

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA**

**LETICIA FIGUEIREDO MONTELEONE**

**ATIVACÃO DO INFLAMASSOMA E A PRODUÇÃO DE IL-1 $\beta$  EM  
MACRÓFAGOS DE CAMUNDONGOSSELECIONADOS PARA DIFERENTE  
CAPACIDADE INFLAMATÓRIA**

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

São Paulo  
2023

**LETICIA FIGUEIREDO MONTELEONE**

**ATIVACÃO DO INFLAMASSOMA E A PRODUÇÃO DE IL-1 $\beta$  EM  
MACRÓFAGOS DE CAMUNDONGOSSELECIONADOS PARA DIFERENTE  
CAPACIDADE INFLAMATÓRIA**

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

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Profa. Dra. Nancy Starobinas

Versão original.

São Paulo  
2023

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

Serviço de Biblioteca e informação Biomédica Instituto de Ciências Biomédicas

Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pela autora

Figueiredo Monteleone, Leticia  
ATIVAÇÃO DO INFLAMASSOMA E A PRODUÇÃO DE IL-1?  
EM MACRÓFAGOS DE CAMUNDONGOS SELECIONADOS PARA  
DIFERENTE CAPACIDADE INFLAMATÓRIA / Leticia  
Figueiredo Monteleone; orientadora Nancy  
Starobinas. -- São Paulo, 2023.  
131 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,  
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. PYCARD. 2. ASC speck. 3. Inflamassoma. 4. IL-  
1B. 5. AIRmax e AIRmin. I. Starobinas, Nancy ,  
orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidata: Leticia Figueiredo Monteleone

Título da Tese: Ativação do inflamassoma e a produção de IL-1 em macrófagos de camundongos selecionados para diferente capacidade inflamatória

Orientadora: Profa. Dra Nancy Starobinas

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação, em sessão pública realizada a     /     / 2023 , considerou

( ) Aprovado(a)

( ) Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Examinada: Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Presidente : Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508-000  
CEUA-ICB/USP - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "*Avaliação da produção de IL-18 em macrófagos de camundongos selecionados para diferente capacidade inflamatória e correlação com genes do locus Irm-1*", registrado sob o protocolo nº **4/2017**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de *Pesquisa Científica*, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em *pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP)*, outorgando esta licença de uso de animais com validade de **4 ano(s)** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.) Nancy Starobinas**

- Departamento: *Imunologia*

- Membros da Equipe: *Olga Célia Martinez Ibanez (Pesquisador colaborador), Orlando Garcia Ribeiro Filho (Credenciado PG), Leticia Figueiredo Montealeone (Pós-graduando)*

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, *relatório final* de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico [www.icb.usp.br/ceua](http://www.icb.usp.br/ceua). Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

## CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "*IL-18 production in different sources of macrophages from mice selected for different inflammatory capacity and its correlation with locus Irm-1*", protocol nº **4/2017**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for *Scientific Research Purposes*, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8<sup>th</sup>, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15<sup>th</sup>, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on *by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP)*, and the license for animal use is valid for **4 year(s)** from the date of approval.

- Principal Investigator: **Dr.(a.) Nancy Starobinas**

- Team members: *Olga Célia Martinez Ibanez (Collaborator Researcher), Orlando Garcia Ribeiro Filho (Graduate Supervisor), Leticia Figueiredo Montealeone (Graduate Student)*

At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
Mus musculus	AIRmax	Macho/female	3 meses/months	42
	AIRmin	Macho/male	3 meses/months	42

São Paulo, 17 de março de 2017.

  
Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes  
Coordenador CEUA-ICB/USP

  
Eliane Aparecida Gomes de M. Nascimento  
Secretário CEUA-ICB/USP



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000  
Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone(11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Of.CEUA.07(b)/2021

São Paulo, 12 de março 2021.

Prezado(a) Professor(a),

Informo que o projeto intitulado: "**Avaliação da produção de IL-1B em macrófagos de camundongos selecionados para diferente capacidade inflamatória e correlação com genes do locus Irma-1**", registrado sob o protocolo nº **04/2017**, e aprovado em 15/03/2017, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, foi **prorrogado até 15/03/2023**.

Autorizamos a prorrogação de vigência de licença, com a declaração de que não houve alteração da metodologia e das técnicas descritas na licença inicial para o uso de animais, e inclusão dos seguintes animais:

<b>Espécie</b>	<b>Linhagem</b>	<b>Sexo</b>	<b>Idade ou peso</b>	<b>Quantidade</b>
<i>Mus musculus</i>	AIRmax	Macho	3 meses	24
<i>Mus musculus</i>	AIRmin	Macho	3 meses	36

Local de procedência dos animais: Biotério do Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan.

Reitero que havendo alteração de metodologia e inserção de novos alunos ao projeto de pesquisa vinculado à referida licença a CEUA-ICB deverá ser informada.

Cordialmente,

*Luciane Valéria Sita*

Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**  
Coordenadora CEUA-ICB/USP

Prof.(a) Dr.(a) **Nancy Starobinas**  
Pesquisadora do Instituto Butantan.

**CERTIFICADO : EMENDA** v05/03/2021

Certificamos que a EMENDA (versão de 05/03/2021) da proposta intitulada "Avaliação da produção de IL-1beta em diferentes fontes de macrófagos de animais selecionados para diferente capacidade inflamatória", CEUA nº 8837020616 (ID 047105), sob a responsabilidade de Nancy Starobinas - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos vigentes para sua apresentação, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), sendo assim **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto Butantan de São Paulo (CEUAIB) em 24/03/2021.

Término previsto: 12/2022

Origem: Biotério Imunogenética  
Espécie: Camundongos heterogênicos      sexo: Machos ou Fêmeas      idade: 2 a 3 meses      Quantidade solicitada: 24  
Linhagem: ALRmax      Peso: 20 a 25 g

---

Origem: Biotério Imunogenética  
Espécie: Camundongos heterogênicos      sexo: Machos ou Fêmeas      idade: 2 a 3 meses      Quantidade solicitada: 48  
Linhagem: ALRmin      Peso: 20 a 25 g

**ANIMAIS UTILIZADOS**

		Total Aprovado	Quantidade Utilizada
Camundongos heterogênicos	Machos ou Fêmeas	204	0

São Paulo, 17 de maio de 2023



Luís Roberto de Camargo Gonçalves  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto Butantan de São Paulo



Milene Silva Tino  
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto Butantan de São Paulo



*Dedico esse trabalho a meu “papis” e minha “mamis”, Francisco e Adriana, por terem sonhado comigo esse momento a muito tempo e por todo amor doado mesmo diante da distância.*



## AGRADECIMENTOS

Ao longo dos anos que resultaram nessa tese, pessoas e instituições me ajudaram, me ensinando e apoiando. Agora que alcanço meu objetivo final e mais um ciclo se encerra em minha vida, não posso deixar de reconhecê-las e, assim, deixo um espaço a todos vocês:

À minha família, em especial Papis, Mamis e Van van, pelo incentivo, ajuda, apoio, por estarem sempre ao meu lado nos momentos de surto mesmo com a distância, sempre se fazendo perto, e me amando incondicionalmente para que eu conseguisse alcançar esse sonho que sonhamos juntos.

À Nancy, por sete anos de parceria e orientação. Obrigada por ter recebido aquela menina recém chegada do interior, e ter, nessa nossa trajetória, me apoiado, me entendido muitas vezes como somente uma mãe entenderia. Pelas “estabanadas” e risadas que demos, e por ter tido paciência com as mil fases pelas quais passei. Sem a sua compreensão, em muitos momentos, eu não teria chegado até aqui. Só nós sabemos o que passamos e serei ETERNAMENTE grata, por tudo.

Às minhas amigas que levo no coração, e que muitas vezes levantaram minha cabeça, limpam minhas lágrimas e me fizeram caminhar. Bruna, Marinha, Aline, Fernanda, Ero, Roberta, Mara Correa, Tamiris, Stephane, Bridila e Bárbara, obrigada por toda ajuda, saídas pra um docinho ou todo lanchinho na copa. Muitas vezes vocês eram a distração que ajudava o meu dia. Por todas as conversas, abraços e trocas, muito obrigada!

Ao pessoal do laboratório de Imunogenética e do nosso biotério, obrigada por terem me recebido e me tratado tão bem ao longo desses anos. Obrigada por todo conhecimento compartilhado. Acredito que sozinhos não fazemos ciência, e sem vocês essa tese não existiria.

Ao pessoal do departamento de Imunologia ICB-IV, por contribuírem para o meu crescimento profissional e a Maria Eni pela ajuda sempre que necessária.

A CAPES e CNPq pelas bolsas de estudo e pelos recursos fornecidos para o desenvolvimento deste trabalho.

E por fim, a todos que, de alguma forma, ajudaram na concretização deste estudo.

Obrigada!

*“Educação é uma descoberta progressiva de nossa própria ignorância.”*

***Voltaire***

*“A resposta certa não importa nada: o essencial é que as perguntas estejam certas.”*

***Mário Quintana***

## RESUMO

MONTELEONE, L.F. **Ativação do inflamassoma e a produção de IL-1 em macrófagos de camundongos selecionados para diferente capacidade inflamatória.** 2023. 131 f. Tese (Doutorado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Camundongos geneticamente selecionados para máxima (AIRmax) e mínima (AIRmin) resposta inflamatória aguda têm sido empregados em diversos estudos sobre fatores genéticos envolvidos no processo de inflamação. A partir de análises de associação e um sinal de linkage altamente significativo (LOD score = 72) entre SNPs e fenótipos de AIR avaliados durante a seleção e a produção de IL-1 $\beta$ , foi delimitada uma região em 128Mb (intervalo de 3.5Mb) no cromossomo 7, denominado locus Irm1. Após sequenciamento desta região, observou-se que PYCARD, responsável por codificar a proteína adaptadora ASC o qual é essencial no processamento de IL-1 $\beta$  e IL-18 após a ativação de inflamassomas, estava entre os genes que apresentaram polimorfismo. O objetivo deste estudo é caracterizar a influência da mutação encontrada no gene PYCARD através da produção de IL-1 $\beta$  por macrófagos nestes animais. Para isso, após estímulos como LPS e ATP, medimos os níveis de IL-1 $\beta$  secretada por ELISA e, enquanto AIRmax produz altos níveis de IL-1 $\beta$ , em AIRmin foram dosados níveis baixos ou a citocina não foi detectada. Após genotipagem, observamos que, em AIRmax, os alelos do gene PYCARD estão fixados em homozigose, mas AIRmin ainda apresentava polimorfismo. Através de acasalamentos assistidos por genotipagem, produzimos sublinhagens de AIRmin que expressam genótipos diferentes de PYCARD (CC, CT, TT) e vimos que esta variação genotípica não interferiu na modulação da resposta inflamatória aguda ao Biogel, uma vez que a diferença fenotípica de AIR se manteve, ou na produção de citocinas inflamatórias como IL-6, IP-10 e IFN- $\gamma$ . No entanto, ao dosarmos os níveis de IL-1 $\beta$  após ativação de diferentes inflamassomas, como NLRP3, NLRC4 e AIM2, vemos que a variação genotípica influencia na produção da citocina, uma vez que AIRmax<sup>CC</sup> e AIRmin<sup>CC</sup> liberaram altos níveis de IL-1 $\beta$ , enquanto em AIRmin<sup>TT</sup> a citocina não foi detectada. Também houve um aumento na quantificação das proteínas pró-IL-1 $\beta$  e ASC em BMDMs de AIRmax<sup>CC</sup> e AIRmin<sup>CC</sup> estimulados para ativação do NLRP3. Observamos também uma queda significativa no número de células viáveis em AIRmax<sup>CC</sup> após ativação por LPS + ATP, o que não ocorreu nas sublinhagens de AIRmin. Além disso, utilizando um substrato fluorométrico (YVAD-AFC),

analisamos a atividade da Caspase-1 e vimos que esta é significativamente menor em animais AIRmin homozigotos para o alelo mutado. Por microscopia confocal e citometria de fluxo (HCS e AMNIS) conseguimos demonstrar a formação de ASC *specks* e a presença de GSDMD e caspase-1 ativa no citosol celular após ativação do NLRP3 em macrófagos AIRmax<sup>CC</sup> e em AIRmin<sup>CC</sup>, este último com menor frequência. Já em AIRmin<sup>TT</sup> não foi possível identificar a formação dos *specks* ou um aumento significativo na quantidade de GSDMD. Nossos resultados sugerem que a troca de aminoácidos, ocasionada pelo polimorfismo de ocorrência natural encontrado em AIRmin, interfere na formação do agregado de moléculas ASC, provocando uma perda de habilidade da proteína de ativar diferentes tipo de inflamassoma. Além disso, a mutação não parece influenciar a produção de outras citocinas inflamatórias, onde podemos observar ainda uma grande influência do background genético heterogêneo das linhagens AIR.

**Palavras-chave:** PYCARD; ASC *speck*; inflamassoma; resposta inflamatória aguda; IL-1 $\beta$ ; AIRmax e AIRmin; Irm1

## ABSTRACT

MONTELEONE, L.F. **Inflammasome activation and IL-1 $\beta$  production in macrophages of mice selected for different inflammatory capacity**. 2023. 131 p. Ph.D These (Immunology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Mice genetically selected for maximum (AIR<sub>max</sub>) and minimum (AIR<sub>min</sub>) acute inflammatory response have been used in several studies on genetic factors involved in the inflammation process. Based on association analyzes and a highly significant linkage signal (LOD score = 72) between SNPs and AIR phenotypes evaluated during selection and IL-1 $\beta$  production, a 128Mb region (3.5Mb range) was delimited in the chromosome 7, called the Irm1 locus. After sequencing this region, it was observed that PYCARD, responsible for encoding the ASC adapter protein, which is essential in the processing of IL-1 $\beta$  and IL-18 after inflammasome activation, was among the genes that showed polymorphism. The objective of this study is to characterize the influence of the mutation found in PYCARD gene through the production of IL-1 $\beta$  by macrophages in these animals. For this, after stimuli such as LPS and ATP, we measured the levels of IL-1 $\beta$  secreted by ELISA and, while AIR<sub>max</sub> produces high levels of IL-1 $\beta$ , in AIR<sub>min</sub> low levels were measured or the cytokine was not detected. After genotyping, we observed that, in AIR<sub>max</sub>, PYCARD gene alleles were fixed in homozygosis, but AIR<sub>min</sub> still showed polymorphism. Through genotyping-assisted matings, we produced AIR<sub>min</sub> sublines that express different PYCARD genotypes (CC, CT, TT) and we saw that this genotypic variation did not interfere in the modulation of the acute inflammatory response to Biogel, since the phenotypic difference in AIR was maintained, or in the production of inflammatory cytokines such as IL-6, IP-10 and IFN- $\gamma$ . However, when measuring IL-1 $\beta$  levels after activation of different inflammasomes, such as NLRP3, NLRC4 and AIM2, we see that genotypic variation influences cytokine production, since AIR<sub>max</sub><sup>CC</sup> and AIR<sub>min</sub><sup>CC</sup> released high levels of IL-1 $\beta$ , while in AIR<sub>min</sub><sup>TT</sup> the cytokine was not detected. There was also an increase in the quantification of pro-IL-1 $\beta$  and ASC proteins in AIR<sub>max</sub><sup>CC</sup> and AIR<sub>min</sub><sup>CC</sup> BMDMs stimulated for NLRP3 activation. We also observed a significant drop in the number of viable cells in AIR<sub>max</sub><sup>CC</sup> after activation by LPS + ATP, which did not occur in AIR<sub>min</sub> sublines. Furthermore, using a fluorometric substrate (YVAD-AFC), we analyzed Caspase-1 activity and found that it is significantly lower in AIR<sub>min</sub> animals homozygous for the mutated allele. By confocal microscopy and flow cytometry (HCS and AMNIS) we were able to

demonstrate the formation of ASC specks and the presence of GSDMD and active caspase-1 in the cell cytosol after NLRP3 activation in AIRmax<sup>CC</sup> and AIRmin<sup>CC</sup> macrophages, the latter less frequently. In AIRmin<sup>TT</sup>, however, it was not possible to identify the formation of specks or a significant increase in the amount of GSDMD. Our results suggest that the amino acid exchange, caused by the naturally occurring polymorphism found in AIRmin, interferes with the formation of the aggregate of ASC molecules, causing a loss of the protein's ability to activate different types of inflammasomes. Furthermore, the mutation does not seem to influence the production of other inflammatory cytokines, where we can still observe a great influence of the heterogeneous genetic background of the AIR lineages.

