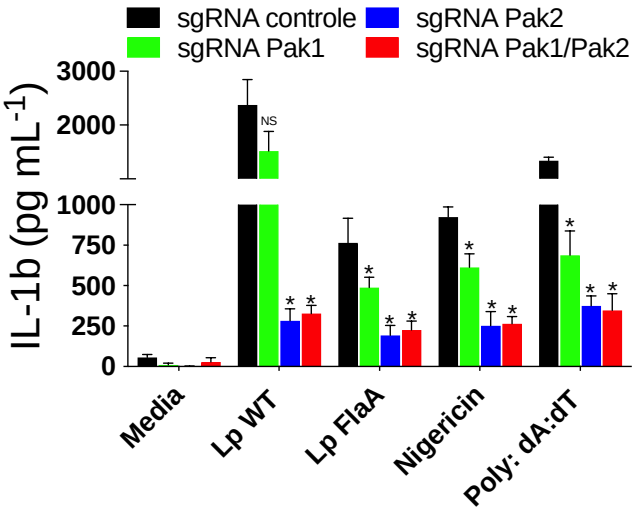


Figura 10*:* PAK2 apresenta papel principal na ativação dos inflamasomas.Macrófagos nocaute de *Pak1, Pak2*, *Pak1/2* e com vetor vazio foram primados com LPS-B5 Ultrapuro (100 η/ml e estimulados com Nigericina (10 μM) ou Poly dA:dT (3 μM) por 1 hora ou infectados com *L. pneumophila* por 90min, e com *L. pneumophila* mutante para *flaA* em MOI 10 por 3 horas, respectivamente. O sobrenadante foi coletado para detecção de citocina como IL-1β O ensaio foi avaliado pela emissão de absorbância medido em um leitor de placas Spectra-L.* p ≤0,05 indica diferença estatística significativa em comparação com grupo controle.

4.8 A inibição de PAK1/2 com FRAX597 diminui a ativação de várias vias de inflamassomas.

Para confirmar o papel de PAK2 na ativação dos diferentes inflamassomas, utilizamos um inibidor competitivo de ATP conhecido como FRAX597[93,94], capaz de inibir as quinases do grupo A (PAK1, 2 e 3). Este composto, mostrou resultados promissores no tratamento do câncer, uma vez que inibe quinases envolvidas no crescimento celular, além de já ser usado para tratamento de distúrbios neurológicos[95-97]. Dessa forma, macrófagos derivados de animais C57BL/6 foram tratados com o inibidor FRAX597 (500 nM), primados com LPS e estimulados com os mesmos agonistas de NLRP3, AIM2, NLRC4 e da via não canônica como descrito anteriormente. Novamente, coletamos o sobrenadante para dosagem de IL-1β, liberação de LDH e ativação de caspase-1 através do ensaio Caspase-Glo 1.

Como visto na figura 11, a inibição de PAK por FRAX597 nos macrófagos, levou a uma diminuição na liberação de IL-1β (**Fig.11A**), na morte celular via liberação de LDH (**Fig.11B**) e na ativação de caspase-1 (**Fig.11C**), quando comparado ao controle sem tratamento. Nossos resultados utilizando o inibidor de PAK, corroboram os dados anteriores, nos quais demonstramos que PAK2 atua como um mediador crítico na ativação dos diferentes inflamassomas.

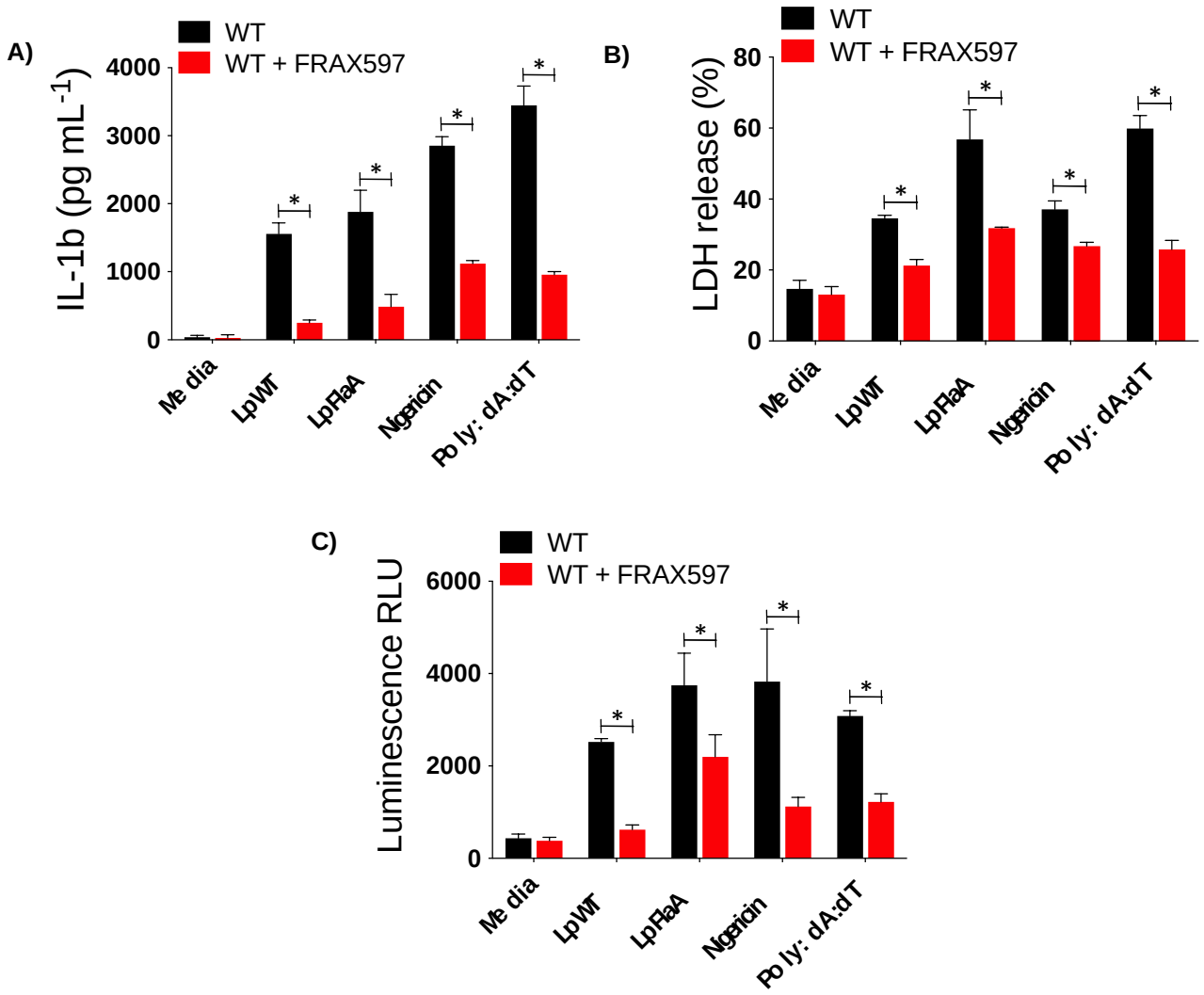


Figura 11: O tratamento com FRAX597 promoveu diminuição na ativação do inflamassoma em macrófagos. Macrófagos WT (derivado de camundongos C57BL/6) foram tratados ou não com FRAX597, primados LPS-B5 Ultrapuro (100 ηg/ml e estimulados com nigericina (10 μM) ou Poly dA:dT (3 μM) por 1 hora, para avaliar ativação de NLRP3 e AIM2, respectivamente, ou infectados *com L. pneumophila* por 90min, e com *L. pneumophila* mutante para *flaA* em MOI 10 por 3 horas, para avaliar a ativação de NLRC4 e inflamassomas não canônicos, respectivamente. O sobrenadante foi coletado para avaliar a dosagem IL-1β por elisa, dosagem de LDH e ativação de caspase-1 pelo ensaio Caspase-Glo 1. A porcentagem de liberação de LDH foi estimada em relação as células lisadas com 3% Triton-100. * p ≤0,05 indica diferença estatística significativa em comparação com grupo controle, teste t de Student. Os resultados apresentados são representativos de dados de pelo menos três experimentos.