**Keywords:** PYCARD; ASC speck; inflammasome; acute inflammatory reaction; IL-1 $\beta$ ; AIRmax e AIRmin; Irm1

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Número de leucócitos infiltrados no local da injeção de Biogel após 24h .....	51
<b>Figura 2</b>	Avaliação do teor de proteína após 24h .....	51
<b>Figura 3</b>	Avaliação do perfil celular da população de BMDMs por citometria de fluxo .....	52
<b>Figura 4</b>	Ensaio de ativação do inflamassoma NLRP3 .....	54
<b>Figura 5</b>	Concentração de IL-1 $\beta$ .....	54
<b>Figura 6</b>	Dosagem de IL-18 em BMDMs .....	55
<b>Figura 7</b>	Dosagem de IL-6 .....	56
<b>Figura 8</b>	Ativação e inibição do inflamassoma NLRP3 .....	58
<b>Figura 9</b>	IL-1 $\beta$ liberada no sobrenadante de PBMCs estimuladas com LPS+ATP .....	59
<b>Figura 10</b>	Avaliação da ativação do inflamassoma NLRP3 – NIG .....	61
<b>Figura 11</b>	Ativação do inflamassoma NLRC4 .....	62
<b>Figura 12</b>	Ativação dos inflamassomas NLRP3 e NLRC4 .....	63
<b>Figura 13</b>	Quantificação de IL-1 $\beta$ após ativação do AIM2 .....	65
<b>Figura 14</b>	Quantificação da proteína ASC .....	67
<b>Figura 15</b>	Quantificação da proteína NLRP3 .....	68
<b>Figura 16</b>	Quantificação da proteína pró-IL-1 $\beta$ .....	69
<b>Figura 17</b>	Ensaio Multiplex – NLRP3 .....	71
<b>Figura 18</b>	Ativação Caspase-1 .....	73
<b>Figura 19</b>	Viabilidade celular após ativação do inflamassoma .....	74
<b>Figura 20</b>	Avaliação de ASC <i>speck</i> – confocal .....	76
<b>Figura 21</b>	Avaliação de ASC <i>speck</i> – HCS .....	77
<b>Figura 22</b>	Estratégia de gating – ASC .....	78
<b>Figura 23</b>	Representação do fenótipo dos canais NEG; ASC .....	79
<b>Figura 24</b>	Representação do fenótipo dos canais FLIKA; FLIKA+ASC .....	80
<b>Figura 25</b>	Histogramas – FLICA+ASC .....	81
<b>Figura 26</b>	Estratégia de gating – GSDMD .....	83
<b>Figura 27</b>	Representação do fenótipo dos canais GSDMD; ASC .....	84
<b>Figura 28</b>	Histogramas – GSDM+ASC .....	85

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Sequência de primer do gene alvo .....	42
<b>Tabela 2</b>	Sequência das sondas <i>Taqman</i> .....	42
<b>Tabela 3</b>	Dosagem de IL-1 $\beta$ secretada por macrófagos de camundongos AIRmax e AIRmin estimulados com LPS seguido de ATP .....	48
<b>Tabela 4</b>	Genotipagem e análise dos alelos do gene PYCARD expressos em camundongos AIRmax e AIRmin .....	49



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**AIM2** – (*Absent in Melanoma 2*)

**AIR** – Resposta inflamatória aguda

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

**ATP** – Adenosina trifosfato

**BIR** – (*Baculovirus IAP repeat*)

**BMDMs** – Bone marrow-derived macrophage

**CAPS** – Síndromes periódicas associadas à criopirina

**CARD** – Domínio C-terminal recrutador e ativador de caspases

**cDNA** – DNA complementar

**DAMPs** – Padrões moleculares associados a danos

**DCs** – Células dendríticas

**DNA** – Ácido desoxirribonucleico

**FFM** – Febre Familiar do Mediterrâneo

**G-CSF** – Fator estimulador de colônias granulocitárias

**GM-CSF** – Fator estimulante de crescimento de granulócitos e macrófagos

**GPI** – Glicofosfatidil inositol

**GSDMD** – Gasdermina D

**GWA** – (*Genome wide linkage assay*)

**IFN-I** – Interferon tipo I

**IFN-Y** – Interferon gama

**IKK $\beta$**  – Quinase inibidora do fator nuclear kappa-B subunidade Beta

**I $\kappa$ B** – Proteína inibidora do fator nuclear kappa-B

**IL-1 $\beta$**  – Interleucina 1-beta

**IL-6** – Interleucina 6

**IL-18** – Interleucina 18

**IRFs** – (“*IFN-responsive factors*”)

**Irm1** – (*Inflammatory response modulator 1*)

**LPS** – Lipopolissacarídeos

**LRR** – (*Leucine-Rich Repeat*)

**LT** – Toxina letal anthrax

**MAL/TIRAP** – (*MyD88-adaptor like/TIR-associated protein*)

**MCS-F** – fator estimulante de colônias de macrófagos

**MyD88** – (*Myeloid differentiation primary-response protein 88*)

**NACHT** – Domínio central de ligação a nucleotídeos e oligomerização

**NF- $\kappa$ B** – fator nuclear kappa-B

**NLRs** – (*NOD-like receptors*)

**NLRP3** – (*nuclear oligomerization domain like receptor family pyrin domain containing 3*)

**NOD** – (*Nucleotide-binding oligomerization domain*)

**PAMPs** – Padrões moleculares associados a patógenos

**PRRs** – Receptores de reconhecimento de padrões moleculares

**PYD** – (*pyrin domain*)

**QTL** – (*quantitativ trait Loci*)

**RLRs** – (*Retinoic acid-inducible gene I-like receptors*)

**SARM** – (*Sterile  $\alpha$ - and armadillo-motif containing protein*)

**REL** - Proteínas celulares ligadoras de DNA encodificadas pelo gene REL

**RICK** – (*Receptor-interacting caspase-like apoptosis regulatory kinase*)

**RNA** – Ácido ribonucleico

**RT-PCR** – Reação em cadeia da polimerase em tempo real

**SFB** – Soro fetal bovino

**SNP** – Polimorfismo de nucleotídeo único

**TB** – Tuberculose

**TIR** – (*translocated intimin receptor*)

**TLRs** – (*Toll like receptors*)

**TNF- $\alpha$**  – Fator de necrose tumoral alfa

**TRAM** – (*Toll-receptor- associated molecule*)

**TRIF** – (*Toll- receptor-associated activator of interferon*)

**VEGF** – Fator de crescimento do endotélio vascular

**WB** – (*Western-blotting*)

## Sumário

1. INTRODUÇÃO .....	22
1.1. IMUNIDADE INATA E SEUS RECEPTORES .....	23
1.2. INFLAMASSOMA .....	25
1.3. LINHAGENS AIRMAX E AIRMIN .....	30
2. OBJETIVOS .....	36
<b>2.1. OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>37</b>
<b>2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>37</b>
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
3.1. Camundongos .....	39
3.2. Cultivo de células L929 para obtenção do fator de crescimento (MCS-F).....	39
3.3. Macrófagos (BMDMs) .....	39
PBMCs) .....	40
3.5. Análise fenotípica por Citometria de Fluxo .....	40
3.6. Extração de DNA.....	41
3.7. Genotipagem Taqman® por PCR em Tempo Real (RT-PCR).....	41
3.8. Avaliação da Produção de Citocinas .....	42
3.9. Multiplex Assay para Avaliação da Produção de Citocinas.....	43
3.10. Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS.....	44
3.11. Western Blot .....	45
3.12. Citometria de Fluxo com Imagem para avaliar a formação de ASC <i>speck</i> .....	45
3.13. Avaliação da viabilidade celular – MTT .....	46
3.14. Análise Estatística .....	46
4. CONCLUSÃO .....	47
5. REFERÊNCIAS .....	49
6. ANEXO.....	64

## **1. INTRODUÇÃO**

## 1.1. IMUNIDADE INATA E SEUS RECEPTORES

A imunidade inata é caracterizada principalmente pela sua capacidade de reconhecer padrões moleculares presentes ou não em vários patógenos, como vírus, bactérias e fungos, através de receptores chamados receptores de reconhecimento de padrões moleculares (PRRs) (MEDZHITOV & JANEWAY 1997, 2002; DAVIS *et al.*, 2011). Os PRRs reconhecem estruturas microbianas conservadas que foram denominadas de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e danos (DAMPs), que são expressos por muitos tipos celulares incluindo macrófagos, monócitos, células dendríticas (DCs), neutrófilos e células epiteliais, e permitem a detecção precoce de patógenos diretamente no local da infecção. Uma vez ativado, o sistema imune inato inicia a resposta inflamatória, secretando citocinas e quimiocinas, induzindo a expressão de moléculas de adesão e co-estimulação a fim de recrutar as células imunes para o local da infecção e para disparar a resposta imune adaptativa (JANEWAY, 1992; SCHENTEN & MEDZHITOV, 2011).

Os macrófagos possuem um papel crucial nas fases iniciais da resposta inflamatória. Dentre suas funções está a ligação da imunidade inata com a imunidade adaptativa por terem a capacidade de fagocitar, processar e apresentar os antígenos aos linfócitos T, também a remoção de células apoptóticas (ADEREM & UNDERHILL, 1999), resolução de processos inflamatórios (LEIBOVICH & ROSS, 1975), angiogênese (POLVERINE *et al.* 1977), reparo e remodelamento tissular (WERB & GORDON, 1975, MOSSER & EDWARDS, 2008).

A diferenciação de macrófagos depende inicialmente da formação de monócitos que ocorre na medula óssea. Monócitos são diferenciados a partir de células tronco hematopoiéticas precursoras (QURESHI *et al.* 1986). Os monócitos circulam na corrente sanguínea durante cerca de um a três dias e, em seguida, movem-se para os tecidos por todo o corpo. Constituem entre 3-8% dos leucócitos no sangue. Nos tecidos, monócitos maduros se diferenciam em vários tipos de macrófagos em variadas localizações anatômicas (TREMBICKI *et al.*, 1985). O processo de migração de monócitos, pela corrente sanguínea, para outros tecidos, permite a diferenciação em macrófagos. (QURESHI & DIETERT, 1995).

A injúria celular é percebida pelo sistema imune inato através de uma variedade de receptores, como NLRs ou receptores NOD like (*Nucleotide-binding oligomerization domain*), RLRs (*Retinoic acid-inducible gene I-like receptors*) e TLRs (*Toll like receptors*).

Os TLRs são glicoproteínas de membrana que são distribuídos diferencialmente, podendo estar acoplados à membrana plasmática, como TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR10 (expressos somente em humanos) e, TLR11, TLR12 e TLR13 (expressos somente em camundongos) ou associados às vesículas endossomais e retículo endoplasmático, como TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9, e podem reconhecer diversos PAMPs provenientes de bactérias, vírus, protozoários e fungos (KAWAI & AKIRA, 2007). Os ligantes melhor caracterizados são peptidoglicanos e lipoproteínas bacterianas, âncoras de GPI (glicofosfatidil inositol) presentes em protozoários e zimozan presente em fungos (ligantes de TLR2), RNA dupla-fita, comuns em vírus (ligante de TLR3), lipopolissacarídeos (LPS) presentes na parede de bactérias gram-negativas (ligante do TLR4), flagelina presente em bactérias móveis (ligante de TLR5) e seqüências de DNA ricas em CpG não metilados, presentes em bactérias e vírus (ligante de TLR9) (KAWAI & AKIRA, 2010).

A ativação dos TLRs por seus ligantes leva à dimerização do receptor e ao recrutamento de proteínas adaptadoras específicas como MyD88 (*Myeloid differentiation primary-response protein 88*), MAL/TIRAP (*MyD88-adaptor like/TIR-associated protein*), TRIF (*Toll-receptor-associated activator of interferon*), TRAM (*Toll-receptor-associated molecule*) ou SARM (*Sterile  $\alpha$ - and armadillo-motif containing protein*) (CARTY *et al.*, 2006), que irão transduzir o sinal do TIR, ativando quinases e fatores de transcrição como NF- $\kappa$ B (*Nuclear factor kappa enhancer binding protein*) e IRFs (*IFN-responsive factors*) (BURCKSTUMMER *et al.*, 2009). Além disso, os TLRs sinergizam com outros receptores da imunidade inata, sendo esta interação importante para a condução da resposta imune adaptativa (KAWAI & AKIRA, 2010).

Além dos TLRs, outra grande família de receptores tem como característica a localização no citosol celular, a família dos NLRs (*NOD-like receptors*). Os receptores NLRs possuem três domínios, sendo a região efetora variável N-terminal, podendo conter domínios do tipo CARD (*Caspase activation and recruitment domain*), PYD (*pyrin domain*) ou BIR (*Baculovirus IAP repeat*); um domínio intermediário requerido para ligação de nucleotídeos e auto oligomerização chamado NACHT e a região C-terminal formada por um domínio de repetições ricas em leucina (*Leucine-Rich Repeat – LRR*) que parece ser responsável pelo reconhecimento dos PAMPs (TING *et al.*, 2008). O domínio CARD presente em alguns membros da família permite o recrutamento e ativação da caspase-1 e da serina-treonina quinase RIP2, também chamada de RICK (*Receptor-interacting caspase-like apoptosis regulatory kinase*) (FRITZ *et*

*al.*, 2006; KUFER, 2008; SCHRODER & TSCHOPP, 2010). No entanto, os NLRs que possuem domínios PYD ou BIR ao invés de domínios CARD, necessitam interagir com outras moléculas para induzir a ativação da caspase-1.

A ativação dos NLRs ocorre a partir do reconhecimento de PAMPs, o qual induz a oligomerização da molécula, através do domínio NATCH, permitindo a aproximação das porções N-terminais e, então o recrutamento de moléculas adaptadoras, quando necessário, para a ativação (SCHRODER & TSCHOPP,; MARTINON *et al.*, 2009). Após ativação, NOD1 e NOD2, membros da família dos NLRs, iniciam uma resposta pró-inflamatória dependente da ativação de NF- $\kappa$ B (INOHARA *et al.*, 1999), através do recrutamento de RIP2, a partir de interações CARD- CARD, essencial para a ativação deste fator de transcrição. Dessa maneira, após o reconhecimento de PAMPs no citosol, estes receptores iniciam uma cascata de sinalização intracelular que culmina na transcrição de inúmeros genes pró-inflamatórios de maneira semelhante à resposta dos TLRs.

Outros membros da família dos NLRs estão envolvidos na ativação de caspases inflamatórias como a caspase-1 e a caspase-11. Esses membros dos NLRs formam múltiplos inflamassomas, conferindo especificidade de reconhecimento para um produto particular microbiano (MARTINON *et al.*, 2009).

## **1.2. INFLAMASSOMA**

Inflamassomas são complexos multiproteicos citoplasmáticos compostos por um receptor intracelular ou AIM2, por uma molécula adaptadora (CARDINAL/CARD8 ou ASC/PYCARD) e por enzimas como a caspase-1. A ação desses complexos proteicos é desencadeada pela imunidade inata, primariamente por células fagocíticas como macrófagos, células dendríticas e neutrófilos. Os principais receptores intracelulares associados com a formação do inflamassoma são NALP1/NLRP1, NALP3/NLRP3 e IPAF/NLRC4 da família NLR e AIM2 da família das proteínas PYHIN.

Para ativação do inflamassoma NLRP3, são necessários dois sinais: indução transcripcional do NLRP3 mediado pela via do NF- $\kappa$ B, induzida por ligantes de TLRs e NODs ou citocinas inflamatórias e um agonista para induzir sua oligomerização. São vários os estímulos conhecidos capazes de ativar NLRP3, incluindo materiais cristalinos ou particulados



(cristais de ácido úrico, abestos, alum) (MARTINON *et al.*, 2006; DOSTERT *et al.*, 2008), sinalização de ATP através do receptor P2X7 (MARIATHASAN *et al.*, 2006), infecções virais (ICHINOHE *et al.*, 2009), produtos de fungos (JOLY & SUTTERWALA, 2010), RNA e DNA bacterianos (MURUVE *et al.*, 2008; SANDER *et al.*, 2011; KANNEGANTI *et al.*, 2006), numerosas toxinas bacterianas e proteínas efetoras e protozoários (LIMA-JUNIOR *et al.*, 2013; GONÇALVES *et al.*, 2013). Embora distintos estruturalmente, muitos produtos bacterianos que ativam o NLRP3 (nigericina, listeriolisina, hemolisinas) compartilham a atividade de formação de poros na membrana, sugerindo que este “padrão de patogênese” é detectado pelo inflamassoma NLRP3. Desta forma, dado a variedade de agonistas do NLRP3, postula-se que estes agonistas não ajam diretamente como ligantes deste receptor, mas ao invés disso, induzem distúrbios nas células e estresse celular, os quais são sentidos pelo inflamassoma NLRP3 (VANCE *et al.*, 2009). A maneira pela qual o NLRP3 detecta estresse celular e quais são as vias que ativam o NLRP3 e a formação do inflamassoma ainda não foram totalmente elucidadas, mas parecem incluir vias de sinalização ascendente como efluxo de íons de potássio (K<sup>+</sup>) ou íons de cloreto (Cl<sup>-</sup>), influxo de íons de cálcio (Ca<sup>2+</sup>), ruptura lisossômica, disfunção mitocondrial, alterações metabólicas e desmonte da rede trans-Golgi (SWANSON *et al.*, 2019).

Diferente da maioria dos inflamassomas, o inflamassoma AIM2 requer um “*priming*” transcripcional, induzido pela ativação do receptor de IFN-I (interferon tipo I). Esta via de ativação foi descrita a partir de estudos que mostraram a ativação da caspase-1 em resposta à infecção por *Francisella tularensis*, a qual requereu a sinalização do receptor de IFN-I, mas não de outras vias conhecidas dos inflamassomas (HENRY *et al.*, 2007). Com base na ativação da caspase-1, os autores postularam a existência de um inflamassoma que poderia reconhecer DNA de fita dupla, liberado no citosol celular durante infecções (MURUVE *et al.*, 2008). Além disso, é o único inflamassoma pelo qual a interação direta do ligante ao receptor foi visualizada em células infectadas (JONES *et al.*, 2010; FERNANDES *et al.*, 2010) ou analisadas por cristalografia (JIN *et al.*, 2012). Como ocorre com os outros inflamassomas, a desregulação da resposta do inflamassoma AIM2 pode contribuir para o desenvolvimento de doenças autoimunes, inflamatórias e câncer. Estudos recentes demonstraram que a detecção de DNA próprio por AIM2 é um fator importante nas doenças decorrentes de alteração da homeostase celular que levam a perda da integridade da membrana nuclear, como infecções virais, laminopatias e câncer (LUGRIN & MARTINON, 2018)

Ambos os inflamassomas NLRP3 e AIM2 possuem o domínio N-terminal do tipo PYD, e por isso não conseguem ativar diretamente a caspase-1, sendo necessário recrutar a molécula adaptadora ASC, via seu domínio PYD. ASC, por sua vez, contém um domínio C-terminal recrutador e ativador de caspases (CARD) que se liga e recruta a pró-caspase-1, via interações CARD-CARD (MARTINON & TSCHOPP, 2007). Já os inflamassomas NLRP1 e NAIP/NLRC4 possuem o domínio N-terminal do tipo CARD, podendo recrutar ASC. Desta forma, o complexo inflamassoma pode ou não conter ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*) é uma proteína codificada pelo gene PYCARD que age como a adaptador central, e em alguns casos indispensável, para formação de inflamassomas. Em um processo desencadeado pela ativação dos receptores de inflamassoma, formam-se agregados de ASC que agem como uma plataforma supramolecular de sinalização denominada *ASC speck* (HOSS 2016). Os *ASC specks* podem ativar diretamente a caspase-1 no meio extracelular, bem como dentro da célula após serem internalizados por fagócitos, desencadeando uma cascata inflamatória (FRANKLIN *et al.*, 2014). Estudos recentes identificaram o mecanismo de sinalização através da polimerização prion-like de ASC, como um mecanismo de ativação na imunidade inata, presente não apenas em doenças, mas também em condições não patogênicas. A formação desses agregados funcionais de ASC através da polimerização e propagação prion-like gera uma resposta mais potente e rápida, atributos essenciais para a eficiência da imunidade inata (O'CARROL *et al.*, 2020). A interação entre o *ASC speck* e a imunidade adaptativa ainda é pouco explorada. No entanto, um possível elo entre os sistemas imunológicos inato e adaptativo pode ser encontrado no papel do ASC na apresentação de antígenos. Proteínas citosólicas tendem a se agregar no *ASC speck*, aparentemente com base em interações hidrofóbicas não específicas. Durante a infecção intracelular, proteínas antigênicas podem co-agregar com os *ASC specks*, e a liberação desse complexo no espaço extracelular favoreceria a apresentação de antígenos. (SAHILLIOGLU & OZOREN, 2020). Diferente de NLRP3 e AIM2 o inflamassoma NAIP/NLRC4 não depende de ASC para ativar a caspase-1, porém a presença de ASC amplifica sua atividade através da indução do auto processamento da caspase-1 e da secreção de IL-1 $\beta$  e IL-18 (VAN OPDENBOSCH *et al.*, 2014). NLRC4 interage primariamente com dois componentes de bactérias patogênicas: flagelos (envolvido no sistema de locomoção das bactérias) e proteínas dos sistemas III e IV de secreções bacterianas, que são responsáveis por injetar fatores de virulência na célula hospedeira. Consequentemente, NLRC4 é um componente crítico da defesa contra patógenos intracelulares facultativos, como *Salmonella*

*Typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia thailandensis* e *Legionella pneumophila* (LAMKAN & DIXIT, 2014).

Em relação à NLRP1, o mecanismo de ativação não está completamente elucidado. Sabe-se que este inflamassoma reconhece a toxina letal anthrax (LT) (BOYDEN & DIETRICH, 2006), principal fator de virulência da *Bacillus anthracis*, porém sua ativação requer uma atividade proteolítica da LT e não apenas o reconhecimento da toxina sozinha, uma vez que a LT cataliticamente inativa não induz piroptose (FINK *et al.*, 2008; KLIMPEL *et al.*, 1994). Estudos posteriores confirmaram que a LT é capaz de clivar o NLRP1 diretamente e essa clivagem é suficiente e necessária para ativação da caspase-1 induzida por NLRP1 (BROZ & DIXIT, 2016). Recentemente foi elucidado que proteases microbianas e condições de estresse celular pouco caracterizadas também são responsáveis pela ativação de NLRP1 (TSU *et al.*, 2021).

Os inflamassomas operam por meio de uma cascata de ativação finalizando na maturação proteolítica de moléculas precursoras biologicamente inativas da família da citocina IL-1 $\beta$  e a liberação de citocinas ativas do citosol de células (KARMAKAR *et al.*, 2016; SAGOO *et al.*, 2016; VAN HAUWERMEIREN & LAMKANFI, 2016). As moléculas pró IL-1 $\beta$  são produzidas a partir da ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B. O fator de transcrição NF- $\kappa$ B tem ação descrita em diversas células que compõem os organismos complexos, apresentando uma gama de ação superior a todos os fatores de transcrição até então descritos. Isto se deve aos variados estímulos que o ativam, bem como aos inúmeros genes e fenômenos que o NF- $\kappa$ B regula. Dentre estes estímulos estão os neurotransmissores (tais como o glutamato), neurotrofinas, proteínas neurotóxicas (como a beta-amilóide), citocinas (IL-1 e fator de necrose tumoral), glicocorticoides, produtos provenientes de vírus e bactérias, irradiação ultravioleta, produtos de reações de enzimas como a óxido nítrico sintase induzível, entre outros. (SENFTLEBEN *et al.*, 2001).

A ativação do NF- $\kappa$ B é representada por duas vias principais, sendo a via canônica, baseada na degradação de I $\kappa$ B, principalmente por IKK $\beta$  e, essencial para imunidade inata (SENFTLEBEN *et al.*, 2001) e a via não canônica, que está envolvida no desenvolvimento de órgãos linfóides e na imunidade adaptativa (SENFTLEBEN *et al.*, 2001). Uma vez no núcleo, os dímeros são sujeitos à regulação, principalmente através da fosforilação de proteínas Rel, a qual é requerida para a indução completa de genes alvos de NF- $\kappa$ B (ZHONG *et al.*, 1997).

Quando não estimulado, o fator NF- $\kappa$ B encontra-se no citoplasma ligado a uma proteína inibitória: o I $\kappa$ B. O complexo NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B impede a translocação do NF- $\kappa$ B para o núcleo, mantendo o mesmo inativado. Dessa forma, a fosforilação e a degradação do I $\kappa$ B são necessárias para que ocorra o transporte do NF- $\kappa$ B para o núcleo. Isso ocasiona um aumento na expressão dos genes-alvo do NF- $\kappa$ B, os quais agem em elementos envolvidos na resposta inflamatória e imune, estimulando a transcrição (BAEUERLE *et al.*, 1996; BALDWIN, 1996).

A molécula pró IL-1 $\beta$  permanece biologicamente inativa enquanto não houver uma clivagem pela caspase-1 ativa no interior das estruturas dos inflamassomas, produzindo a IL-1 $\beta$  (THORNBERRY *et al.*, 1992). A caspase-1 é uma cisteíno-protease, expressa no citosol como um zimógeno inativo de 45 kDa e a associação da pró-caspase-1 com o complexo inflamassoma permite o seu processamento e ativação (MARTINON & TSCHOPP, 2007). Assim, após o recrutamento para o interior da estrutura do inflamassoma, a pró-caspase-1 sofre auto-ativação por clivagem proteolítica tornando-se um heterodímero enzimaticamente ativo. Uma vez ativa, a caspase-1 medeia o processamento e ativação das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  e IL-18. Além da clivagem, a caspase-1 também é responsável pela clivagem de IL-1 $\beta$  na forma ativa para se ligar ao receptor (FANTUZZI & DINARELLO, 1999).

A IL-1 $\beta$  é um dos importantes mediadores da inflamação, a produção desta citocina pode ser avaliada experimentalmente por estimulação *ex vivo* de leucócitos circulantes com LPS via TLR4 (Toll-like receptor 4) seguido por ATP. ATP é requerido para a liberação rápida de IL-1 $\beta$  pela ativação do receptor purinérgico P2X7 por monócitos ativados por LPS, este acelera o processamento e secreção de IL-1 $\beta$  pela ativação do complexo enzimático, inflamassoma Nlrp3/PYCARD/caspase-1 (PICCINI *et al.*, 2008).

Algumas doenças inflamatórias, como a Febre Familiar do Mediterrâneo (FFM) e as síndromes periódicas associadas à criopirina (CAPS), são síndromes monogênicas de herança mendeliana associadas a alterações em genes envolvidos com o inflamassoma. A FFM é uma síndrome de herança autossômica recessiva, decorrente de variantes patogênicas em homozigose ou heterozigose composta no gene MEFV. As CAPS são síndrome de herança autossômica dominante associadas a variantes patogênicas em heterozigose no gene NLRP3 (HOFFMAN & BRODERICK, 2016). No entanto, a maioria das doenças inflamatórias não tem um mecanismo mendeliano de herança, e a procura por uma etiologia genética é mais complexa. Polimorfismos em genes envolvidos com o inflamassoma, como NLRP1, NLRP3 e AIM2

também têm sido associados a diversas doenças inflamatórias, autoimunes e neurodegenerativas.

Polimorfismos em *NLRP1*, gene localizado no braço curto do cromossomo 17 na região 13.2 (17p13.2) em seres humanos, mas que em camundongos é expresso por três genes homólogos (*Nlrp1a*, *Nlrp1b* e *Nlrp1c*) (Jin *et al.*, 2007), estão associados a condições inflamatórias como o vitiligo (JIN *et al.*, 2007) e lúpus eritematoso sistêmico (PONTILLO, 2012). Em 2020, um estudo por DUTRA e colaboradores identificou o NLRP1 como um possível gene modificador para a doença falciforme e certas variantes do NLRP1, como rs11651270, parecem ter um efeito epistático significativo no desenvolvimento de doença hepática e nefropatia em pacientes com essa patologia. (DUTRA *et al.*, 2020)

Já o gene NLRP3 está localizado no braço longo do cromossomo 1 (1q44) e vários de seus polimorfismos também foram associados a doenças inflamatórias/ autoimunes, tais como psoríase (CARLSTROM *et al.*, 2012), diabetes tipo 1 (PONTILLO *et al.*, 2010), doença celíaca (PONTILLO *et al.*, 2011), e mais recentemente a esclerose múltipla (PONTILLO *et al.*, 2019). Polimorfismos em NLRP3, como a variante de ganho de função Q705K (rs35829419), que levam a ativação de NLRP3 principalmente através da produção de IL-1 $\beta$ , são considerados fator de risco para formas mais graves da esclerose múltipla (SOARES *et al.*, 2019). Estudos mais recentes também elucidaram o papel dos inflamassomas NLRP3 e AIM2 na defesa contra a Tuberculose (TB). O NLRP3 e o AIM2 desempenham um papel fundamental no primeiro contato hospedeiro/micobactéria e são importantes na resposta dos macrófagos contra a *Mycobacterium tuberculosis*. Os polimorfismos NLRP3 (rs10754558) e AIM2 (rs1103577) representam fatores protetores contra a suscetibilidade à TB, sendo mais frequente em controles do que em pacientes (SOUZA *et al.*, 2020; FIGUEIRA *et al.*, 2021).

### 1.3. LINHAGENS AIRMAX E AIRMIN

Para estudar a resposta inflamatória e seu controle genético, os pesquisadores do laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan desenvolveram, há vários anos, duas linhagens heterogêneas de camundongos que se diferenciam significativamente na capacidade de desenvolver uma resposta inflamatória aguda à injeção subcutânea de microesferas de poliacrilamida (Biogel P-100) – os camundongos AIRmax e AIRmin (IBAÑEZ *et al.*, 1992; STIFFEL *et al.*, 1990).

Estas linhagens de camundongos foram selecionadas para os fenótipos de máxima (AIRmax) ou mínima (AIRmin) reação inflamatória aguda a partir de uma população de camundongos geneticamente heterogêneos (F0), resultante de acasalamentos equilibrados entre oito linhagens isogênicas (A/J, BALB/c, C57BL/6J, CBA/J, DBA/2J, P/J, SJL/J e SWR/J), híbridos F1 e segregantes F2.

O processo de seleção foi baseado nas características fenotípicas individuais dos animais da população F0. Assim, foram escolhidos os animais que apresentavam alta ou baixa reatividade inflamatória aguda, de acordo com o número de leucócitos infiltrados e o teor do extravasamento de proteínas em resposta à injeção subcutânea no dorso do animal de Biogel (esferas de poliacrilamida). Os acasalamentos foram repetidos em gerações consecutivas até que fosse observada uma máxima separação fenotípica entre as duas linhagens. Nesse ponto, foi observada a conservação dos fenótipos extremos, o que indica que os alelos dos genes relacionados ao controle de AIR fixaram-se em homozigose em cada linhagem, entretanto, se manteve um fundo genético heterogêneo (IBAÑEZ *et al.*, 1992; STIFFEL *et al.*, 1990).

Houve um aumento progressivo da diferença fenotípica entre as duas linhagens durante o processo seletivo, o que indica que este caráter é quantitativamente regulado pela interação aditiva de vários genes que segregam independentemente e cujos alelos de efeito de máxima e mínima reatividade inflamatória foram acumulados progressivamente durante o processo da seleção. Por métodos de genética quantitativa, foi estimada a participação de 7 a 11 loci gênicos independentes na regulação da AIR (BIOZZI *et al.*, 1998).

A diferença no número de leucócitos migrantes ao sítio de injeção do Biogel entre as duas linhagens é de aproximadamente 20 vezes a favor da linhagem AIRmax, sendo as células predominantes no exsudato os neutrófilos. A resposta imune específica dos camundongos AIRmax e AIRmin não parece ter sido afetada pelo processo seletivo, uma vez que estas linhagens produziram níveis equivalentes de anticorpos contra antígenos naturais complexos, e as reações de hipersensibilidade tardia a eritrócitos nas duas linhagens foram similares (ARAÚJO *et al.*, 1998).

Porém, um dos fenótipos que diferencia os animais AIRmax e AIRmin é a resistência a infecções por patógenos intracelulares, uma vez que camundongos AIRmax são significativamente mais resistentes mostrando uma DL50 na ordem de 1000, 100 e 50 vezes

maiores do que nos animais AIRmin para, respectivamente, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli*. Esta maior resistência dos AIRmax está diretamente relacionada à sua habilidade em controlar o crescimento bacteriano no baço, à resposta inflamatória local e à produção de citocinas (ARAÚJO *et al.*, 1998).

Com isso, estes animais também vêm sendo estudados com relação a diversos aspectos da imunidade, dos quais: mecanismos inflamatórios e imunes que interferem no desenvolvimento de doenças autoimunes como artrite experimental produzida por óleo mineral, sendo os AIRmax que apresentam uma maior predisposição a desenvolver artrite (VIGAR *et al.*, 2000). Em relação à capacidade em desenvolver tumores induzidos quimicamente, a linhagem AIRmax apresenta uma maior resistência ao desenvolvimento de tumores cutâneos induzidos do que os AIRmin, tanto em multiplicidade quanto em incidência. O mesmo acontece em relação a metástase, desenvolvidas após transplantes de células de melanomas, onde os camundongos AIRmin apresentaram um maior número de metástases do que os animais AIRmax (MARIA *et al.*, 2001).

Outros estudos de associação fenotípica entre patologias e intensidade de reatividade inflamatória foram feitos e foi demonstrado que genes reguladores da inflamação aguda podem estar também envolvidos no controle da resistência ou susceptibilidade a infecções ou neoplasias (BIOZZI *et al.*, 1998; DI PACE *et al.*, 2006; MARIA *et al.*, 2003; RIBEIRO *et al.*, 2005).

Neste modelo de seleção genética para diferente capacidade inflamatória pode-se observar uma diferença entre as duas linhagens selecionadas na produção de IL-1 $\beta$  pela estimulação do inflamassoma em ensaio *in vitro* de estimulação de leucócitos sanguíneos com LPS seguido de ATP (LABASI *et al.*, 2002). Os AIRmax produzem níveis muito altos de IL-1 $\beta$ , enquanto os AIRmin secretam muito pouco da citocina ou são não respondedores. Com isso, estudos de nosso laboratório têm focado na pesquisa dos genes implicados na diferenciação das duas linhagens em relação à resposta inflamatória empregando métodos de genética molecular. Realizamos ensaios de co-segregação no genoma (GWA, *genome wide linkage assay*) de marcadores de polimorfismo de base única de DNA (SNP para *single nucleotide polymorphism*) com fenótipos de inflamação em populações heterogêneas de animais, resultantes do intercruzamento das duas linhagens. Estas populações são produzidas pelo intercruzamento de híbridos F1 (AIRmax x AIRmin) para gerar grandes populações de F2

(F1 x F1), onde ocorre a segregação Mendeliana dos vários alelos gênicos presentes nas linhagens parentais, com efeito de alta ou baixa resposta inflamatória.