4.9 PAK2 está *upstream* a oligomerização e formação de puncta de ASC.

A ativação do inflamassoma resulta na oligomerização do adaptador ASC que se liga a pro-caspase1, formando um complexo multiproteico[98,99]. Uma maneira de avaliar a oligamerização e ativação de ASC é atrás da técnica de *cross-linking*. Brevemente, após a ativação do inflamassoma, as células são lisadas e tratadas com DSS, um crosslinker

que mantem a interação entre proteínas mesmo em condições desnaturantes[100]. Nosso dado demonstra que da mesma forma que a inibição de PAK2 com FRAX597 diminuiu a ativação de caspase-1, ela também atenuou a formação de oligômeros de ASC em macrófagos primados com LPS e estimulados por Poly (dA: Dt) e *L. pneumophila* WT e *FlaA* (**Fig.12**), indicando que a atividade de PAK2 na ativação do inflamassoma ocorre antes da oligomerização de ASC.

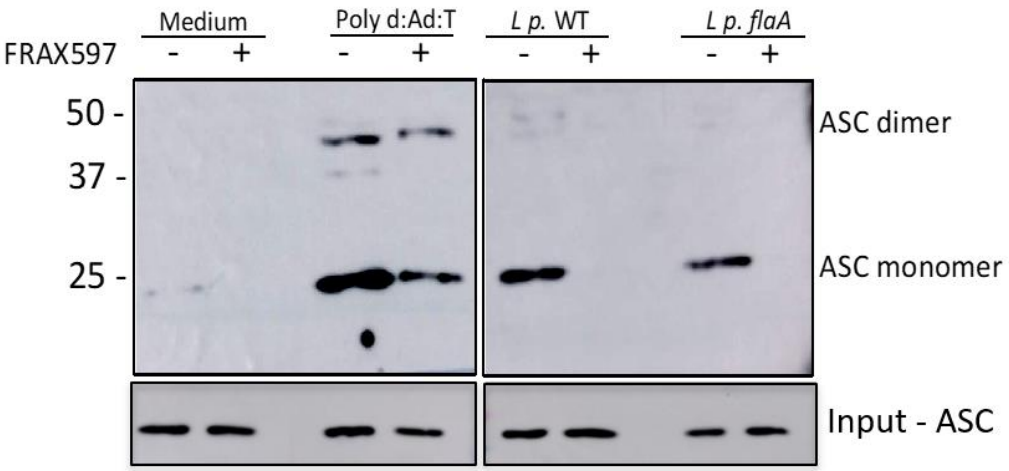
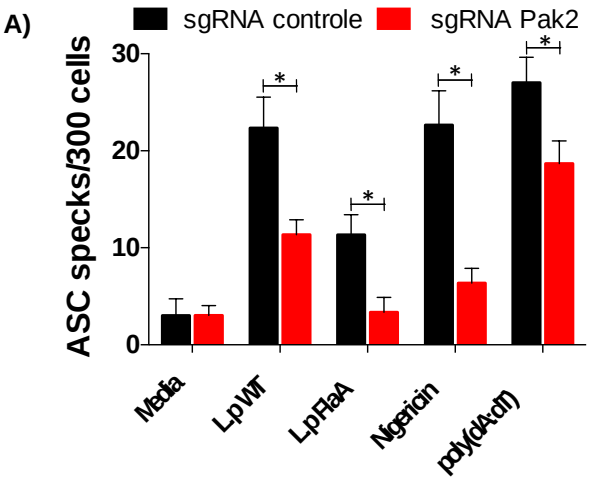


Figura 12: PAK2 medeia oligomerização ASC. Macrófagos WT foram tratados ou não com FRAX597, primados com LPS-B5 Ultrapuro (100 ηg/ml) por e estimulados com poly (dA:Dt) ou infectados com *L. pneumophila FlaA*. Imunotransferências dos oligômeros de ASC cross-linked DSS foram realizadas usando anti-ASC para expressão de dímeros monômeros de ASC. Os dados são provenientes de um experimento.

A ativação do receptor NLR após o reconhecimento do ligante resulta na agregação do adaptador ASC, e na formação de estruturas visíveis em microscópico óptico conhecida como “puncta” ou “specks” de ASC. A formação de puncta de ASC é uma das principais indicações que o inflamassoma foi ativado[49,98]. Portanto, utilizamos esta técnica para avaliar se PAk2 está *upstream* a ativação de ASC, uma vez que nosso dado sugere esse papel (**Fig. 12**). Para isso, macrófagos nocautes de *Pak2* foram gerados, primados com LPS e estimulados com os diferentes agonistas. Observamos por imunofluorescência que a ausência de *Pak2* reduz significativamente a contagem de puncta dentro da célula, indicando que PAK2 se encontra *upstream* a formação desse complexo, sendo importante para o oligomerização de ASC (**Fig. 13A**).

Por fim, para avaliarmos se PAk2 colocaliza com ASC, macrófagos diferenciados de animais deficientes em Caspase-1 foram transduzidos com ASC-GFP, primados com LPS e tratados com os mesmos estímulos descritos anteriormente. As células foram marcadas para imunofluorescência utilizando um anticorpo anti-Pak2, e as imagens analisadas através da microscopia confocal. Como observado na Figura 13B, PAK2 colocaliza com os puncta de ASC, indicando uma interação física entre essas duas proteínas. Juntos, nossos dados demonstram o envolvimento de PAK2 na ativação de diferentes inflamassomas. Contudo, estudos adicionais serão necessários para avaliarmos a função dessa quinase no processo de ativação dos inflamassomas.