Camundongos parentais AIRmax e AIRmin, F1 (AIRmax x AIRmin) e 690 F2 (F1 x F1) foram analisados para fenótipos relacionados à resposta inflamatória, retirada uma alíquota de sangue para dosagem da produção de IL-1 $\beta$  *ex vivo*, em seguida receberam Biogel para análise de AIR. A genotipagem foi feita pela plataforma 1449-plex Illumina® SNP *arrays* em DNA genômico extraído de todos os animais. Por análise de associação (*linkage*) destes fenótipos com genótipos dos SNPs, foram mapeadas 6 regiões significativamente relacionados com a resposta inflamatória nos cromossomos 4, 5, 6, 7, 11 e 13 (GALVAN *et al.*, 2010), dois com associação à tumorigênese pulmonar, nos cromossomos 6 (locus Pas1, *Pulmonary adenoma susceptibility 1*), e 18 (MARIA *et al.*, 2003; GALVAN *et al.*, 2010) e um associado à incidência de tumores de rim no cromossomo 17 (locus Rtm1, *Renal tumor modifier 1*) (JENSEN *et al.*, 2013). Dentre estes, foi destacado um dos loci que regulam a AIR: Irm1 para *Inflammatory response modulator 1* a 128 Mb no cromossomo 7 (VORRARO *et al.*, 2010), que controla o número de células infiltradas (LOD score=8.7) nos exsudatos inflamatórios induzidos pela injeção do Biogel, a concentração de IL-6 nestes exsudatos (LOD score=15.6) e a produção de IL-1 $\beta$  *ex vivo* por estímulo do inflamassoma (LOD score=71). Ressalta-se que o limiar estatístico de LOD score, (que mede a probabilidade de um marcador estar em *linkage* com o gene que regula o fenótipo) para significância ao nível de  $\alpha < 0.05$  para os diferentes fenótipos analisados nesta população é de ao redor de 3.6.

Os trabalhos de nosso grupo com os animais selecionados para a resposta inflamatória conseguiram restringir a região do cromossomo 7 no locus Irm-1 responsável pelo fenótipo de capacidade inflamatória e secreção de IL-1 $\beta$ . Foi então realizado o sequenciamento (*Next Generation Sequencing*) desta região cromossômica em DNA genômico extraído de 8 camundongos F2 (AIRmax x AIRmin) com alta secreção de IL-1 $\beta$  e de 8 com baixa produção dessa citocina. Escolhendo-se nos dados completos, apenas as variantes de sequência (SNP) com desequilíbrio de frequência altamente significantes entre os 2 grupos, foi delimitada uma região de cerca de 421 Kb entre 127.993 e 128.414 Kb no cromossomo 7 contendo 14 SNPs. Das 14 variantes detectadas, 6 situam-se em regiões gênicas. Dos genes situados no locus Irm-1, alguns apresentaram polimorfismos, como o gene PYCARD ou ASC, que codifica uma



proteína adaptadora envolvida no processamento das citocinas IL-1 $\beta$  e IL-18 pelos inflamassomas. Uma mutação nessa proteína poderia prejudicar sua função.

Um artigo publicado por BORREGO *et al* em 2022 investigou o papel dos genes situados no locus *Irm-1* na modulação da ativação do inflamassoma para e a produção de IL-1 $\beta$  em resposta a vários estímulos. Comparando as linhagens AIRmax e AIRmin foi identificado que o SNP C 127.993.599 T (E19K) no gene PYCARD prejudicou a produção de IL-1 $\beta$  e a formação do ASC *speck* na linhagem AIRmin. O silenciamento do gene BC017158 levou a redução da produção de IL-1 $\beta$ , e um SNP identificado em sua região intrônica foi apontado como um possível modulador dos níveis de expressão da proteína ou como determinante na produção de uma isoforma. O gene PYCARD já tinha sido descrito anteriormente como um gene candidato a modulador da resposta inflamatória em um estudo por RITCHEY *et al* (2021) que utilizando macrófagos derivados de medula óssea das linhagens de camundongos DBA/2 e AKR identificou um polimorfismo de um nucleotídeo único (SNP) na região 3' UTR do gene PYCARD (rs33183533) como sendo um modulador da resposta inflamatória (denominado locus *Irm3*) tendo como mecanismo a alteração do turnover de mRNA (RITCHEY *et al.*, 2021). AKR não fazia parte das 8 linhagens que formaram a população inicial do processo de seleção das linhagens AIRmax e AIRmin, porém os resultados desse outro estudo corroboram a importância do gene PYCARD para a ativação do inflamassoma e para a produção de IL-1 $\beta$ .

BORREGO *et al* (2022) também identificou outros genes que apresentaram variações possivelmente significativas em *Irm-1*. Variantes intrônicas foram detectadas no gene *Irgam*, que já está descrito como um polimorfismo de grande risco para lúpus eritematoso sistêmico (SLE) em humanos. O gene *Rgs10* também apresentou polimorfismo, e expressões aberrantes desse gene ou mutações em suas proteínas têm sido associadas na literatura a doenças como o câncer e doenças autoimunes (BORREGO *et al.*, 2022). Em outro estudo, por CORREA *et al* (2018) as linhagens AIRmax e AIRmin foram utilizadas para caracterizar a resposta imune e o impacto do genótipo em quadros de artrite induzida por pristane (PIA). Foi observado que camundongos da linhagem AIRmax apresentaram um perfil de resposta celular exacerbado (altos níveis de IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10, IgG3, e citocinas) enquanto os da linhagem AIRmin apresentaram um controle mais eficiente da resposta celular durante a progressão da

artrite, sugerindo que mecanismos imunes celulares e genéticos em AIRmax contribuíram para um nível mais intenso de danos a cartilagem e a maior gravidade da PIA.

Os resultados desses diferentes estudos do nosso grupo utilizando a linhagem AIRmax e AIRmin sugerem que os genes no locus *Irm1* são potenciais alvos terapêuticos para o tratamento de doenças inflamatórias. Além disso, o estudo fornece insights sobre os mecanismos moleculares subjacentes à ativação do inflamassoma e à produção de IL-1 $\beta$ , o que poderia levar ao desenvolvimento de novos tratamentos para doenças inflamatórias

Neste projeto desenvolvemos um ensaio funcional para avaliar o fenótipo de ativação do inflamassoma através da produção de IL-1 $\beta$  por macrófagos derivados da medula óssea destes animais, para então correlacionarmos e confirmarmos a função do gene *PYCARD* na ativação ou não do inflamassoma e para observarmos se os diferentes alelos presentes nos animais AIRmax e AIRmin induzem uma variação na secreção das citocinas.

## **2. OBJETIVOS**

## 2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo é caracterizar a influência da mutação encontrada no gene PYCARD, avaliando o fenótipo de ativação do inflamassoma através da produção de IL-1 $\beta$  por macrófagos e, correlacionar com outros fenótipos da inflamação presentes nas linhagens AIRmax e AIRmin

## 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar nas linhagens AIRmax<sup>CC</sup>, AIRmin<sup>CC</sup> e AIRmin<sup>TT</sup>:

- A influência do polimorfismo do gene PYCARD no fenótipo de ativação dos inflamassomas NLRP3, AIM2, NLRC4
- A presença da caspase-1 ativa, e a produção de IL-1 $\beta$  e IL-18 após diferentes estímulos.
- A presença de ASC specks após a ativação do inflamassoma NLRP3.
- A produção de citocinas inflamatórias não relacionadas com a ativação do inflamassoma.
- A ocorrência do processo de piroptose após ativação do inflamassoma NLRP3.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

### 3.1. Camundongos

Foram utilizados camundongos AIRmax, AIRmin e sublinhagens AIRmin homozigotas para o alelo ASC WT (AIRmin E19/E19) e para o alelo mutado do ASC (AIRmin E19K/E19K). Estes animais são produzidos por cruzamentos assistidos por genotipagem e mantidos no biotério do laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan sob condições padrão de criação, com ração e água *ad libitum* e em ciclo claro/escuro de 12 horas.

### 3.2. Cultivo de células L929 para obtenção do fator de crescimento (MCS-F)

A linhagem L929 são fibroblastos originados de camundongos e que possuem a capacidade de secretar o fator estimulante de colônias de macrófagos (MCS-F) em seu sobrenadante. Para a obtenção deste sobrenadante, as células foram cultivadas em meio R10 (RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 40mg/mL de gentamicina e 1% de glutamina) por sete dias a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Após esse período, o sobrenadante contendo MCS-F foi centrifugado por 10 minutos a 1600rpm, para retirar os debris celulares, e conservado a -20°C até o momento do uso.

### 3.3. Macrófagos (BMDMs)

Macrófagos derivados de células de medula óssea (BMDMs) foram obtidos de acordo com o protocolo descrito por Zamboni e Rabinovitch (2003) com modificações. As células da medula óssea são coletadas de fêmures, isoladas por perfusão e então cultivadas a 5x10<sup>6</sup> células em 2 mL/well de meio R10/30 (RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB, 40mg/mL de gentamicina, 1% de glutamina e 30% de LCCM (meio condicionado de células L929) como fonte de M-CSF) em placas de cultura de 6 wells a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. No quarto dia, o meio foi trocado por mais 2 mL de R10/30 em cada poço, para que no sétimo dia os macrófagos fossem coletados pela lavagem da placa com PBS gelado.

As células foram contadas e acertadas para 1x10<sup>6</sup>/mL e então foram plaqueadas em meio R10 (RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB, 40mg/mL de gentamicina e 1% glutamina) e cultivadas a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> por 24h. Após este período as células foram estimuladas para ativação do inflamassoma. Foram usados como estímulos: LPS (1µg/mL) por 3, 4 e 24 horas,

ATP (5mM) por 30 minutos e 1 hora, Nigericina (10 $\mu$ M) por 2 horas, Flagelina (5 $\mu$ g/mL) por 2 horas e Poly dA:dT (1 mg/mL) por 24 horas. O poly dA:dT foi previamente diluído em meio DMEM (*Gibco*) e incubado com Lipofectamina 2000 (Thermofisher), diluída em meio DMEM de acordo com as instruções do fabricante, por 30 minutos em TA. Além disso, também utilizamos os inibidores de NLRP3 MCC950 (10 $\mu$ M), adicionado previamente ao LPS na cultura por 30 minutos e do receptor PXR7 (P2X7) (10 $\mu$ M). O sobrenadante foi coletado para dosagem de citocinas e armazenado a -20°C.

#### **3.4. Células mononucleares do sangue periférico (*Peripheral Blood Mononuclear Cells* – PBMCs)**

Para medir a produção de IL-1 $\beta$  *ex-vivo*, amostras de sangue foram coletadas do plexo retro-orbital por meio de pipeta Pasteur embebida em Citrato de Sódio a 3%. O sangue total heparinizado (250 mL) de camundongos foi diluído em 200 mL de meio RPMI 1640, suplementado com 1% FCS (Vitrocell) e gentamicina (Sigma Aldrich).

Células inflamatórias presentes em amostras de sangue foram estimuladas a produzir IL-1 $\beta$  com 50 mL *Escherichia coli* LPS (1 mg/mL) (Sigma-Aldrich) por 3h a 37°C. Em seguida, 5 mM de ATP (Sigma-Aldrich) foi adicionado e as amostras de sangue foram incubadas por mais 1h a 37°C para permitir a liberação de IL-1 $\beta$  das células. As amostras de sangue foram centrifugadas a 400  $\times$  g por 10 min para remover as células e coletar os sobrenadantes contendo IL-1 $\beta$ . Níveis da citocina secretada no plasma foram medidos com o OptEIA Mouse IL-1 $\beta$  (BD Biosciences, San Diego, CA).

#### **3.5. Análise fenotípica por Citometria de Fluxo**

Para confirmar que as células obtidas são macrófagos fizemos uma marcação fenotípica com anticorpos específicos para esta célula. Para tanto, alíquotas de 100 $\mu$ l com 5 $\times$ 10<sup>5</sup> células foram incubadas com anticorpo bloqueador (FcBlock) da porção Fc (1:200) por 15 minutos a 4°C. Em seguida as suspensões foram incubadas com anticorpos monoclonais específicos contra macrófagos (F4-80+/CD11b) e marcados com ficoeritina (PE) ou isocianato de fluoresceína (FITC). Como isótipos controles foram utilizados IgG2b (ISO). O registro dos eventos foi realizado utilizando FACS calibur e programa FlowJo para análise.

### 3.6. Extração de DNA

O DNA genômico dos camundongos foi extraído de um pequeno segmento de cauda (1cm) coletado durante o procedimento de coleta das células de medula e que foi mantido a -20°C até o momento da extração.

Para a extração, foi utilizado o Kit *E.Z.N.A.® Tissue DNA Kit* da *Omega bio-tek*. Resumidamente: Ainda congelados, cada fragmento de cauda foi introduzido no nitrogênio líquido e então macerado. Este tecido foi transportado para um eppendorf contendo 200µL de tampão de lise suplementado com 20mg/mL de Proteinase K. Incubamos a solução em banho-maria à 65°C durante 1 hora e, passado este período, a solução foi centrifugada a 10.000 x g por 5 minutos, e o sobrenadante foi transferido para um tubo contendo 200µL de tampão BL suplementado com 200µL de isopropanol, misturando vigorosamente em vórtex. As amostras foram transferidas para a coluna HiBind®, e em seguida centrifugadas a 8.000 x g por 2 minutos. As colunas foram então lavadas 2 vezes com 650µL de tampão de lavagem, centrifugando a 8.000 x g por 2 minutos a cada lavagem. O DNA foi recuperado utilizando 200µL de tampão de eluição, previamente aquecido a 70°C, centrifugando as amostras a 8.000 x g por 2 minutos.

A concentração de DNA total resultante foi determinada por espectrofotometria (260/280nm), e mantido em freezer -80°C.

### 3.7. Genotipagem Taqman® por PCR em Tempo Real (RT-PCR)

Utilizamos a técnica de identificação da base com uso de sondas marcadas com fluoróforos (Taqman®), amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e análise em tempo real.

Nessa abordagem foram desenhados oligonucleotídeos flanqueando a região polimórfica do gene PYCARD para amplificação por PCR (Tabela 1), além de duas sondas que se anelam sobre uma pequena seqüência de nucleotídeos que contém o polimorfismo, sendo cada uma específica para um dos alelos descritos (Tabela 2). Em uma das extremidades de cada sonda está fixada uma molécula fluorescente (*dye reporter*), e na outra uma molécula não fluorescente, denominada *quencher*. Enquanto as sondas estão intactas, a interação entre os *dye*



*reporters* e os *quenchers* impede que a fluorescência seja emitida. Durante a reação de PCR, a Taq polimerase, por sua ação exonucleásica, quebra a sonda ligada ao fragmento, causando a liberação do *dye reporter* e a emissão de fluorescência. Como apenas a sonda específica para um determinado alelo é capaz de se ligar a ele, apenas a fluorescência emitida por ela será detectada.

A detecção da fluorescência emitida na reação é feita no aparelho *Step One Plus™* (Applied Biosystems), capaz de detectar diferentes comprimentos de onda e os genótipos são determinados de acordo com o perfil de emissão das fluorescências ao final da reação de PCR.

Para amplificação dos fragmentos desejados utilizamos as seguintes condições de reação: 3,5µL de mix (contendo a sonda marcada), 0,35µL de primer, 3,15µL de água destilada e 2µL de DNA (10ng), somando um total de 9µL para cada reação. Para amplificação realizamos 40 ciclos de 95°C por 15” e 60°C por 1’, precedidos por 30” a 60°C, e 10’ a 95°C. O produto foi analisado por PCR em tempo real, que faz a discriminação alélica através da emissão de luz em um comprimento de onda característico.

**Tabela 1 - Sequência de primer do gene alvo**

PRIMER	FOWARD	REVERSE
PYCARD	ACTGTCAGCAGCTTCATCTTGA	CTGGACGCTCTTGAAAAGTTGTC

**Tabela 2 - Sequência das sondas Taqman**

REPORTER	SNP	SEQUÊNCIA REPORTER
1 - VIC	Alelo G	CTTTTTGAGTTCATCCCC
2 - FAM	Alelo A	CTTTTTGAGTTTATCCCC

### 3.8. Avaliação da Produção de Citocinas

A liberação das citocinas IL-1β e IL-6 no sobrenadante da cultura de macrófagos após diferentes estímulos, foi dosada através do método ELISA, usando-se o kit *BD OptEIA* (*BD Biosciences*), segundo as instruções do fabricante para cada citocina.

Resumidamente, em uma placa transparente de 96 poços de fundo chato (*NUNC-Maxisorp*) foi adicionado o anticorpo de captura diluído conforme recomendação do lote em tampão carbonato para sensibilização da placa, sendo esta incubada a 4°C overnight. Após a lavagem com PBS-Tween 0,05% (*Merk*), a placa foi bloqueada com PBS 20% SFB e incubada por 2h em TA. A placa foi lavada com PBS-Tween e as amostras individuais e dos recombinantes foram adicionadas e incubadas por 2hs em TA. Após esse período, a placa foi lavada mais uma vez com PBS-Tween e foi adicionado o anticorpo de detecção biotilado e a avidina (SAv-HPR). A reação foi revelada com a solução do substrato e bloqueada com ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

A liberação da citocina IL-18 também foi avaliada utilizando-se o kit *BpD DuoSet ELISA* (*R&D Systems*). Segundo instruções do fabricante, em uma placa transparente de 96 poços de fundo chato (*NUNC-Maxisorp*) foi adicionado o anticorpo de captura diluído em PBS para sensibilização da placa, sendo esta incubada overnight em TA. Após a lavagem com PBS-Tween 0,05% (*Merk*), a placa foi bloqueada com PBS 1% BSA e incubada por 1h em TA. A placa foi lavada com PBS-Tween e as amostras individuais e dos recombinantes, diluídos em PBS 1% BSA, foram adicionadas e incubadas por 2hs em TA. Após esse período, a placa foi lavada mais uma vez com PBS-Tween e foi adicionado o anticorpo de detecção, também diluído em PBS 1% BSA, que ficou incubando em TA por mais 2 horas. Após repetirmos o passo da lavagem novamente, foi adicionada a avidina (SAv-HPR) por 20 minutos em TA. A reação foi revelada por 20 minutos com a solução do substrato e bloqueada com ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

As placas foram lidas em um leitor de ELISA automático (*Labsystems Multiscan EIA*), utilizando-se um filtro de 450nm, com correção pelo filtro de 570nm. Os valores de densidade óptica (D.O) obtidos foram transformados em pg/mL mediante equação de regressão não-linear com base em uma curva padrão feita com concentrações conhecidas de cada citocina, utilizando o programa *GraphPad Prism* versão 5.01.

### **3.9. Multiplex Assay para Avaliação da Produção de Citocinas**

Sobrenadantes das culturas de PBMC e BMDM foram utilizadas na análise dos níveis de citocinas e quimiocinas (GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IL-17A, IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IP-10, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , Eotaxin, M-CSF, VEGF and G-CSF).

Os perfis de citocinas presentes nas células estimuladas foram determinados usando o protocolo de beads magnéticas para citocinas/quimiocinas de camundongos do Milliplex® Map Kit (Cat. MCYTOMAG-70K, Merck). A tecnologia consiste em um processo que marca microesferas de poliestireno com dois fluoróforos. Por meio da utilização de concentrações precisas dessas substâncias, podem ser criados até 100 conjuntos diferentes de microesferas, cada uma delas com uma assinatura baseada em um código de cores, que podem ser identificadas pelo instrumento Bioplex.

Resumidamente, a placa de citocinas/quimiocinas foi lavada com 200 uL de tampão de lavagem, selada e misturada em agitador (shaker) por 10 minutos em temperatura ambiente. O tampão de lavagem foi decantado e foram adicionados 25 uL de cada padrão e controles nos poços apropriados. Logo após, foram acrescentados 25 uL das microesferas em cada poço. A placa foi incubada overnight a 4°C. Após a incubação, o conteúdo dos poços foi removido pela inversão da placa e os poços foram lavados 2x com 200 uL de tampão de lavagem. Adicionamos 25 uL/poço dos anticorpos/poço de detecção e após 1 hora de incubação em temperatura ambiente, foi adicionada estreptoavidina PE, incubando-se por mais 30 minutos. O conteúdo dos poços foi novamente removido e os poços lavados 2x. Adicionamos o “*Sheath fluid*” (fluido de revestimento) e, nesse momento, a placa foi lida no aparelho Bioplex e analisados em intensidade de fluorescência mediana usando o software Milliplex® Analyst.

### **3.10. Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS**

Amostras de células foram primeiramente lisadas em tampão RIPA contendo Tris/HCl 50mM pH 8, NaCl 150 mM, SDS 0,1%, deoxicolato de sódio 0,5% e Triton x-100 1%, além do inibidor de protease. Em seguida, foram centrifugadas a 12000 g / 3 min / 4°C e o sobrenadante coletado para as análises. As amostras (20 µg do lisado celular) foram tratadas com tampão de amostra 6 vezes concentrado (300 mM de Tris pH 6,8; 10% de SDS; 30% de glicerol; 0,6% de azul de bromofenol; 600 mM de DTT) e fervidas em banho-maria por 5 minutos. O material foi, então aplicado em um gel de empacotamento de 5% e gel de resolução de 12,5% de poliacrilamida e submetido à eletroforese em tampão de corrida (25 mM Tris; 0,1% SDS; 250 mM Glicina pH 8,3) com corrente constante de 110 volts.

### 3.11. Western Blot

Para realização do *Western-blotting* (WB), as amostras foram submetidas à eletroforese em gel contendo 12,5% de acrilamida por SDS-PAGE, como descrito acima e eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose (*Hybond-ECL-nitrocellulose*, Amershan Biosciences) em sistema semi-seco (*semi-dry system*, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, U.S.A.). O tampão de transferência utilizado foi 25 mM Tris; 192 mM Glicina pH 8,3 contendo 20% de metanol. A transferência foi realizada sob uma corrente de 0,8 mA/cm<sup>2</sup> de gel por 30 minutos.

As membranas foram coradas com *Ponceau S* (*Sigma*) para verificar a eficiência da transferência. Após a descoloração, as membranas foram incubadas por 1 hora a temperatura ambiente (TA) com solução bloqueadora (20 mM Tris, pH 7,5 contendo 150 mM NaCl e 5% de leite em pó desnatado) e então lavadas com tampão de lavagem (20 mM Tris, pH 7,5 contendo 150 mM NaCl e 0,1% de Tween 20). Subsequentemente, as membranas foram incubadas por 18 horas a 4 °C com os anticorpos específicos para moléculas, ASC, NLRP3, IL-1 $\beta$  e Caspase-1 diluídos em solução (20 mM Tris, pH 7,5 contendo 150 mM NaCl e 5% BSA). Após este período, as membranas foram submetidas a mais um ciclo de lavagens e incubadas com o conjugado imunoenzimático (anti-IgG de coelho) marcados com Peroxidase na diluição 1:2.000 em tampão de incubação por 1h/TA. O excesso do conjugado foi removido por um novo ciclo de lavagens. Os componentes foram revelados com solução substrato Tris-ECL em equipamento de quimioluminescência e as análises de quantificação feitas em software UVITEC.

### 3.12. Citometria de Fluxo com Imagem para avaliar a formação de ASC speck

BMDMs de camundongos AIRmax<sup>CC</sup> e dois tipos de sublinhagens de AIRmin com diferentes variantes de PYCARD (AIRmin<sup>CC</sup> e AIRmin<sup>TT</sup>) foram estimulados *in vitro* com 1 $\mu$ g/ml LPS por 3h e 5mM ATP por 30 minutos, a 37°C. A reação foi interrompida com PHEM-PFA 4% seguida de permeabilização utilizando PHEM-PFA4%-Triton 1% por 5 minutos. As células foram lavadas duas vezes com PHEM e incubadas com PHEM-BSA1% por 30 minutos em temperatura ambiente para bloqueio de ligações inespecíficas. Uma solução contendo o anticorpo primário diluído 1:250 (Mouse anti-ASC) foi incubada a 4°C *overnight* no “*shaker*” (agitador). As células foram lavadas duas vezes para remoção de anticorpos primários não aderidos e foram adicionados anticorpos secundários conjugados com AF647 e Hoechst para marcação de núcleo. Para BMDMs avaliou-se também atividade da caspase 1 com FAM

FLICA™ CASPASE-1 KIT (ICT097 - BioRad) seguindo instruções do fabricante. A aquisição foi realizada com citometria Imaging flow (Luminex) utilizando software INSPIRE. 10.000 eventos foram coletados para cada amostra de uma população definida (células *in focus* (Gradiente RMS - 40 to 80) > (Circularidade (0,6 to 1) x Area (100 to 400) no canal 1 (brightfield)). As amostras foram analisadas utilizando o software IDEAS e dados apresentados em % Media Fluorescence Intensity (MFI).

### 3.13. Avaliação da viabilidade celular – MTT

Para avaliar a viabilidade dos macrófagos após serem submetidos a diferentes estímulos, foi utilizado o teste do MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]}. O princípio do método é a redução de um substrato amarelo, o sal de tetrazolium MTT, por enzimas mitocondriais resultando em um produto azul/roxo chamado formazam que pode ser quantificado por espectrofotometria. Desta forma esta reação ocorre somente em células vivas e que estejam com suas mitocôndrias ativas (MOSMANN, 1983).

Os macrófagos já diferenciados foram cultivados em placas de cultura de 96 poços a uma concentração de  $1 \times 10^5$  células/poço e incubados durante 24 horas em meio completo (RPMI 1640 (contendo 10% de SFB, 40mg/mL de gentamicina e 1% de glutamina) em estufa de CO<sub>2</sub> 5% a 37°C. Após o período inicial de incubação, as células foram tratadas com diferentes estímulos para ativação do inflamassoma. Após o tratamento, foram colhidos os sobrenadantes e armazenados a 4°C, e então 100µL de MTT (5000 µg/mL) foram acrescentados às células por 3 horas. Em seguida, o MTT foi retirado e foram adicionados 100µL de dimetilsufóxido (DMSO, Sigma®) por 10 minutos para dissolver a formazana obtida durante o processo. A reação foi então lida em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 570nm (VALADARES *et al.*, 2007). A sobrevivência celular foi calculada como a porcentagem de absorbância em relação à absorbância do controle.

### 3.14. Análise Estatística

As diferenças entre os grupos experimentais foram calculadas por análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Bonferroni. Consideramos significativos os valores de p inferiores a 0,05. Os dados foram analisados pelo programa *GraphPadPrism 5.01* (*GraphPad Software, San Diego, CA*).

## **4. CONCLUSÃO**

Com os dados obtidos neste projeto, podemos concluir que:

- A mutação natural que ocorre no gene PYCARD na linhagem AIRmin provoca uma perda na habilidade da proteína ASC de ativar os inflamassomas NLRP3, NLRC4 e AIM2 e conseqüentemente processar a IL-1 $\beta$ . Isso se dá pela troca de um aminoácido negativo por um positivo, influenciando a formação do agregado de moléculas ASC que origina o *speck*;
- A quantidade de caspase-1 ativa é significativamente menor em AIRmin<sup>TT</sup> quando comparada a linhagem AIRmax<sup>CC</sup>, ou seja, o polimorfismo do gene PYCARD interfere na ativação do inflamassoma NLRP3 levando a não clivagem da pró-caspase em sua forma ativa. Conseqüentemente, a quantidade de GSDMD ativa em macrófagos de AIRmin<sup>TT</sup> é menor do que em AIRmax<sup>CC</sup>, pois a mesma é clivada pela caspase-1 ativa. Resultando no aumento de morte celular por piroptose em BMDMs de AIRmax<sup>CC</sup>, quando estimulados com LPS+ATP;
- Contudo, a mutação não influencia a diferença fenotípica de inflamação aguda entre os animais AIRmax e AIRmin observada pelos fenótipos utilizados na seleção das linhagens, migração celular e extravasamento proteico. A mutação do gene PYCARD, também não interferiu na produção e liberação de outras citocinas inflamatórias, sendo observada influência do background genético heterogêneo das linhagens AIRmax e AIRmin.
- O polimorfismo natural observado no gene PYCARD, que participa da formação dos inflamassomas, pode ter sido acumulado diferencialmente nas linhagens AIRmax e AIRmin durante o processo de seleção bidirecional baseada na reatividade inflamatória realizada para obtenção desses animais.

## **5. REFERÊNCIAS**



ADEREM, A; UNDERHILL, D.M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. **Annu. Rev. Immunol.**, **17**: 593-623, 1999

ARAUJO L.M, RIBEIRO OG, SIQUEIRA M, DE FRANCO M, STAROBINAS N, MASSA S, CABRERA WH, MOUTON D, SEMAN M, IBAÑEZ OM. Innate resistance to infection by intracellular bacterial pathogens differs in mice selected for maximal or minimal acute inflammatory response. **Eur J Immunol.** 28(9):2913-20, 1998

ARRUDA, A.G.F. Estudo comparativo da ativação de macrófagos de linhagens de camundongos geneticamente selecionados para a reatividade inflamatória aguda. 75 f. **Dissertação** (Mestrado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011

BAEUERLE, P.A; DAVID BALTIMORE. NF- $\kappa$ B: Ten Years After. **Cell**, 1996

BALDWIN, A.S. The NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B Proteins: New Discoveries and Insights. **Annual Review of Immunology**, 1996

BAROJA- MAZO A, MARTIN-SANCHEZ F, GOMEZ AI, MARTINEZ CM, AMORES-INIESTA J, COMPAN V, *et al.* The NLRP3 inflammasome is released as a particulate danger signal that amplifies the inflammatory response. **Nat Immunol.** 2014;15:738– 48

BIOZZI G, RIBEIRO OG, SARAN A, ARAUJO ML, MARIA DA, DE FRANCO M, CABRERA WK, SANT'ANNA OA, MASSA S, COVELLI V, MOUTON D, NEVEU T, SIQUEIRA M, IBANEZ OM. Effect of genetic modification of acute inflammatory responsiveness on tumorigenesis in the mouse. **Carcinogenesis.** 19(2):337-46, 1998

BORREGO A, PETERS LC, JENSENJR, RIBEIRO OG, CABRERA WHK, STAROBINAS N, SEMAN M, IBAÑEZ OM. DE FRANDO M. Genetic determinants of acute inflammation regulate *Salmonella* infection and modulate *Slc11a1* gene (formerly *Nramp*) effects in selected mouse lines. **Elsevier. Microbes and Infection** 8 (2006) 2766e2771

BORREGO A, COLOMBO F, DE SOUZA JG, JENSEN JR, DASSANO A, PIAZZA R, SANTOS BAR, RIBEIRO OG, DE FRANCO M, CABRERA WHK, ICIMOTO MY, STAROBINAS N, MAGALHÃES G, MONTELEONE LF, ETO SF, PEREIRA CDO, GOLDFEDER MB, PASQUALOTO KFM, DRAGANI T e IBAÑEZ O.

Pycard and BC017158 Candidate Genes of Irm1 Locus Modulate Inflammasome Activation for IL-1 $\beta$  Production. **Front Immunol.** 2022;13:899569. Published 2022 Jun 21.

BOYDEN, E.D; DIETRICH, W.F. Nalp1b controls mouse macrophage susceptibility to anthrax lethalexotoxin. **Nat Genet.** 38(2):240-4, 2006

BROZ, P; VON MOLTKE, J; JONES, J.W; VANCE, R.E; MONACK, D.M. Differential requirement for Caspase-1 autoproteolysis in pathogen-induced cell death and cytokine processing. **Cell Host Microbe** 8(6):471-83, 2010

BROZ P, DIXIT VM. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. **Nat Rev Immunol.** 16(7):407-420, 2016

BRYAN, N.B., DORFLEUTNER, A., ROJANASAKUL, Y. & STEHLIK, C. Activation of inflammasomes requires intracellular redistribution of the apoptotic speck-like protein containing a caspase recruitment domain. **J. Immunol.** 182, 3173–3182, 2009

BURCKSTUMMER, T; BAUMANN, C; BLUML, S; DIXIT E; DURNBURGER, G; JAHN, H. An orthogonal proteomic-genomic screen identifies AIM2 as a cytoplasmic DNA sensor for the inflammasome. **Nature immunology** 10(3):266-72, 2009

B.V. TSU, C. BEIERSCHMITT, A.P. RYAN, R. AGARWAL, P.S. MITCHELL, M.D. DAUGHERTY. Diverse viral proteases activate the NLRP1 inflammasome, **Elife.** 7 (10). Jan 2021

CARLSTROM, M., EKMAN, A.K., PETERSSON, S., SODERKVIST, P., ENERBACK, C. Genetic support for the role of the NLRP3 inflammasome in psoriasis susceptibility. **Exp. Dermatol.** 21, 932–937, 2012

CARNEIRO, A. S.; RIBEIRO, O. G.; CABRERA, W. H.; VORRARO, F.; DE FRANCO, M.; IBAN˜EZ, O. M.; STAROBINAS, N. Bothrops jararaca venom (BjV) induces differential leukocyte accumulation in mice genetically selected for acute inflammatory reaction: the role of host genetic background on expression of adhesion molecules and release of endogenous mediators. **Toxicon**, v. 52, 619-627, 2008

CARNEIRO, A. S.; RIBEIRO, O. G.; DE FRANCO, M.; CABRERA, W. H.; VORRARO, F.; SIQUEIRA, M.; IBAÑEZ, O. M.; STAROBINAS, N. Local inflammatory reaction induced by *Bothrops jararaca* venom differs in mice selected for acute inflammatory response. **Toxicon**, v. 40, p. 1571-1579, 2002

CARROLL A, COYLE J, GAMBIN Y. Prions and Prion-like assemblies in neurodegeneration and immunity: the emergence of universal mechanisms across health and disease. **Semin Cell Dev Biol.**;99:115–30. 2020

CARTY, M; GOODBODY, R; SCHRODER, M; STACK, J; MOYNAGH, P.N; BOWIE, A.G. The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF-dependent Toll-like receptor signaling. **Nature immunology** 10:1074-81, 2006

CORREA MA, BORREGO A, JENSEN JR, ET AL. Mice Selected for Acute Inflammation Present Altered Immune Response during Pristane-Induced Arthritis Progression. **Biomed Res Int.** 2018;2018:1267038. Published 2018 Oct 8.