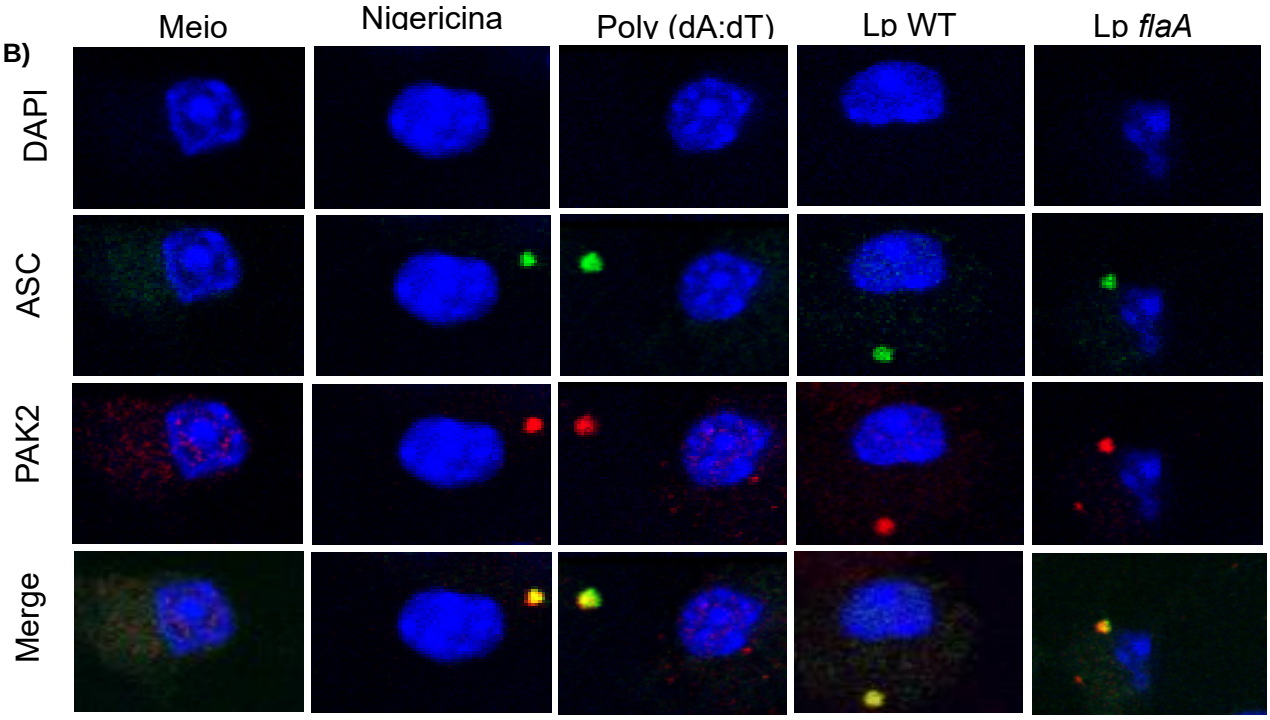


Figura 13: PAK2 interage com os punctas de ASC. A-Macrófagos nocaute de *Pak2* e o controle vazio foram primados LPS-B5 Ultrapuro (100 ng/ml), estimulados com Nigericina (10 μM) ou Poly dA:dT (3 μM) por 1 hora ou infectados com *L. pneumophila* por 90min, e com *L. pneumophila* mutante para *flaA* em MOI 10 por 3 horas, respectivamente. Os punctas de ASC foram detectadas por coloração de imunofluorescência utilizando anti-ASC e quantificados através de microscopia óptica. Os dados quantificados são apresentados como média ± SEM da porcentagem de células com formação de punctas ASC. Os valores de p foram determinados por um teste t de Student não pareado bicaudal: $**p < 0,01$. **B**-Macrófagos derivados da medula óssea de ASC/Caspase1/Caspase11 $^{-/-}$ foram transduzidos com ASC-GFP, primados e estimulados conforme descrito anteriormente. As células foram marcadas com anti-Pak2 por imunofluorescência e fotografadas com microscopia confocal. Barra de escala, 10μm.

4.10 PAK2 é importante para o controle da replicação de *L. pneumophila* mediado pelo inflamassoma de NLRC4 *in vivo.*

Para investigar se nossos achados *in vitro* são fisiologicamente relevantes durante a infecção *in vivo*, tratamos os camundongos C57BL/6 com inibidor de PAK1-2 (FRAX597) e infectamos com *L. pneumophila* WT e *L. pneumophila flaA*. Dois dias após a infecção, os pulmões foram coletados, homogeneizados e plaqueados em meio CYE para determinação da UFCs/pulmão. Consistente com os resultados obtidos anteriormente, observamos uma susceptibilidade maior nos animais tratados com inibidor de PAK, tanto pela via oral, quanto pela via intraperitoneal. Como controle, infectamos os camundongos C57BL/6 com *L. pneumophila flaA* e como esperado, ela foi capaz de replicar em níveis comparáveis a *Legionella* selvagem em animais *Nlrc4*$^{-/-}$.

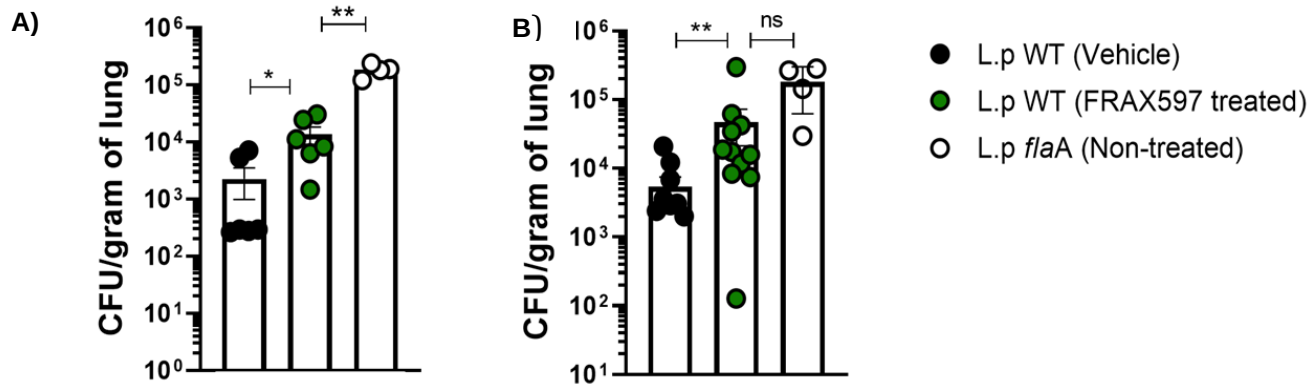


Figura 14: O controle da replicação de *Legionella* é prejudicado em animais tratados com inibidor de PAK1-2. Camundongos C57BL/6 foram tratados por injeção intraperitoneal ou via oral (Figura A ou B, respectivamente) com veículo ou 90 mg/kg de FRAX597 dois dias antes da infecção com *L. pneumophila* WT ou *L. pneumophila flaA* via intranasal, e e dois dias após. Os pulmões foram coletado, macerados e os homogenatos foram plaqueados em CYE com estreptomicina para contagem de unidades formadoras de colônia (UFCs). Cada ponto representa um animal e as linhas horizontais representam as médias. *, $p < 0,05$; ns, não significativo.

4.11 Confirmação da deleção de *Pak2* em macrófagos por CRISPR-cas9.

Para confirmar a deleção de *Pak2* por CRISPR-cas9 em BMDMs, utilizamos a técnica de *Western Blotting*. BMDMs em diferenciação proveniente de camundongo C57BL/6 expressando Cas9 foram transduzidos com o sobrenadante das células HEK 293T transfectadas com sgRNA de *Pak2* e do vetor vazio. Após a seleção com puromicina, as células foram plaqueadas para os respectivos experimentos citados a

cima, e lisadas para avaliarmos a expressão ou não da banda referente a *Pak2*. Como podemos observar na imagem 14, a deleção do gene nos macrófagos foi confirmada. É importante ressaltar que em todos os experimentos realizados confirmamos o nocaute de *Pak2* por *Western blotting*.

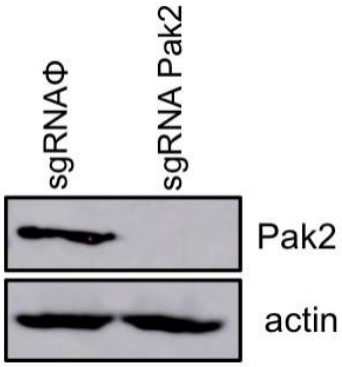


Figura 15: *Pak2* é eficientemente deletado em macrófagos por meio da técnica de *CRISPR-cas9*. Macrófagos isolados de camundongos C5B57/6 Cas9 foram transduzidos com sgPak2 e com vetor vazio. As células foram selecionadas com puromicina e lisadas para serem analisadas por *Western Blott*.