DAVIS BK, WEN H, TING JP. The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. **Annu Rev Immunol.**;29:707-735, 2011

D-FINK, S.L. AND COOKSON, B.T. Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages. **Cell. Microbiol**; 8: 1812–1825, 2006

DINARELLO, C. A.; NOVICK, D.; KIM, S.; KAPLANSKI, G. Interleukin-18 and IL-18 binding protein. **Front Immunol.**, v. 8, p. 284:289, 2013.

DI PACE RF, MASSA S, RIBEIRO OG, CABRERA WH, DE FRANCO M, STAROBINAS N, SEMAN M, IBAÑEZ OC. Inverse genetic predisposition to colon versus lung carcinogenesis in mouse lines selected based on acute inflammatory responsiveness. **Carcinogenesis.** Aug;27(8):1517-25, 2006

DOSTERT, C; PETRILLI, V; VAN BRUGGEN, R; STEELE, C; MOSSMAN, B.T; TSCHOPP, J. Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. **Science** 320(5876):674-7, 2008

DUTRA V, LEAL VNC, FERNANDES FP, SOUZA CRL, FIGUEIREDO MS, PONTILLO A. Genetic contribution and functional impairment of inflammasome in sickle cell disease. **Cytokine.**;149:155717. 2022

EVAVOLD et al. The Pore-Forming Protein Gasdermin D Regulates Interleukin-1 Secretion from Living Macrophages. **Immunity**, 201

FANTUZZI, G; DINARELLO, C.A. Interleukin-18 and interleukin-1 beta: two cytokine substrates for ICE (caspase-1). **Journal of clinical immunology** 19(1):1-11, 1999

FERNANDES-ALNEMRI, T; YU, J.W; JULIANA, C; SOLORZANO, L; KANG, S; WU, J. et al. The AIM2 inflammasome is critical for innate immunity to *Francisella tularensis*. **Nature immunology** 11(5):385-93, 2010

FIGUEIRA MBA, DE LIMA DS, BOECHAT AL, *et al.* Single-Nucleotide Variants in the AIM2 - Absent in Melanoma 2 Gene (rs1103577) associated With Protection for Tuberculosis. **Front Immunol.** 2021;12:604975. Published Apr 1, 2021

FINK, S.L; BERGSBAKEN, T; COOKSON, B.T. Anthrax lethal toxin and Salmonella elicit the common cell death pathway of caspase-1-dependent pyroptosis via distinct mechanisms. **PNAS** 105(11):4312-7, 2008

FRANKLIN BS, BOSSALLER L, DE NARDO D, RATTER JM, STUTZ A, ENGELS G, *et al.* The adaptor ASC has extracellular and ‘prionoid’ activities that propagate inflammation. **Nat Immunol.** 2014;15:727–37.

FRITZ, J.H; FERRERO, R.L; PHILPOTT, D.J; GIRARDIN, S.E. Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. **Nature immunology** 7(12):1250-7, 2006

GALVAN, A., F. VORRARO, W. H. CABRERA, O. G. RIBEIRO, S. PAZZAGLIA, M. MANCUSO, A. ZOLIN, S. MILANI, A. SARAN, O. M. IBANˆEZ, AND T. A. DRAGANI. Genetic heterogeneity of inflammatory response and skin tumorigenesis in phenotypically selected mouse lines. **Cancer Lett.**295: 54–58, 2010

GONCALVES, V.M; MATTEUCCI, K.C; BUZZO, C.L; MIOLLO, B.H; FERRANTE, D; TORRECILHAS, A.C et al. NLRP3 Controls *Trypanosoma cruzi* Infection

through a Caspase-1-Dependent IL-1 $\beta$ -Independent NO Production. **PLoS Negl Trop Dis.** 7(10):e2469, 2013

GUO H, CALLAWAY JB, TING JP. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. **Nat Med.** 2015;21:677–87.

HAYASHI F, SMITH KD, OZINSKY A, HAWN TR, YI EC, GOODLETT DR, et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. **Nature.** Apr26;410(6832):1099-103, 2001

HE XF, ZENG YX, LI G, FENG YK, WU C, LIANG FY, et al. Extracellular ASC exacerbated the recurrent ischemic stroke in an NLRP3-dependent manner. **J Cereb Blood Flow Metab.** 2020;40:1048–60.

HENRY, T; BROTCHE, A; WEISS, D.S; THOMPSON, L.J; MONACK, D.M. Type I interferon signaling is required for activation of the inflammasome during Francisella infection. **J Exp Med.**204(5):987-94, 2007

HOFFMAN HM, BRODERICK L. The role of the inflammasome in patients with autoinflammatory diseases. **J Allergy Clin Immunol.** 138(1):3-14, 2016

HOGGATT, J., & PELUS, L. M. Many mechanisms mediating mobilization: an alliterative review. **Current Opinion in Hematology,** (2011). 18, 231–238

HOSS, F., RODRIGUEZ-ALCAZAR, J. F., & LATZ, E. Assembly and regulation of ASC specks. **Cellular andMolecular Life Sciences,** 74(7), 1211–1229, 2016.

IBAÑEZ OM, STIFFEL C, RIBEIRO OG, CABRERA WK, MASSA S, DE FRANCO M, SANT'ANNA OA, DECREUSEFOND C, MOUTON D, SIQUEIRA M, BIOZZI G. Genetics of nonspecific immunity: I. Bidirectional selective breeding of lines of mice endowed with maximal or minimal inflammatory responsiveness. **Eur J Immunol.** 22(10):2555-63, 1992

ICHINOHE, T; LEE, H.K; OGURA, Y; FLAVELL, R; IWASAKI, A. Inflammasome recognition of influenza virus is essential for adaptive immune responses. **J Exp Med** 206(1):79-87, 2009

INOHARA, N; KOSEKI, T; DEL PESO, L; HU, Y; YEE, C; CHEN, S. Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappaB. **The Journal of biological chemistry** 274(21):14560-7, 1999

JANEWAY, C.A. The immune system evolved to discriminate infectious non self from noninfectiousself. **Immunol. Today** 13:11–16, 1992.

JENSEN JR, GALVAN A, BORREGO A, CABRERA WH, RIBEIRO OG, STAROBINAS N, DEFRANCO M, COLECCHIA M, BERTOLOTTI A, DRAGANI TA, IBAÑEZ OC. Genetic control of renal tumorigenesis by the mouse Rtm1 locus. **BMC Genomics** Oct 22;14:724, 2013

JIN, T; PERRY, A; JIANG, J; SMITH, P; CURRY, J.A; UNTERHOLZNER, L et al. Structures of the HIN domain: DNA complexes reveal ligand binding and activation mechanisms of the AIM2inflammasome and IFI16 receptor. **Immunity** 36(4):561-71, 2012

JIN, Y., MAILLOUX, C. M., GOWAN, K., RICCARDI, S. L., LABERGE, G., BENNETT, D. C., FAIN, P. R. & SPRITZ, R. A. 2007. NALP1 in vitiligo-associated multiple autoimmune disease. *N Engl J Med*, 356, 1216-25.

JOLY, S; SUTTERWALA, F.S. Fungal pathogen recognition by the NLRP3 inflammasome. **Virulence** 1(4):276-80, 2010

JONES, J.W; KAYAGAKI, N; BROZ, P; HENRY, T; NEWTON, K; O'ROURKE, K et al. Absent in melanoma 2 is required for innate immune recognition of Francisella tularensis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 107(21):9771-6, 2010

KANNEGANTI, T.D; OZOREN, N; BODY-MALAPEL, M; AMER, A; PARK, J.H; FRANCHI, L et al. Bacterial RNA and small antiviral compounds activate caspase-1 through cryopyrin/Nalp3. **Nature** 440(7081):233-6, 2006

KARMAKAR, M; KATSNELSON, MA; DUBYAK, GR; PEARLMAN, E. Neutrophil P2X7 receptors mediate NLRP3 inflammasome-dependent IL-1 $\beta$  secretion in response to ATP. **Nat Commun.** 2016 Feb15;7:10555.

KAWAI, T; AKIRA, S. TLR signaling. **Semin Immunol** 19: 24-32, 2007

KAWAI, T; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. **Nature immunology** 11(5): 373-84, 2010

KERR N, GARCIA-CONTRERAS M, ABBASSI S, MEJIAS NH, DESOUSA BR, RICORDI C, et al. Inflammasome proteins in serum and serum-derived extracellular vesicles as Biomarkers of Stroke. **Front Mol Neurosci.** 2018;11:309.

KLIMPEL, K.R; ARORA, N; LEPPLA, S.H. Anthrax toxin lethal factor contains a zinc metalloprotease consensus sequence which is required for lethal toxin activity. **Molecular microbiology** 13(6):1093-100,1994

KOFOED, E.M; VANCE RE. Innate immune recognition of bacterial ligands by NAIPs determines inflammasome specificity. **Nature** 477(7366):592-5, 2011

KUFER, T.A. Signal transduction pathways used by NLR-type innate immune receptors. **Mol Biosyst** 4(5):380-6, 2008

LABASI, J.M., PETRUSHOVA N, DONOVAN C, MCCURDY S, LIRA P, PAYETTE MM, BRISSETTE W, WICKS JR, AUDOLY L, GABEL CA. Absence of the P2X7 receptor alters leukocyte function and attenuates an inflammatory response. **J. Immunol.** **168**: 6436-6445, 2002

LAGE S.L, CARINA L. BUZZOA, EDUARDO P. AMARAL, KELLY C. MATTEUCCI, LILIANA M. MASSIS, MARCELO Y. ICIMOTO, ADRIANA KARAOGLANOVIC CARMONA, MARIA R. D'IMPÉRIO LIMA, MAURICIO M. RODRIGUES, F, LUIS C. S. FERREIRA, GUSTAVO P. AMARANTE-MENDES, KARINA R. BORTOLUCCI. Cytosolic flagellin-induced lysosomal pathway regulates inflammasome-dependent and -independent macrophage responses. **PNAS**, 2013

LAMKANFI, M & DIXIT, V.M. Mechanisms and functions of inflammasomes. **Cell** 157, 1013– 1022, 2014

LEIBOVICH, S.J.; ROSS, R. The role of macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. **Am. J. Pathol.** **78** : 71-100, 1975.

LENKIEWICZ AM, ADAMIAK M, THAPA A, BUJKO K, PEDZIWIATR D, ABDEL-LATIF AK, KUCIA M, RATAJCZAK J, RATAJCZAK MZ. The Nlrp3 Inflammasome Orchestrates Mobilization of Bone Marrow-Residing Stem Cells into Peripheral Blood. **Stem Cell Rev Rep.** 2019 Jun;15(3):391-403.

LIGHTFIELD L, PERSSON J, TRINIDAD NJ, BRUBAER SW, OFOED EM, SAUER JD, et al. Differential requirements for NAIP5 in activation of the NLRC4 inflammasome. **Infection and immunity** 79(4):1606-14. 2011

LIMA-JUNIOR, D.S; COSTA, D.L; CARREGARO, V; CUNHA, L.D; SILVA, A.L; MINEO, T.W et al. Inflammasome-derived IL-1beta production induces nitric oxide-mediated resistance to Leishmania. **Nat Med** 19(7):909-15, 2013

LIU, J., QIAN, C. & CAO, X. Post- translational modification control of innate immunity. *Immunity* 45, 15–30 (2016).

LIVAK K.J, SCHMITTGEN T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>[Delta Delta C(T)]. **Methods**, 2001

LUGRIN J, MARTINON F. The AIM2 inflammasome: Sensor of pathogens and cellular perturbations. **Immunol Rev.** 281(1):99-114, 2018

LUPFER CR, RODRIGUEZ A, KANNEGANTI TD. Inflammasome activation by nucleic acids and nucleosomes in sterile inflammation... or is it sterile? **FEBS J.** 2017 Aug;284(15):2363-2374.

MARIA, D.A., MANENTI, G., GALBIATI, F., RIBEIRO, O.G., CABRERA, W.H.K., DE FRANCO, M., STAROBINAS, N., SIQUEIRA, M., DRAGANI, T. & IBAÑEZ, O.M. Pulmonary adenoma susceptibility (*Pas 1*) locus affects inflammatory response. **Oncogene: 22**, 426-432, 2003

MARIA, D.A.; RIBEIRO, O.G.; KAZUMI, E.P.; DE FRANCO, M.; CABRERA, W.H.K.; STAROBINAS, N.; GALLOIS, V.; SIQUEIRA, M.; SEMAN, M.; IBAÑEZ, O. M. Resistance to melanoma metastases in mice selected for high acute inflammatory response. **Carcinogenesis 22**: 337-342, 2001



- MARIATHASAN, S; WEISS, D.S; NEWTON, K; MCBRIDE, J; O'ROURKE, K; ROOSE-GIRMA, M et al. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. **Nature** 440(7081):228-32,2006
- MARNEROS AG. VEGF-A and the NLRP3 Inflammasome in Age-Related Macular Degeneration. **Adv Exp Med Biol.** 2016;854:79-85.
- MARTINON, F., BURNS, K. & TSCHOPP, J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. **Mol. Cell** 10, 417–426, 2002
- MARTINON, F; MAYOR, A; TSCHOPP, J. The inflammasomes: guardians of the body. **Annual review of immunology** 27:229-65, 2009
- MARTINON, F; PETRILLI, V; MAYOR, A; TARDIVEL, A; TSCHOPP, J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. **Nature** 440(7081):237-41, 2006
- MARTINON, F; TSCHOPP, J. Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation. **Cell death and differentiation** 14(1):10-22, 2007
- MARTINON, F., Signaling by ROS drives inflammasome activation. **Eur J Immunol.** 40(3): p. 616-9.105 113, 2010
- MEDZHITOV, R; JANEWAY, C.A. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. **Curr.Opin.Immunol.** 9: 4–9, 1997
- MEDZHITOV, R; JANEWAY, C.A. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. **Science** 296: 298–300, 2002
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods** 65:55-6, 1983
- MOSSER, D.M; EDWARDS, J.P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature reviews** 8: 958-69, 2008

MURUVE, D.A; PETRILLI, V; ZAISS, A.K; WHITE, L.R; CLARK, S.A; ROSS, P.J. The inflammasome recognizes cytosolic microbial and host DNA and triggers an innate immune response. **Nature** 452(7183):103-7, 2008

NAKAMURA Y, KAMBE N. Linkage of bacterial colonization of skin and the urticaria-like rash of NLRP3-mediated autoinflammatory syndromes through mast cell-derived TNF- $\alpha$ . **J Dermatol Sci.** 2013 Aug;71(2):83-8.

PICCINI, A., S; CARTA, S; TASSI, D; LASIGLIE, G; FOSSATI; RUBARTELLI, A. ATP is released by monocytes stimulated with pathogen-sensing receptor ligands and induces IL-1b and IL-18 secretion in an autocrine way. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 105: 8067–8072, 2008

POLVERINE, P.J.; COTRAN, P.S.; GIMBRONE, M.A.; UNANUE, E.R. Activated macrophages induce vascular proliferation. **Nature** 269: 804-806, 1977

PONTILLO A, BRANDAO L, GUIMARAES R, SEGAT L, ARAUJO J, CROVELLA, S. Two SNPs in NLRP3 gene are involved in the predisposition to type-1 diabetes and celiac disease in a pediatric population from northeast Brazil. **Autoimmunity** 43, 583–589, 2010

PONTILLO A, VENDRAMIN A, CATAMO E, FABRIS A, CROVELLA S. The missense variation Q705K in CIAS1/NALP3/NLRP3 gene and an NLRP1 haplotype are associated with celiac disease. **Am.J. Gastroenterol** 106: 539–544, 2011.

PONTILLO A, GIRARDELLI M, KAMADA AJ, PANCOTTO JA, DONADI EA, CROVELLA S, SANDRIN GARCIA P. Polymorphisms in inflammasome genes are involved in the predisposition to systemic lupus erythematosus. **Autoimmunity.** 45(4):271-8, 2012

QURESHI, M.A; DIETERI, R.R; BACON, L.D. Genetic variation in the recruitment and activation of chicken peritoneal macrophages, **Exp Biol Med** 181, 560-568. 1986

QURESHI, M. A; DIETERI R.R. Bacterial uptake and killing by macrophage. **Modern Methods in Immunotoxicology**, 1995

RATHINAM, V.A., VANAJA, S.K. & FITZGERALD, K.A. Regulation of inflammasome signaling. **Nat. Immunol.** 13, 333–342, 2012

RATSIMANDRESY, R.A., DORFLEUTNER, A. & STEHLIK, C. An update on PYRIN domain containing pattern recognition receptors: from immunity to pathology. **Front. Immunol.** 4, 440, 2013

RIBEIRO, O.G.; MARIA, D.A.; ADRIOUCH, S.; PECHBERTY, S.; CABRERA, W.H.K.; MORISSET, J.; IBAÑEZ, O.M.; SEMAN, M. Convergent alteration of granulopoiesis, chemotactic activity, and neutrophil apoptosis during mouse selection for high acute inflammatory response. **J. Leukoc. Biol.** 74: 497-506, 2005.

RITCHEY B, HAI Q, HAN J, BARNARD J, SMITH JD. Genetic variant in 3' untranslated region of the mouse pycard gene regulates inflammasome activity. **Elife.** 2021;10:e68203. Published 2021 Jul 1.

SAGOO, P; GARCIA, Z; BREART, B; LEMAÎTRE, F; MICHONNEAU, D; ALBERT, M.L; LEVY, Y; BOUSSO, P. In vivo imaging of inflammasome activation reveals a subcapsular macrophage burst response that mobilizes innate and adaptive immunity. **Nat Med.** 22(1):64-71, 2016

SAHILLIOGLU AC, OZOREN N. Artificial loading of ASC specks with cytosolic antigens. **PLoS One.** 2015

SANDER, L.E; DAVIS, M.J; BOEKSCHOTEN, M.V; AMSSEN, D; DASCHER, C.C; RYFFEL, B et al. Detection of prokaryotic mRNA signifies microbial viability and promotes immunity. **Nature** 474(7351):385-9, 2011

SCHENTEN D, MEDZHITOV R. The control of adaptive immune responses by the innate immune system. **Adv Immunol.**;109:87-124, 2011

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

SENFTLEBEN, U; CAO, Y; XIAO, G; GRETEN, F.R; KRAHN, G; BONIZZI, G. Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. **Science** 293(5534):1495-9, 2001

SENFTLEBEN, U; LI, Z.W; BAUD, V; KARIN, M. IKKbeta is essential for protecting T cells from TNFalpha-induced apoptosis. **Immunity** 14(3):217-30, 2001

SOARES JL, OLIVEIRA EM, PONTILLO A. Variants in NLRP3 and NLRC4 inflammasome associate with susceptibility and severity of multiple sclerosis. **Mult Scler Relat Disord.** 29:26-34, 2019;.

SOUZA DE LIMA D, BOMFIM CCB, LEAL VNC, ET AL. Combining Host Genetics and Functional Analysis to Depict Inflammasome Contribution in Tuberculosis Susceptibility and Outcome in Endemic Areas. **Front Immunol.** 2020;11:550624. Published 2020 Oct 21.

SOUZA JG, STAROBINAS N e IBAÑEZ OCM. Unknow/enigmatic functions of extracellular ASC. **Immunology.** 2021;00:1–12.

SRINIVASULA, S. M. et al. The PYRIN-CARD protein ASC is an activating adaptor for caspase-1. **J.Biol. Chem.** 277, 21119–21122, 2002

STEHLIK, C. et al. Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain is aregulator of procaspase-1 activation. **J. Immunol.** 171, 6154–6163, 2003

STIFFEL, C.; IBANEZ, O.M.; RIBEIRO, O.G.; DECREUSEFOND, C.; MOUTON, D.; SIQUEIRA, M.; BIOZZI, G. Genetics of acute inflammation: inflammatory reactions in inbred lines of mice and intheir interline crosses. **Exp. Clin Immunogenet.**, v. 7, n. 4, 221-233, 1990.

SWANSON KV, DENG M, TING JP. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nat Rev Immunol.* 19(8):477-489, 2019

TAABAZUING et al. Pyroptosis and Apoptosis Pathways Engage in Bidirectional Crosstalk in Monocytes and Macrophages. **Cell Chemical Biology**, 2017

TANNAHILL, G., CURTIS, A., ADAMIK, J. *et al.* Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 $\beta$  through HIF-1 $\alpha$ . **Nature** 496, 238–242 (2013)

TAPIA-ABELLÁN, A., ANGOSTO-BAZARRA, D., MARTÍNEZ-BANACLOCHA, H. *et al.* MCC950 closes the active conformation of NLRP3 to an inactive state. **Nat Chem Biol** 15, 560–564 (2019).

THORNBERRY, N *et al.* A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 $\beta$  processing in monocytes. **Nature**, 1992

TING, P.Y; RUTH, C; EMAD S. ALNEMRI; JOHN BERTIN; JEREMY M. BOSS, BECKLEY K. DAVIS, RICHARD A. FLAVELL, STEPHEN E. GIRARDIN, ADAM GODZIK, JONATHAN A. HARTON, HAL M. HOFFMAN, JEAN-PIERRE HUGOT, NAOHIRO INOHARA, ALEX MACKENZIE, LOIS J. MALTAIS, GABRIEL NUNEZ, YASUNORI OGURA, LUC A. OTTEN, DANA PHILPOTT, JOHN C. REED, WALTER REITH, STEFAN SCHREIBER, VIKTOR STEIMLE, PETER A. WARD. The NLR Gene Family: A Standard Nomenclature. **Immunity** 28: 285-287, 2008.

TREMBICKI, K.A; DIETERT, R.R. Chicken developmental antigens: analysis of erythroid populations with monoclonal antibodies. **J Exp Zool** 235: 127-34, 1985

VALADARES MC, CASTRO CN, CUNHA LC. *Synadenium umbellatum*: citotoxicidade e danos ao DNA de células da medula óssea de camundongos. **Rev. Bras. Ciênc. Farm.**; 43:631-38, 2007

VAN HAUWERMEIREN, F; LAMKANFI, M. The NEK-sus of the NLRP3 inflammasome. **Nat Immunol.** 17(3):223-4, 2016

VAN OPDENBOSCH, N; GURUNG, P; VANDE WALLE, L; FOSSOUL, A; THIRUMALADEVI, K; MOHAMED LAMKANFI. Activation of the NLRP1b inflammasome independently of ASC-mediated caspase-1 autoproteolysis and speck formation. **Nature Communications**, 2014

VAN DE VEERDONK, F. L.; NETEA, M. G.; DINARELLO, C. A.; JOONSTEN, L. A. Inflammasome activation and IL-1 $\beta$  and IL-18 processing during infection. *Trends in Immunology.*, v. 32, n. 3 p. 110-116, 2011.

VANAJA, S.K., RATHINAM, V.A. & FITZGERALD, K.A. Mechanisms of inflammasome activation: recent advances and novel insights. **Trends Cell Biol.** 25, 308–315, 2015

VANCE, R.E; ISBERG, R.R; PORTNOY, D.A. Patterns of pathogenesis: discrimination of pathogenic and nonpathogenic microbes by the innate immune system. **Cell Host Microbe** 6(1):10-21, 2009

VIGAR, N.D.; CABRERA, W. H.; ARAÚJO, L. M.; RIBEIRO, O. G.; OGATA, T. R.; SIQUEIRA, M.; IBAÑEZ, O. M.; DE FRANCO, M. Pristane-induced arthritis in mice selected for maximal or minimal acute inflammatory reaction. **Eur. J. Immunol.**, v. 30:431-437, 2000

VORRARO F, GALVAN A, CABRERA WH, CARNEIRO PS, RIBEIRO OG, DE FRANCO M, STAROBINAS N, JENSEN JR, SEMAN M, DRAGANITA, IBAÑEZ OC. Genetic control of IL-1 beta production and inflammatory response by the mouse Irm1 locus. **J Immunol** Aug 1;185(3):1616-21,2010

WERB, Z; GORDON, S. Secretion of a specific collagenase by stimulated macrophages. **J. Exp. Med.**, **142**: 346-360, 1975.

XU, H. et al. Innate immune sensing of bacterial modifications of Rho GTPases by the Pyrin inflammasome. **Nature** 513, 237–241, 2014

YOON SI, KURNASOV O, NATARAJAN V, HONG M, GUDKOV AV, OSTERMAN AL, et al. Structural basis of TLR5-flagellin recognition and signaling. **Science** Feb 17;335(6070):859-64, 2012

ZAMBONI DS, RABINOVITCH M. Nitric oxide partially controls *Coxiella burnetii* phase II infection in mouse primary macrophages. **Infection and immunity**. Mar;71(3):1225-33, 2003

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

ZHONG, H; SUYANG, H; ERDJUMENT-BROMAGE, H; TEMPST, P; GHOSH, S. The transcriptional activity of NF-kappaB is regulated by the IkappaB-associated PKAc subunit through a cyclic AMP-independent mechanism. **Cell** 89(3):413-24, 1997





# Pycard and BC017158 Candidate Genes of *Irm1* Locus Modulate Inflammasome Activation for IL-1 $\beta$ Production

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Thomas A. Kufer,  
University of Hohenheim, Germany

### Reviewed by:

Jonathan Smith,  
Cleveland Clinic, United States  
Jonathan A. Harton,  
Albany Medical College, United States

### \*Correspondence:

Olga Célia Martínez Ibañez  
olga.ibanez@butantan.gov.br

†These authors share first authorship

### ‡Present address:

Francesca Colombo,  
National Research Council – Institute  
for Biomedical Technologies,  
Segrate (MI), Italy

### Specialty section:

This article was submitted to  
Molecular Innate Immunity,  
a section of the journal  
Frontiers in Immunology

Received: 18 March 2022

Accepted: 05 May 2022

Published: 21 June 2022

### Citation:

Borrego A, Colombo F,  
de Souza JG, Jensen JR,  
Dassano A, Piazza R, Rodrigues  
dos Santos BA, Ribeiro OG, De  
Franco M, Cabrera WHK,  
Icimoto MY, Starobinas N,  
Magalhães G, Monteleone LF,  
Eto SF, DeOcesano-Pereira C,  
Goldfeder MB, Pasqualoto KFM,  
Dragani TA and Ibañez OCM (2022)  
*Pycard and Bc017158 Candidate  
Genes of Irm1 Locus Modulate  
Inflammasome Activation  
for IL-1 $\beta$  Production.*  
*Front. Immunol.* 13:899569.  
doi: 10.3389/fimmu.2022.899569

Andrea Borrego<sup>1†</sup>, Francesca Colombo<sup>2†‡</sup>, Jean Gabriel de Souza<sup>1,3†</sup>,  
José Ricardo Jensen<sup>1</sup>, Alice Dassano<sup>2</sup>, Rocco Piazza<sup>4</sup>, Barbara Anais Rodrigues dos Santos<sup>1</sup>,  
Orlando Garcia Ribeiro<sup>1</sup>, Marcelo De Franco<sup>5</sup>, Wafa Hanna Koury Cabrera<sup>1</sup>,  
Marcelo Yudi Icimoto<sup>6</sup>, Nancy Starobinas<sup>1</sup>, Geraldo Magalhães<sup>7</sup>, Leticia Figueiredo Monteleone<sup>1</sup>,  
Silas Fernandes Eto<sup>8</sup>, Carlos DeOcesano-Pereira<sup>3</sup>, Mauricio Barbugiani Goldfeder<sup>9</sup>,  
Kerly Fernanda Mesquita Pasqualoto<sup>10</sup>, Tommaso A. Dragani<sup>2</sup> and Olga Célia Martínez Ibañez<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Immunogenetics, Instituto Butantan, São Paulo, Brazil, <sup>2</sup> Department of Research, Fondazione Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico (IRCCS), Istituto Nazionale dei Tumori, Milan, Italy, <sup>3</sup> Centre of New Target Discovery (CENTD), Instituto Butantan/GlaxoSmithKline (GSK)/Sao Paulo Research Foundation (FAPESP), São Paulo, Brazil, <sup>4</sup> Department of Medicine and Surgery, University of Milano-Bicocca, Milan, Italy, <sup>5</sup> Diagnosis Center, Instituto Pasteur, São Paulo, Brazil, <sup>6</sup> Laboratory of Biophysics, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil, <sup>7</sup> Laboratory of Immunopathology, Instituto Butantan, São Paulo, Brazil, <sup>8</sup> Laboratory of Development and Innovation, Instituto Butantan, São Paulo, Brazil, <sup>9</sup> Development and Innovation Laboratory, Center of Innovation and Development, Instituto Butantan, São Paulo, Brazil, <sup>10</sup> ALCHEMY – Innovation, Research & Development Ltd., University of São Paulo, São Paulo, Brazil

We identified *Pycard* and *BC017158* genes as putative effectors of the Quantitative Trait locus (QTL) that we mapped at distal chromosome 7 named *Irm1* for Inflammatory response modulator 1, controlling acute inflammatory response (AIR) and the production of IL-1 $\beta$ , dependent on the activation of the NLRP3 inflammasome. We obtained the mapping through genome-wide linkage analysis of Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) in a cross between High (AIRmax) and Low (AIRmin) responder mouse lines that we produced by several generations of bidirectional selection for Acute Inflammatory Response. A highly significant linkage signal (LOD score peak of 72) for *ex vivo* IL-1 $\beta$  production limited a 4 Mbp interval to chromosome 7. Sequencing of the locus region revealed 14 SNPs between “High” and “Low” responders that narrowed the locus to a 420 Kb interval. Variants were detected in non-coding regions of *Itgam*, *Rgs10* and *BC017158* genes and at the first exon of *Pycard* gene, resulting in an E19K substitution in the protein ASC (apoptosis associated speck-like protein containing a CARD) an adaptor molecule in the inflammasome complex. Silencing of *BC017158* inhibited IL1- $\beta$  production by stimulated macrophages and the E19K ASC mutation carried by AIRmin mice impaired the *ex vivo* IL-1 $\beta$  response and the formation of ASC specks in stimulated cells. IL-1 $\beta$  and ASC specks play major roles in inflammatory reactions and in inflammation-related diseases. Our results delineate a novel genetic factor and a molecular mechanism affecting the acute inflammatory response.

**Keywords:** Inflammation, genome screening, cancer, ASC specks, Interleukin-1, Interleukin-6, *Pycard*, *BC017158*



## INTRODUCTION

Inflammation is a complex process involved in the evolution of several diseases, such as Alzheimer, cancer, asthma, metabolic, cardiovascular and chronic rheumatic diseases and in aging (1–5). Despite several molecular mechanisms of inflammation being well known, such as processes related to the recruitment of immune and inflammatory cells, the release of chemical mediators (such as cytokines) and tissue repair, the genetic mechanisms involved in inflammation development and progression are still not clear (6–8).

To investigate this point we make use of AIRmax and AIRmin mouse lines that we obtained after several generations of bidirectional phenotypic selective breeding, on the basis of acute inflammatory reactivity (AIR) (9). The selection phenotypes for the inflammatory response were the number of infiltrated leukocytes and exudated proteins content in local inflammatory exudate, harvested 24h after subcutaneous injection of polyacrylamide beads (Biogel). At the end of the selection, the phenotypic divergence between the two lines reached about 30 fold in the number of infiltrated cells and 2.5-fold in proteins concentration in inflammatory exudates, as a result of the differential accumulation of alleles with opposite effects at various Quantitative Trait Loci (QTLs) influencing the acute inflammation intensity in each line.

Previously in order to map these loci, we carried out a SNP based whole genome linkage study in a population of 290 (AIRmax x AIRmin)F2 mice obtained by crossing AIRmax and AIRmin mouse lines. We identified one major quantitative trait locus (QTL) on chromosome 7 named *Inflammatory response modulator 1 (Irm1)* which spanned about 15 Mbp and contained 230 genes (10). This locus modulates inflammatory phenotypes such as leukocyte influx in inflammatory exudates and in particular the interleukin-1beta (IL-1 $\beta$ ) production by blood leukocytes after NLPR3 inflammasome activation (10).

In the present study, with the aim of identifying *Irm1* candidate genes, we tested *Irm1* locus association with IL-1 $\beta$  levels and other inflammation phenotypes in a larger (AIRmax x AIRmin)F2 pedigree comprising about 700 mice. To investigate the molecular bases of inflammation we looked for single nucleotide polymorphisms (SNPs) in 4 genes within the *Irm1* locus that were possibly involved in the modulation of IL-1 $\beta$  production and/or of acute inflammation. Results of the present study will help in the identification of genes and molecular mechanisms that modulate the intensity of the inflammatory response.

## MATERIALS AND METHODS

### Mice and Treatments

AIRmax and AIRmin lines (formally designated Ibut : AIRH and Ibut : AIRL at the Institute for Laboratory Animal Research, National Research Council) and crosses were developed and maintained at the animal facilities of the Laboratory of Immunogenetics of the Butantan Institute, São Paulo, Brazil. An (AIRmax x AIRmin)F2 mice population, consisting of 693 mice (352 males and 341 females) was generated as described (9).

AIRmin sublines were produced by genotype assisted mating for the fixation of *Pycard* C and T alleles in homozygosity.

### Quantification of the Inflammatory Response

For *in vivo* acute inflammatory response, pouches were formed in a previously shaved dorsal region of mice by sc injection of 750  $\mu$ L sterile suspension of 67% Biogel P100 (Biorad) (53mg dry weight/mL) in phosphate-buffered saline (PBS). Local infiltrated leukocytes were harvested after 24h and quantified by total cell counting in Malassez chambers. Cell free supernatants were used for IL-6 quantification by ELISA.