5. DISCUSSÃO

O papel dos inflamassomas na patogênese de diversas doenças tem gerado um intenso interesse em identificar novos genes envolvidos na regulação e montagem dessa plataforma multiproteica, incluindo entre eles o inflamassoma de NLRC4. Embora seja um inflamassoma bastante estudado, os mecanismos e as vias moleculares que regulam a ativação dessas maquinarias ainda não foram completamente elucidados. Portanto, nosso estudo teve como objetivo identificar novos alvos envolvidos na ativação de NLRC4. Para isso, selecionamos genes previamente identificados a partir de um *screening* realizado em nosso laboratório, utilizando a técnica de BIOID. Nossos resultados demonstram que PAK2, uma proteína quinase identificada no *screening*, tem um papel importante na ativação de vários inflamassomas.

A flagelina, expressa por uma ampla variedade de bactérias, é um potente agonista dos receptores extracelular TLR5 e, no citoplasma ativa o inflamassoma de NAIP/NLRC4 e é capaz de induzir a resposta imune inata e adaptativa[101]. Nossa primeira observação, utilizando a flagelina de *Legionella pneumophila* fusionada a um fator letal de *Bacillus anthracis* (*FlaTox*), uma potente ferramenta para ativação do inflamassoma de NLRC4[102], nos permitiu identificar dois genes possivelmente envolvidos na morte celular via NLRC4, sendo estes Gelsolin e a Serine/threonine-protein kinase PAK-2 (**Fig.4**). Já está estabelecido que a indução de alguns danos, ou a infecção por bactérias algumas bactérias, ativam diferentes inflamassomas, que culminam na clivagem da Gasdermina D, e formação de poros na membrana plasmática, resultando na lise celular e morte inflamatória conhecida por piroptose[24]. A morte celular proporciona ao hospedeiro um importante recurso de eliminação do patógeno, pois além do processo de eferocitose, mecanismos imunes mais robustos são ativados de forma a combatê-lo com maior eficiência[29]. Logo, como a formação de poro é um passo necessário na indução de piroptose, e este por sua vez é uma consequência da ativação do NLRC4, suspeitamos que *gsl* e *pak2* estariam envolvidos nessa via.

O controle da replicação de *L. pneumophila* em macrófagos murinos ocorre em decorrência da ativação do inflamassoma de NLRC4. A formação de poros e consequente morte celular por piroptose após a ativação de NLRC4, elimina o nicho replicativo da bactéria, facilitando o controle da replicação pelo mecanismo de eferocitose

pelos neutrófilos[29]. Foi demonstrado que macrófagos derivados de animais *Nlrc4*$^{-/-}$ são mais susceptíveis à infecção por *L. pneumophila* quando comparados aos macrófagos WT, e que essa proteção mediada pelo NLRC4 é dependente da ativação de caspase-1[83,84,103]. Nesse contexto, avaliamos a replicação de *L. pneumophila* WT e *L. pneumophila* mutante *flaA* (mutante para flagelina) em macrófagos nocautes para cada gene alvo. No entanto, entre os cinco genes avaliados, apenas *Pak2* demonstrou ter um papel no controle da replicação (**Fig.5A e Fig.5C**). Além disso, não houve diferença na infecção por *L. pneumophila flaA* (**Fig.5B e Fig.5D**), corroborando com os achados de Zamboni e colaboradores, nos quais foi observado que a *Legionella* deficiente de flagelina é resistente a ao controle da infecção por macrófagos, uma vez que ela consegue evadir do reconhecimento do NLRC4 e multiplicar livremente dentro da célula[55].

A proteína quinase PAK2 é membro da família das proteínas serina/treonina quinase que são ativadas através da ligação a *Rho GTPases* Cdc42 e Rac. Essas proteínas regulam várias funções, incluindo motilidade, sobrevivência, morte celular e diversas cascatas de sinalização[104]. Diversos estudos tem demonstrado que *Pak2* está superexpresso em células cancerígenas, contribuindo para o desenvolvimento, migração e progressão tumoral[105-107]. Além disso, foi proposto que PAK2 tem a capacidade de fosforilar resíduos específicos da caspase-7, levando a uma diminuição na sua atividade e redução da apoptose[86,108]. No entanto, a caspase-7 não está atrelada apenas a processos apoptóticos, pois foi demonstrado que NLRC4 e caspase-1 ativam a caspase-7, o que contribui para restrição da infecção por *L. pneumophila*[109]. Lee e colaboradores demonstraram que PAK2 é clivada por caspase-3 durante a apoptose em células epiteliais e em linfócitos, e esse processo resulta na sua autofosforilação e posteriormente, ativação[110]. Outros estudos mais recentes mostraram que PAK2 também está envolvido na imunidade adaptativa, uma vez que camundongos deficientes em *Pak2* nas células T, apresentaram uma porcentagem menor de FOXP3, fator de transcrição essencial na diferenciação de células T regulatória, ocasionando assim, o aparecimento de doenças autoimune em decorrência a um prejuízo na tolerância imunológica periférica desses animais[111,112]. Embora PAK2 tenho sido relacionado a diversas funções celulares, como por exemplo a morte celular por apoptose, desenvolvimento tumoral, e geração de células T regulatórias, nossos dados trazem um novo papel para PAK2, o qual está

envolvido na resposta imune inata, sendo uma molécula importante na regulação do inflamassoma de NLRC4.

Como nossos dados demonstraram um papel para PAK2 na ativação da via de NLRC4 e no controle bacteriano, decidimos investigar se PAK1, que possui alta similaridade com PAK2, também desempenharia um papel nessa via ou um possível papel compensatório para PAK2. Nossos resultados demonstraram que PAK2, mas não PAK1, tem papel na resposta imune desencadeada pela via NLRC4 em resposta a infecção por *Legionella*. Além disso, macrófagos duplos nocaute (*Pak1/2*) não apresentaram um fenótipo aditivo em relação a macrófagos deficientes somente em *Pak2*, confirmando nossos dados do papel de PAK2, mas não PAK1 na ativação de NLRC4 e controle da replicação de *Legionella* (**Fig.7**). Recentemente, em um estudo envolvendo essas quinases, foi visto que macrófagos *Pak1* nocautes, apresentaram uma redução na clivagem de caspase-1 e na produção de IL-1β via NLRP3 em resposta à toxina CNF1 de *Escherichia coli,* quando comparados aos macrófagos nocaute de *Pak2*, sugerindo assim que nesse modelo experimental, PAK1 desempenha um papel principal na ativação de NLRP3. Além disso, foi observado uma redução significante nos macrófagos nocaute de *Pak1/2* (DKO), indicando um efeito compensatório parcial entre as duas proteínas[113]. Nossos resultados iniciais demonstraram um papel importante de PAK2, mas não PAK1 na ativação do inflamassoma de NLRC4, uma vez que apesar de Pak1 apresentar um papel discreto na secreção de IL-1β, a redução observada nas células DKO é devida à ausência de *pak2*, sugerindo que em nosso trabalho, PAK1 e PAK2 não apresentam um papel redundante (**Fig. 10**). Por outro lado, os dados de Dufies e colaboradores demonstraram o papel principal de PAK1 na ativação do inflamassoma de NLRP3.

A ativação de caspase-1 é fundamental para promover a liberação de citocinas nas suas formas bioativas, o qual contribui para desencadear a resposta imune contra infecções por patógenos[22]. Diversos dados da literatura, e também confirmados por nossos próprios dados, demonstram que em condições normais, o macrófago é altamente eficiente na produção de IL-1β quando infectado com *L. pneumophila*. Entretanto na ausência de PAK2, a produção de IL-1β induzida tanto pela via de NLRC4,

quanto pela via não canônica, se encontra reduzida nestes macrófagos (**Fig. 8A**). Diante da importância da sinalização de PAK2 nos inflamassomas citados acima, e também do papel de PAK1 na ativação do inflamassoma de NLRP3[113], decidimos avaliar se PAK2 possui papel na ativação de outros inflamassomas, incluindo NLRP3 e AIM2. corroborando nossa hipótese, nossos dados demonstram que células nocautes de *Pak2*, apresentaram uma redução severa na secreção de IL-1β quando comparadas ao controle (**Fig. 9A**), indicando um papel amplo de PAK2 na ativação dos inflamassomas.

Fink e Cookson demonstraram que a formação de poro em decorrência a piroptose leva ao um desequilíbrio osmótico dentro da célula que gera sua ruptura. Esse fenómeno é acompanhado da liberação de citocinas inflamatórias e da enzima lactato desidrogenase[114]. Nesse contexto, avaliamos a liberação de LDH em resposta aos diferentes estímulos, e observamos que a ausência de *Pak2* também afeta a liberação de LDH e consequente morte por piroptose, visto que houve uma diminuição na liberação dessa enzima nas células nocautes nas diferentes vias (**Fig. 8A e Fig. 9A**). Dessa maneira, nossos dados sugerem que o gene em questão está *upstream* a maturação/secreção de IL-1 β, assim como da clivagem da gasdermina-D.

Além disso, demonstramos que PAK2 também foi capaz de regular a clivagem e ativação de caspase-1 em todas as vias avaliadas (**Fig. 9C**). A caspase-1 é uma enzima conversora de IL-1β, pertencente à família cisteína-aspartato protease[115.] Consistente com dados anteriores, obtidos com macrófagos nocautes para *Pak2*, observamos uma redução na produção de IL-1β, liberação de LDH e ativação de caspase-1 em BMDMs de animais selvagens tratadas com FRAX597, inibidor de PAK1-2 **(Fig. 11).**

Na plataforma do inflamassoma, ativação de caspase-1 é mediada pela proteína adaptadora ASC, que uma vez recrutada, forma uma estrutura conhecidas como puncta de ASC[49]. Nossos dados demonstraram que PAK2 possui um papel na oligomerização e formação de puncta de ASC. Além disso, observamos por imunofluorescência que PAK2 colocaliza com alguns puncta de ASC em resposta a todos os estímulos (**Fig. 12 e Fig. 13**). Coletivamente, esses dados sugerem uma interação física, mesmo que transiente, entre essas duas proteínas, e além disso, podemos concluir que PAK2 está *upstream* à oligomerização de ASC, sendo uma proteína importante na ativação do eixo ASC-

caspase-1-IL-1β de todos os inflamassomas. Em 2010, Broz e colaboradores demostraram que mutantes de capase-1, com defeitos na autoproteólise mediada após a interação com ASC, são capazes de induzir piroptose, mas não o processamento de citocinas[49]. Em um outro trabalho no ano de 2016, utilizando mutantes de ASC, demonstrou que a formação de puncta é importante para indução eficiente de IL-1β, mas não para piroptose[116]. Nossos dados sugerem que está relacionada com os dois processos, seja na indução de formação de poros, ou na liberação de citocinas pró-inflamatórias, uma vez que sua função está relacionada com ambas oligomerização de ASC e ativação de caspase-1.

O papel de NLRC4 utilizando modelos de infecções bacterianas *in vivo* já foi demonstrado, uma vez que camundongos deficientes para NLRC4 infectados com *L. pneumophila* exibiram uma suscetibilidade aumentada via infecção intranasal, demostrando aumento da carga bacteriana nos pulmões[82]. Dessa maneira, para validar a importância de Pak2 no controle da replicação, tratamos os camundongos C57BL/6 com FRAX597 e infectamos com *L. pneumophila* WT *e flaA.* Observamos que dois dias após a infecção, os animais submetidos ao tratamento apresentaram uma UFC/pulmão maior comparado aos animais tratados com veículo. Além disso, como controle, infectamos os animais com *L. pneumophila flaA,* e como esperado observamos um aumento da UFC/pulmão ainda mais significativo quando comparado com os animais controle. Esses dados corroboram com nossos achados *in vitro* e revelam a importância de PAK2 no controle da replicação de *L. pneumophila* e na resposta imune inata durante a bacteremia.

As proteínas serina-treonina quinase são essenciais na regulação de uma ampla gama de processos biológicos, incluindo as vias de transdução de sinal. O mecanismo regulador inclui vários fenômenos, entre eles a fosforilação de proteínas em resíduos de serina, treonina ou tirosina[117,118]. No nosso trabalho, obtivemos evidências do envolvimento direto de PAK2 na ativação de vários inflamassomas. No entanto, mais investigações serão necessárias para desvendarmos o mecanismo pelo qual PAK2 participa na oligomerização de ASC. Modificações pós transducionais como fosforilação, ubiquitinação, acetilação entre outros, são considerados eventos importantes na

regulação da montagem e ativação do inflamassoma[119]. Por exemplo, Hara et al sugeriram que o resíduo Tyr144 de ASC é fosforilado por SYK e JNK, levando a formação de puncta e consequentemente ativação do inflamassoma de NLRP3 ou Aim[120]. Estudos posteriores demonstraram que a proteína responsável em fosforilar diretamente esse resíduo de ASC é a quinase PYK2, e não SYK[121]. Também foi demonstrado que a fosforilação de NLRC4 na serina 533 (S533) por PKCδ, resulta no recrutamento da pro-caspase-1 e na formação de puncta em resposta a S. typhimurium[122]. Basak e colaboradores demostraram que PAK1 é capaz de fosforilar o resíduo Ser376 de Capase-1 durante a infecção por *Helicobacter pylori*[123]. Assim, como podemos observar, as vias de sinalização mediada por essas e outras quinases são de extrema importância para controlar a ativação de diversos inflamassomas. Por isso, nosso próximo passo será a geração de mutantes de PAK2, para avaliar a hipótese de que essa quinase esteja fosforilando a proteína adaptadora ASC, ou mesmo algo outro alvo importante para a ativação da via.

PAK2 apresenta inúmeras funções biológicas em muitas cascatas de sinalização que estão relacionadas à imunidade inata e adaptativa[110]. Nosso estudo destaca um papel importante de PAK2 na montagem e ativação de diferentes inflamassomas. Portanto, a identificação de novos genes na via de ativação desses complexos multiproteicos, pode ampliar o leque de moléculas alvo na intervenção farmacológica para inibição destas vias, assim como para o tratamento de doenças como diabetes, Alzheimer, aterosclerose, CAPS, entre outros. Além disso, compreender o mecanismo pelo qual Pak2 orquestra a montagem e ativação do inflamassoma, pode contribuir tanto para o controle da ativação exacerbada da resposta imune, quanto para defesa do hospedeiro contra infecções bacterianas.

6. CONCLUSÃO

Os dados apresentados nessa dissertação demostram que a serina treonina quinase PAK2 desempenha um papel importante na ativação do inflamassoma de NLRC4, NLRP3, Aim2 e do inflamassoma não canônico mediado por caspase-11. PAK2 demonstrou estar *upstream* a oligomerização de ASC, e, portanto, ser um mediador importante na produção de IL-1β e na indução de morte celular inflamatória conhecida como piroptose. Além disso, nossos resultados revelam a importância de Pak2 no controle da replicação de *Legionella pneumophila* em macrófagos murinos *in vitro* e *in vivo*.

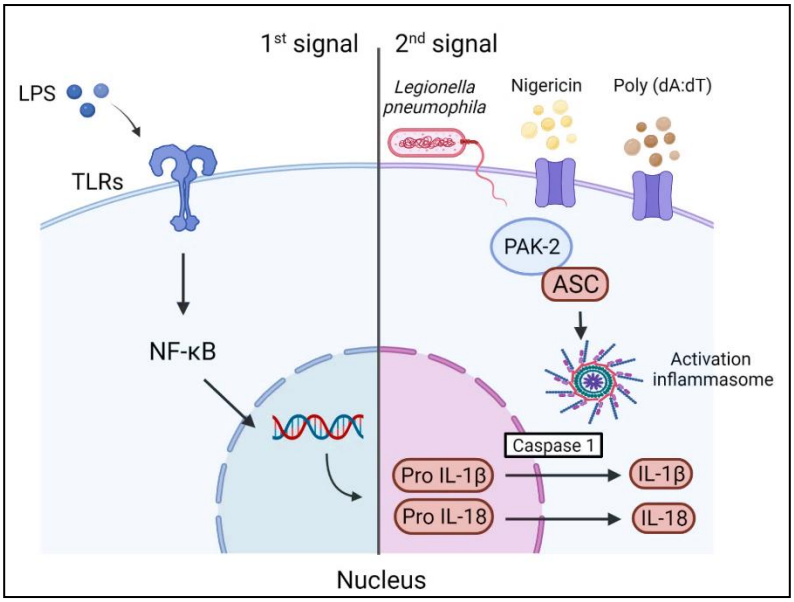


Figura 15: Modelo proposto de ativação de diferentes inflamassomas mediado pela quinase PAK2.

7. REFERÊNCIAS

1. JACK, Robert S. Evolution of immunity and pathogens. Pathogen-Host Interactions: **Antigenic Variation v. Somatic Adaptations**, p. 1-20, 2015.

2. GORDON, Siamon. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. **Cell**, v. 111, n. 7, p. 927-930, 2002.

3. JANEWAY, Charles A. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. In: **Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, v.54, p. 1-13,1989.

4. LI, Danyang; WU, Minghua. Pattern recognition receptors in health and diseases. **Signal transduction and targeted therapy**, v. 6, n. 1, p. 1-24, 2021.

5. MEDZHITOV, Ruslan; JANEWAY JR, Charles A. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. **Current opinion in immunology**, v. 9, n. 1, p. 4-9, 1997.

6. KAWAI, Taro et al. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. **Immunity**, v. 11, n. 1, p. 115-122, 1999.

7. MORESCO, Eva Marie Y.; LAVINE, Diantha; BEUTLER, Bruce. Toll-like receptors. **Current Biology**, v. 21, n. 13, p. R488-R493, 2011.

8. AKIRA, Shizuo; TAKEDA, Kiyoshi. Toll-like receptor signalling. **Nature reviews immunology**, v. 4, n. 7, p. 499-511, 2004.

9. MARTINON, Fabio; TSCHOPP, Jürg. NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens. **Trends in immunology**, v. 26, n. 8, p. 447-454, 2005.

10. MARTINON, Fabio; MAYOR, Annick; TSCHOPP, Jürg. The inflammasomes: guardians of the body. **Annual review of immunology**, v. 27, p. 229-265, 2009.

11. FRANCHI, Luigi et al. Function of Nod‐like receptors in microbial recognition and host defense. **Immunological reviews**, v. 227, n. 1, p. 106-128, 2009.

12. TING, Jenny P.-Y. et al. The NLR gene family: a standard nomenclature. **Immunity**, v. 28, n. 3, p. 285-287, 2008.

13. ATHMAN, Rafika; PHILPOTT, Dana. Innate immunity via Toll-like receptors and Nod proteins. **Current opinion in microbiology**, v. 7, n. 1, p. 25-32, 2004.

14. FUSCO, William G.; DUNCAN, Joseph A. Novel aspects of the assembly and activation of inflammasomes with focus on the NLRC4 inflammasome. **International Immunology**, v. 30, n. 5, p. 183-193, 2018.

15. GIRARDIN, Stephen E. et al. Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. **Science**, v. 300, n. 5625, p. 1584-1587, 2003.

16. GIRARDIN, Stephen E. et al. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 11, p. 8869-8872, 2003.

17. CHAMAILLARD, Mathias et al. An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. **Nature immunology**, v. 4, n. 7, p. 702-707, 2003.

18. TING, Jenny P.-Y.; WILLINGHAM, Stephen B.; BERGSTRALH, Daniel T. NLRs at the intersection of cell death and immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 5, p. 372-379, 2008.

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

20. 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

21. FERNANDES-ALNEMRI, T., YU, J. W., DATTA, P., Wu, J., ALNEMRI, E. S. AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. **Nature**, v.458, n. 7237, p. 509-13, 2009.

22. BROZ, Petr; DIXIT, Vishva M. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 7, p. 407-420, 2016.

23. SWANSON, Karen V.; DENG, Meng; TING, Jenny P.-Y. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. **Nature Reviews Immunology**, v. 19, n. 8, p. 477-489, 2019.

24. MIAO, Edward A. et al. Caspase-1-induced pyroptosis is an innate immune effector mechanism against intracellular bacteria. **Nature immunology**, v. 11, n. 12, p. 1136-1142, 2010.

25. SCHETT, Georg; DAYER, Jean-Michel; MANGER, Bernhard. Interleukin-1 function and role in rheumatic disease. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 12, n. 1, p. 14-24, 2016.

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

27. JORGENSEN, Ine; MIAO, Edward A. Pyroptotic cell death defends against intracellular pathogens. Immunological reviews, v. 265, n. 1, p. 130-142, 2015.

28. KAYAGAKI, N. et al. NINJ1 mediates plasma membrane rupture during lytic cell death. **Nature**, v. 591, p. 131–136, 2021.

29. JORGENSEN, Ine 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.

30. VOET, Sofie et al. Inflammasomes in neuroinflammatory and neurodegenerative diseases. **EMBO Molecular Medicine**, v. 11, n. 6, p. e10248, 2019.

31. PRÓCHNICKI, Tomasz; MANGAN, Matthew S.; LATZ, Eicke. Recent insights into the molecular mechanisms of the NLRP3 inflammasome activation. **F1000Research,** v. 5, 2016.

32. WOLF, Andrea J. et al. Hexokinase is an innate immune receptor for the detection of bacterial peptidoglycan. **Cell**, v. 166, n. 3, p. 624-636, 2016.

33. GROß, Christina J. et al. K+ efflux-independent NLRP3 inflammasome activation by small molecules targeting mitochondria. **Immunity**, v. 45, n. 4, p. 761-773, 2016.

34. KAYAGAKI, Nobuhiko et al. Noncanonical inflammasome activation by intracellular LPS independent of TLR4. **Science**, v. 341, n. 6151, p. 1246-1249, 2013.

35. KAYAGAKI, Nobuhiko et al. Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling. **Nature**, v. 526, n. 7575, p. 666-671, 2015.

36. JULIANA, Christine et al. Non-transcriptional priming and deubiquitination regulate NLRP3 inflammasome activation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 43, p. 36617-36622, 2012.

37. HE, Yuan et al. NEK7 is an essential mediator of NLRP3 activation downstream of potassium efflux. **Nature**, v. 530, n. 7590, p. 354-357, 2016.

38. MISAWA, Takuma et al. Microtubule-driven spatial arrangement of mitochondria promotes activation of the NLRP3 inflammasome. **Nature immunology**, v. 14, n. 5, p. 454-460, 2013.

39. PALAZÓN‐RIQUELME, Pablo et al. USP7 and USP47 deubiquitinases regulate NLRP3 inflammasome activation. **EMBO reports**, v. 19, n. 10, p. e44766, 2018.

40. SONG, Nan; LI, Tao. Regulation of NLRP3 inflammasome by phosphorylation. **Frontiers in immunology**, p. 2305, 2018.

41. PY, Bénédicte F. et al. Deubiquitination of NLRP3 by BRCC3 critically regulates inflammasome activity. **Molecular cell**, v. 49, n. 2, p. 331-338, 2013.

42. DUONG, Bao H. et al. A20 restricts ubiquitination of pro-interleukin-1β protein complexes and suppresses NLRP3 inflammasome activity. **Immunity**, v. 42, n. 1, p. 55-67, 2015.

43. MARIATHASAN, Sanjeev; MONACK, Denise M. Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 1, p. 31-40, 2007.

44. ZHANG, Zhirong et al. Protein kinase D at the Golgi controls NLRP3 inflammasome activation. **Journal of Experimental Medicine**, v. 214, n. 9, p. 2671-2693, 2017.

45. MORTIMER, Leanne et al. NLRP3 inflammasome inhibition is disrupted in a group of auto-inflammatory disease CAPS mutations. **Nature immunology**, v. 17, n. 10, p. 1176-1186, 2016.

46. STUTZ, Andrea et al. NLRP3 inflammasome assembly is regulated by phosphorylation of the pyrin domain. **Journal of Experimental Medicine**, v. 214, n. 6, p. 1725-1736, 2017.

47. LUHESHI, Nadia M. et al. Sphingosine regulates the NLRP3‐inflammasome and IL‐1β release from macrophages. European journal of immunology, v. 42, n. 3, p. 716-725, 2012.

48. GARIB, F. Yu et al. Inactivation of inflammasomes by pathogens regulates inflammation. **Biochemistry (Moscow),** v. 81, n. 11, p. 1326-1339, 2016.

49. BROZ, Petr 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.

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

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

52. MIAO, Edward 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.

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

54. RUIZ, Valeria M. Reyes et al. Broad detection of bacterial type III secretion system and flagellin proteins by the human NAIP/NLRC4 inflammasome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 50, p. 13242-13247, 2017.

55. REN, Tao et al. Flagellin-deficient Legionella mutants evade caspase-1-and Naip5-mediated macrophage immunity. **PLoS pathogens**, v. 2, n. 3, p. e18, 2006.

56. DIEZ, Eduardo et al. Birc1e is the gene within the Lgn1 locus associated with resistance to Legionella pneumophila. **Nature genetics**, v. 33, n. 1, p. 55-60, 2003.

57. WRIGHT JR, Edward K. et al. Naip5 affects host susceptibility to the intracellular pathogen Legionella pneumophila. **Current biology**, v. 13, n. 1, p. 27-36, 2003.

58. LIGHTFIELD, Karla L. et al. Critical function for Naip5 in inflammasome activation by a conserved carboxy-terminal domain of flagellin. **Nature immunology**, v. 9, n. 10, p. 1171-1178, 2008.

59. GE, Jianning et al. Preventing bacterial DNA release and absent in melanoma 2 inflammasome activation by a Legionella effector functioning in membrane trafficking. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 16, p. 6193-6198, 2012.

60. SHI, Jianjin et al. Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS. **Nature**, v. 514, n. 7521, p. 187-192, 2014.

61. MASCARENHAS, Danielle PA; ZAMBONI, Dario S. Inflammasome biology taught by Legionella pneumophila. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 101, n. 4, p. 841-849, 2017.

62. CASE, Christopher L.; SHIN, Sunny; ROY, Craig 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.

63. CANNA, Scott 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.

64. KITAMURA, Akiko et al. An inherited mutation in NLRC4 causes autoinflammation in human and mice. **Journal of Experimental Medicine**, v. 211, n. 12, p. 2385-2396, 2014.

65. ROMBERG, Neil et al. Mutation of NLRC4 causes a syndrome of enterocolitis and autoinflammation. **Nature genetics**, v. 46, n. 10, p. 1135-1139, 2014.

66. KAY, Callum et al. Molecular mechanisms activating the NAIP-NLRC4 inflammasome: Implications in infectious disease, autoinflammation, and cancer. **Immunological Reviews**, v. 297, n. 1, p. 67-82, 2020.

67. JANOWSKI, Ann M. et al. NLRC4 suppresses melanoma tumor progression independently of inflammasome activation. **The Journal of clinical investigation**, v. 126, n. 10, p. 3917-3928, 2016.

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

69. Palazón-riquelme, P. *et al.* USP 7 and USP 47 deubiquitinases regulate NLRP 3 inflammasome activation. 1–17 (2018). doi:10.15252/embr.201744766

70. SONG, Nan et al. NLRP3 phosphorylation is an essential priming event for inflammasome activation. **Molecular cell**, v. 68, n. 1, p. 185-197. e6, 2017.

71. QU, Yan et al. Phosphorylation of NLRC4 is critical for inflammasome activation. Nature, v. 490, n. 7421, p. 539-542, 2012.

72. SUZUKI, Shiho et al. Shigella type III secretion protein MxiI is recognized by Naip2 to induce Nlrc4 inflammasome activation independently of Pkcδ. **PLoS pathogens**, v. 10, n. 2, p. e1003926, 2014.

73. LIU, Weiwei et al. LRRK2 promotes the activation of NLRC4 inflammasome during Salmonella Typhimurium infection. **Journal of Experimental Medicine**, v. 214, n. 10, p. 3051-3066, 2017.

74. NAPIER, Brooke A. et al. Complement pathway amplifies caspase-11–dependent cell death and endotoxin-induced sepsis severity. **Journal of Experimental Medicine**, v. 213, n. 11, p. 2365-2382, 2016.

75. ROUX, Kyle J. et al. A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. **Journal of Cell Biology**, v. 196, n. 6, p. 801-810, 2012.

76. MARIM, F. M. et al. A Method for Generation of Bone Marrow-Derived Macrophages from Cryopreserved Mouse Bone Marrow Cells. PLoS ONE, v. 5, p. 1–8, 2010.

77. GONÇALVES, Augusto 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 pathogens**, v. 15, n. 6, p. e1007886, 2019.

78. COERS, Jörn et al. Restriction of Legionella pneumophila growth in macrophages requires the concerted action of cytokine and Naip5/Ipaf signalling pathways. **Cellular microbiology**, v. 9, n. 10, p. 2344-2357, 2007

79. JORGENSEN, Ine et al. IL‐1β, IL‐18, and eicosanoids promote neutrophil recruitment to pore‐induced intracellular traps following pyroptosis. European journal of immunology, v. 46, n. 12, p. 2761-2766, 2016.

80. SILVEIRA, Tatiana N.; ZAMBONI, Dario S. Pore formation triggered by Legionella spp. is an Nlrc4 inflammasome-dependent host cell response that precedes pyroptosis. **Infection and immunity**, v. 78, n. 3, p. 1403-1413, 201

81. CASE, Christopher L.; ROY, Craig 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.

82. CERQUEIRA, Daiane M. et al. Caspase-1 but not caspase-11 is required for NLRC4-mediated pyroptosis and restriction of infection by flagellated Legionella species in mouse macrophages and in vivo. **The Journal of Immunology**, v. 195, n. 5, p. 2303-2311, 2015.

83. ZAMBONI, Dario 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.

84. AMER, Amal 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.

85. GREBEŇOVÁ, Dana et al. PAK1, PAK1Δ15, and PAK2: similarities, differences and mutual interactions. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-18, 2019.

86. LI, Xiang et al. Phosphorylation of caspase-7 by p21-activated protein kinase (PAK) 2 inhibits chemotherapeutic drug-induced apoptosis of breast cancer cell lines. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 25, p. 22291-22299, 2011.

87. MANSER, Edward et al. A brain serine/threonine protein kinase activated by Cdc42 and Rac1. **Nature**, v. 367, n. 6458, p. 40-46, 1994.

88. WELLS, Claire M.; JONES, Gareth E. The emerging importance of group II PAKs. **Biochemical Journal**, v. 425, n. 3, p. 465-473, 2010.

89. NOMURA, Johji et al. Intracellular ATP decrease mediates NLRP3 inflammasome activation upon nigericin and crystal stimulation. **The Journal of Immunology**, v. 195, n. 12, p. 5718-5724, 2015.

90. MUÑOZ-PLANILLO, Raúl et al. K+ efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter. **Immunity**, v. 38, n. 6, p. 1142-1153, 2013.

91. ONÓDI, Zsófia et al. AIM2-driven inflammasome activation in heart failure. Cardiovascular Research, v. 117, n. 13, p. 2639-2651, 2021.

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

93. LICCIULLI, Silvia et al. FRAX597, a small molecule inhibitor of the p21-activated kinases, inhibits tumorigenesis of neurofibromatosis type 2 (NF2)-associated Schwannomas. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 40, p. 29105-29114, 2013.

94. NUCHE-BERENGUER, Bernardo; RAMOS-ÁLVAREZ, Irene; JENSEN, R. T. The p21-activated kinase, PAK2, is important in the activation of numerous pancreatic acinar cell signaling cascades and in the onset of early pancreatitis events. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1862, n. 6, p. 1122-1136, 2016..

95. CHANG, Yoojin et al. Phosphoproteomic analysis reveals PAK2 as a therapeutic target for lapatinib resistance in HER2-positive breast cancer cells. Biochemical and biophysical research communications, v. 505, n. 1, p. 187-193, 2018.

96. CHOW, Hoi Yee et al. p21-Activated kinase 1 is required for efficient tumor formation and progression in a Ras-mediated skin cancer model. **Cancer research**, v. 72, n. 22, p. 5966-5975, 2012.

97. SEMENOVA, Galina; CHERNOFF, Jonathan. Targeting pak1. **Biochemical Society Transactions**, v. 45, n. 1, p. 79-88, 2017.

98. FERNANDES-ALNEMRI, T. et al. The pyroptosome: a supramolecular assembly of ASC dimers mediating inflammatory cell death via caspase-1 activation. **Cell Death & Differentiation**, v. 14, n. 9, p. 1590-1604, 2007.

99. LU, Alvin et al. Unified polymerization mechanism for the assembly of ASC-dependent inflammasomes. **Cell**, v. 156, n. 6, p. 1193-1206, 2014.

100. NIU, Tingting et al. NLRP3 phosphorylation in its LRR domain critically regulates inflammasome assembly. **Nature communications**, v. 12, n. 1, p. 1-15, 2021.

101. LIN, Kuo-Hsing et al. Carboxyl-terminal fusion of E7 into Flagellin shifts TLR5 activation to NLRC4/NAIP5 activation and induces TLR5-independent anti-tumor immunity. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-10, 2016.

102. TENTHOREY, Jeannette L. et al. The structural basis of flagellin detection by NAIP5: A strategy to limit pathogen immune evasion**. Science**, v. 358, n. 6365, p. 888-893, 2017.

103. MOLOFSKY, Ari 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.

104. MOLLI, Poonam R. et al. PAK signaling in oncogenesis. **Oncogene**, v. 28, n. 28, p. 2545-2555, 2009.

105. RADU, Maria et al. PAK signalling during the development and progression of cancer. **Nature reviews Cancer**, v. 14, n. 1, p. 13-25, 2014.

106. SIU, Michelle KY et al. Differential expression and phosphorylation of Pak1 and Pak2 in ovarian cancer: effects on prognosis and cell invasion. **International journal of cancer**, v. 127, n. 1, p. 21-31, 2010.

107. GAO, Chengcheng et al. Activation of P21-activated protein kinase 2 is an independent prognostic predictor for patients with gastric cancer. **Diagnostic pathology**, v. 9, n. 1, p. 1-6, 2014.

108. RUDEL, Thomas; BOKOCH, Gary M. Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2. **Science**, v. 276, n. 5318, p. 1571-1574, 1997.

109. AKHTER, Anwari et al. Caspase-7 activation by the Nlrc4/Ipaf inflammasome restricts Legionella pneumophila infection. **PLoS pathogens**, v. 5, n. 4, p. e1000361, 2009.

110. LEE, Ning et al. Activation of hPAK65 by caspase cleavage induces some of the morphological and biochemical changes of apoptosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 25, p. 13642-13647, 1997.

111. O'HAGAN, Kyle L.; MILLER, Stephen D.; PHEE, Hyewon. Pak2 is essential for the function of Foxp3+ regulatory T cells through maintaining a suppressive Treg phenotype. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-15, 2017.

112. O'HAGAN, Kyle Leonard et al. Pak2 links TCR signaling strength to the development of regulatory T cells and maintains peripheral tolerance. **The Journal of Immunology**, v. 195, n. 4, p. 1564-1577, 2015.

113. DUFIES, Océane et al. Escherichia coli Rho GTPase-activating toxin CNF1 mediates NLRP3 inflammasome activation via p21-activated kinases-1/2 during bacteraemia in mice. **Nature microbiology**, v. 6, n. 3, p. 401-412, 2021.

114. FINK, Susan L.; COOKSON, Brad 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.

115. KELLER, Martin et al. Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion. **Cell**, v. 132, n. 5, p. 818-831, 2008.

116. DICK, Mathias S. et al. ASC filament formation serves as a signal amplification mechanism for inflammasomes**. Nature communications**, v. 7, n. 1, p. 1-13, 2016.

117. BONNE KØHLER, Julie et al. Importance of protein Ser/Thr/Tyr phosphorylation for bacterial pathogenesis. **FEBS letters**, v. 594, n. 15, p. 2339-2369, 2020.

118. MCCUBREY, J. A. et al. Serine/threonine phosphorylation in cytokine signal transduction. **Leukemia**, v. 14, n. 1, p. 9-21, 2000.

119. YANG, Jie; LIU, Zhonghua; XIAO, Tsan Sam. Post-translational regulation of inflammasomes. **Cellular & molecular immunology**, v. 14, n. 1, p. 65-79, 2017.

120. HARA, Hideki et al. Phosphorylation of the adaptor ASC acts as a molecular switch that controls the formation of speck-like aggregates and inflammasome activity. **Nature immunology,** v. 14, n. 12, p. 1247-1255, 2013.

121. CHUNG, I.-Che et al. Pyk2 activates the NLRP3 inflammasome by directly phosphorylating ASC and contributes to inflammasome-dependent peritonitis. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-13, 2016.

122. QU, Yan et al. Phosphorylation of NLRC4 is critical for inflammasome activation. **Nature**, v. 490, n. 7421, p. 539-542, 2012.

123. BASAK, Chaitali et al. NF-κB-and C/EBPβ-driven interleukin-1β gene expression and PAK1-mediated caspase-1 activation play essential roles in interleukin-1β release from Helicobacter pylori lipopolysaccharide-stimulated macrophages. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 6, p. 4279-4288, 2005.