For *ex vivo* IL-1 $\beta$  production by inflammasome activation, whole heparinized blood (250  $\mu$ L) was diluted in 200  $\mu$ L RPMI 1640 medium supplemented with 1% FCS (Vitrocell), gentamycin (Sigma Aldrich) and inflammatory cells present in blood samples were stimulated to produce IL-1 $\beta$  with 50  $\mu$ L *Escherichia coli* LPS (1  $\mu$ g/mL) (Sigma-Aldrich) for 3h at 37°C. Then, 5 mM ATP (Sigma-Aldrich) was added and blood samples were incubated for another 1h at 37°C, to allow for IL-1 $\beta$  release from cells. Blood samples were centrifuged at 400  $\times$  g for 10 min to remove cells and collect supernatants containing IL-1 $\beta$ . Secreted IL-1 $\beta$  levels in plasma and IL-6 levels in inflammatory exudates were measured with the OptEIA Mouse IL-1 $\beta$  or Mouse IL-6 ELISA kits (BD Biosciences, San Diego, CA), respectively.

### Caspase 1 Activation

Mice were sacrificed by CO<sub>2</sub> inhalation and then the peritoneal cavity was washed with 5 mL of PBS. The cell suspension was washed twice with PBS by centrifugation and the concentration was adjusted to 10<sup>6</sup> cells/mL. Cells 2 x 10<sup>6</sup> per well were distributed in 6-well plates for adhesion (about 1 to 2 h) at 37°C 5% CO<sub>2</sub>. The supernatant was discarded, and the cells were removed with a cell scraper. Cell extracts were prepared by suspending 10<sup>6</sup> cells in 500  $\mu$ L of 50 mM Hepes buffer (pH 7.4) and lysed by sonication (40s, 40Hz). Cell debris were pelleted for 5 min at 12000 g, and the supernatants were used for protein quantification (Bradford) and Caspase-1 assay. Briefly, 100  $\mu$ L of supernatants were added to 1mL of 50 mM Hepes buffer (pH 7.4) plus 5 mM DTT, in a 1 cm cuvette at 37°C. The substrate (10  $\mu$ M Abz-YVADNQ-EDDnp), was added, and the fluorescence was measured using a spectrofluorimeter (F2500, Hitachi co., Japan) under agitation for 30 min and the slope was normalized as total protein in each point as relative fluorescence units (RFU/min. $\mu$ g). The specific inhibitor Ac-YVAD-CMK (5 $\mu$ M) was also tested to ensure substrate specificity.

### Carcinogen Treatment

Groups of male and female mice (30 to 40 in each group) were injected ip with 300 mg/Kg bw urethane (Carbamic acid ethyl ester, Sigma-Aldrich, St Louis MO) seven days after birth. Mice were euthanized 270 days later for analysis of incidence, multiplicity and volume of lung and liver tumors.

All procedures were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of Butantan Institute (protocol n° 3587190320), and all animals received humane care, according to the criteria outlined in the “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” prepared by the National Academy of Sciences and published by the National Institutes of Health.

## Histopathology

Lung and liver tissue fragments were collected and fixed in 10% formalin buffer for 24 h. After fixation, the samples were dehydrated in alcohol (70%, 80%, 90% and 100%), diaphanized in xylene, embedded in paraffin and the blocks sectioned with a thickness of 5  $\mu\text{m}$ . The slides were mounted and stained with hematoxylin - eosin (H&E) and by special staining with Periodic Acid Schiff (PAS).

## Genome-Wide SNP Genotyping and Phenotype Evaluation

Herein we take advantage of previous genotyping data of (AIRmax  $\times$  AIRmin)F2 mice [described in reference (11)]. The phenotypes under investigation were the number of leukocytes and the concentration of IL-6 in inflammatory exudates harvested 24h after Biogel P100 sc injection, and IL-1 $\beta$  production, measured in mouse blood samples as previously described (9, 10).

## Deep Sequencing of the *Irm1* Locus

We selected 16 (AIRmax  $\times$  AIRmin)F2 mice showing extreme high or low IL-1 $\beta$  levels after LPS + ATP treatment. Genomic DNA was extracted from tail tips of these 16 mice with E.Z.N.A. Tissue DNA kit (Omega Bio-Tek Instruments, Watford, UK) and quantified by fluorimetry with the Quant-iT PicoGreen dsDNA quantification kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Deep custom Illumina sequencing of the *Irm1* locus (from 124 to 128 Mb) in these 16 genomic DNA samples was carried out. The samples were analyzed using the following bioinformatics pipeline: 1) Conversion of the sequencing data from bcl to qseq; 2) Conversion of the qseq files to Sanger fastq; 3) Alignment of the fastq to the Mouse genome reference (GRCm38/mm10); 4) Filtering of the alignment data (Sam) for reads mapped in proper pair; 5) Conversion to a Binary alignment file (Bam); 6) Generation of Pileup data; 7) Pileup filtering using the following criteria: read coverage  $\geq$  10; variant coverage  $\geq$  3; variant ratio  $\geq$  0.2; mapping quality  $\geq$  30 (individual variants); read quality  $\geq$  30 (individual variants); 8) Merging of filtered Pileup data with SNPs from dnSNP137. Almost 100% of the 4Mb region was covered and the average read depth was around 75-80.

## Cell Culture and Treatment for IL-1 $\beta$ Release Measurement

The mouse macrophage cell line J774A.1 (ATCC<sup>®</sup> TIB67<sup>™</sup>), kindly provided by Dr. S. Recalcati (Università degli Studi di Milano, Milan, Italy) was cultured in DMEM (Lonza) supplemented with 2 mM L-glutamine (Lonza) and 10% Fetal Bovine Serum (PBI). Cells were treated for 3h with 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  LPS (Sigma-Aldrich) to stimulate IL-1 $\beta$  production and for 1h with 2.5 mM ATP (Sigma-Aldrich) to induce IL-1 $\beta$  secretion into the supernatant. IL-1 $\beta$  levels in supernatants were measured by ELISA using Quantikine<sup>®</sup> Mouse IL1- $\beta$  kit (R&D Systems Europe Ltd., Abingdon, UK). The optical densities were detected in the Tecan ULTRA microplate reader (absorbance wavelength: 450 nm; wavelength correction for optical imperfections of the plate: 570 nm; Tecan Group, Mannedorf/Zurich, Switzerland).

## Quantitative Real-Time PCR (RT-qPCR)

Total RNA was extracted from the J774.1 cell line with the RNeasy Midi Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). Total RNA was purified with the RNeasy MinElute Cleanup, (Qiagen) and quantified in the Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop products, Wilmington, DE, USA). Integrity of the total RNA was evaluated using the RNA 6000 Nano Assay Kit (Agilent Technologies, Palo Alto, CA).

J774.1 RNA (1  $\mu\text{g}$ ) was reverse-transcribed to cDNA with the Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, Basel, Switzerland) according to the manufacturer's instructions. Intron-spanning primers were designed for cDNA sequences of BC017158 (*BC017158*), integrin subunit alpha M (*Itgam*), regulator of G-protein signaling 10 (*Rgs10*), and hypoxanthine phosphoribosyl transferase 1 (*Hprt1*), as reference gene. Twenty-five ng of J774.1 cDNA was used in qPCR using Fast SYBR<sup>®</sup>Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) with 300 nM gene-specific PCR primers (**Supplemental Table 1**) or TaqMan<sup>®</sup> universal master mix no amperase UNG (Applied Biosystems). Relative expression levels were calculated using the comparative Ct method using one of the synthesized cDNA samples as calibrator.

## TaqMan Genotyping of *Irm1* SNPs

Custom TaqMan SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA) were designed for four of the SNPs identified in a 420 kb region (**Table 1**) of the *Irm1* locus (**Supplemental Table 2**). The assays for each SNP were run in a StepOne Plus real-time thermocycler (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions, using the TaqMan<sup>™</sup> Genotyping Master Mix and 10 ng genomic DNA per sample. DNA from mice carrying homozygous or heterozygous *Pycard* genotypes were used as controls.

## Gene Silencing

Expression of *BC017158*, *Itgam*, *Pycard* and *Rgs10* genes was silenced in J774A.1 (ATCC<sup>®</sup> TIB67<sup>™</sup>) cells using specific siRNAs. Gene-silencing was carried out following a reverse-transfection protocol using the HiPerFect Transfection Reagent (Qiagen, Cambridge, MA, USA). In detail, a combination of four siRNA for each gene (Qiagen, **Supplemental Table 1**) was spotted in 48-well plates. For the *Pycard* gene an additional unique siRNA (**Supplemental Table 1**, Thermo Fisher Scientific) was used, since the pool of the four Qiagen siRNAs did not silence the expression of this gene. HiPerFect reagent (2  $\mu\text{L}$ ), diluted in serum free medium, was added to the pre-spotted siRNAs and incubated for 10 min at room-temperature to allow formation of the transfection complex. Sixty-thousand cells per well were seeded on top of the siRNA-transfection reagent complexes into a final volume of 120  $\mu\text{L}$ . Cells were incubated at 37°C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> for 6h and then fresh medium was added to each well for a final siRNA concentration of 25 nM (6.25 nM each oligonucleotide). AllStars Negative Control siRNA (Qiagen) was used as a scrambled siRNA control. At 72h after transfection cells were treated for IL-1 $\beta$  production, as described above; supernatants were collected and used in the ELISA whereas total RNA was extracted from cells and reverse-transcribed using the FastLane Cell cDNA kit (Qiagen) in

order to verify, by RT-qPCR, the actual silencing of target genes. RT-qPCR analysis was performed using the QuantiFast<sup>®</sup> SYBR<sup>®</sup> Green and QuantiTect<sup>®</sup> Primer Assays (Qiagen, **Supplemental Table 1**) following the manufacturer's instructions. *Hmbs* was used as a reference to normalize expression levels. Reactions were run in duplicate on the real-time PCR 7900HT system (Applied Biosystems). Gene silencing and ELISA were repeated three times, **Supplemental Figures 1, 2A**.

## Production of J774A.1 Cells Stably Expressing WT and Mutated ASC Forms Linked to GFP

J774A.1 cells (ATCC<sup>®</sup> TIB67<sup>™</sup>) were purchased from BCRJ (Rio de Janeiro Cell Bank).

Single-guide RNA design for CRISPR/Cas9 gene editing: We used the sgRNA design software from Addgene to knock out the whole *Pycard* gene. The templates consisted of 200 nt DNA sequences of the 3800 bp ENSMUST00000033056.4 transcript each spanning 100 nt of either 5' or 3' UTR sequence plus 100 nt of upstream or downstream sequence, respectively. The best guides considering the PAM sequence in the gene, necessary for Cas9 activity and with the lowest off-target scores are presented in **Supplemental Figure 2A**. The diluted oligos were annealed and phosphorylated with 1 μL (10U) T4 PNK kinase (New England Biolabs) in T4 ligation buffer (LB) containing ATP (Adenosine 5'-triphosphate, 10mM - New England Biolabs), in a PTC-200 thermocycler (MJ Research, Waltham, USA) with the following parameters: 37°C for 30 min, 95°C for 5 min and ramp down to 25°C at 5°C min<sup>-1</sup>. The phosphorylated and annealed oligos were diluted 1:200 for cloning into LentiCRISPR v2 plasmid (Addgene) (50 ng/mL), using 2 μL oligo duplex, 10mM DTT (Thermo Fisher Scientific), 10mM ATP, 10U BsmBI enzyme (Esp3I (BsmBI) Thermo Fisher Scientific), 1500 U T7 ligase (New England Biolabs), 2 μL of 10X Tango buffer and H<sub>2</sub>O for a final volume of 20 μL. We included a no-insert control replacing oligos with water (12). The reaction was treated with PlasmidSafe ATP-dependent exonuclease (Epicentre, Illumina) (37°C for 30 min, followed by 70°C for 30 min) to digest the residual linearized DNA. Competent *E. coli* Stbl strain (One Shot Stbl3 chemically competent *E. coli* - Thermo Fisher Scientific) was used for plasmid transformation on ice for 10 min, 42°C for 30 sec and ice for 2 min, suspended in SOC medium and plated in LB plate containing 100 μg/mL ampicillin and incubated overnight at 37°C. Insert containing colonies were individually cultured in LB medium with ampicillin and after overnight incubation at 37°C, plasmid DNA was purified with Charge Switch Pro Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen). Insertion was confirmed by Sanger sequencing in an ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) from U6 promoter using the forward primer: hU6F - 5' GAGGGCCTATTTCCCATGATT (Position 1 to 22) and the Reverse primer: CMV enhancer - 5' GGGCCATTTACCGTAAGTTATG (Position 445 to 467).

Lentivirus production: an insert containing LentiCRISPR v2 (1.64 pmol) or control pLJM1-EGFP, pCMV-VSV-G (0.72pmol) and psPAX2 (1.3 pmol) (purchased from Addgene) were transfected into HEK293T cells (10<sup>6</sup> cells per well in 6 well

plates) using Lipofectamine +P3000 (Invitrogen). After 5h 30min medium was changed to DMEM (high glucose, pyruvate - Thermo Fisher Scientific) supplemented with GlutaMax (GlutaMax<sup>™</sup> Supplement - Thermo Fisher Scientific) and 10% Fetal Bovine Serum (Vitrocell). Viral suspensions were collected after 48 and 72h incubation and filtered in 0.45 μM PVDF membranes.

Transduction of J774A.1 cells: In an ice bath, 1 mL of each viral preparation and 2 μL polibrene (Hexadimethrine bromide - Sigma Aldrich) (4 mg/mL) were added to 1 mL of cells in suspension (5x10<sup>5</sup>/mL). After spinning down for 5 min/1000 rpm, the mixture was plated in 6 well plates, and incubated for 24h at 37°C/5% CO<sub>2</sub>. Media was changed to complete DMEM medium and 3 days later a previously determined dose of 2 μg/mL puromycin (Puromycin Dihydrochloride - Thermo Fisher Scientific), was added for selection of transduced cells, since the transfer plasmid contains the puromycin resistance gene. After Single cell sorting in FACSaria equipment (BD Biosciences), the clones were expanded in DMEM plus 20%FCS, pyruvate, non-essential amino acids, and 2ME. PCR analysis using primers external to the guides detected 8 clones showing deletion of the *Pycard* gene<sup>-</sup>. (**Supplemental Figure 2B**). In 3 of the clones, we confirmed heterozygous deletion by sequencing and TaqMan genotyping assay (**Supplemental Figures 2C-E**).

## Generation of WT ASC-GFP and E19K ASC-GFP Retrovirus and Transduction of J774 ASC<sup>+/-</sup> Cells

Genes were synthesized at Genone Biotechnologies (Brazil) and cloned into pLJM1-GFP plasmid (Addgene 19319) in a way that GFP was linked to the C-terminal portion of *Pycard* (Sequences in **Supplemental Figure 3**). Viral preparations containing each of the two *Pycard* alleles were produced in HEK293T cells and transduction of J774 ASC<sup>+/-</sup> with the two alleles was performed as described above. GFP-positive cells were sorted in FACSaria and suspensions were cultured in complete DMEM 10% FCS. (**Supplemental Figure 4**).

## Analysis of ASC Specks Formation in AIRmax and AIRmin PBMC

Whole blood from AIRmax and AIRmin mice was obtained by cardiac puncture. Three animals per group were used to obtain a 3 mL pool of blood for PBMC isolation with Ficoll-Paque (density 1.007 g/mL). Briefly, 3 mL of blood was carefully added to 1.5 mL of Ficoll-Paque (Ficoll<sup>®</sup> Paque Plus Sigma-Aldrich) in a conical tube (5mL). After centrifugation (2300 rpm, 20 min, room temperature, w/o breaking) the PBMC layer was washed twice with PBS and split into two equal parts for inflammasome activation as described above. After LPS + ATP stimulation the reaction was stopped by fixing the cells with 4% PHEM-PFA buffer (paraformaldehyde, PHEM buffer: 60 mM PIPES; 25 mM HEPES; 10 mM EGTA; and 2 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 6.9) (Thermo-Fisher) followed by 4% PHEM-PFA 0,1% Triton 100X for permeabilization. The cells were washed with PHEM-glycine for removal of PFA and blocked for 30 min at room temperature with 1% PHEM-BSA. The primary ASC antibody (MERCK cod. 04-147) was incubated overnight (1:250) at 4°C in an orbital shaker. After 2 washes with PBS, the secondary antibody AF647 (1:500) (Invitrogen cod. A21236) was added together with

5 $\mu$ M Hoechst (Thermo cod. 33342) and incubated for 2 hours at room temperature. Ten thousand events of the stained samples were acquired in an Amnis ImageStreamX MKII (Luminex). Images were analyzed using image-based algorithms in the ImageStream Data Exploration and Analysis Software (IDEAS 6.2 - Luminex) (13, 14).

### High Content Screening Analysis of ASC Specks Formation in J774A.1 Cells Overexpressing WT or Mutated ASC-GFP Constructs

Cells 2x10<sup>4</sup>/well were seeded in 96 well plates in a 100  $\mu$ L volume and incubated at 37°C 5% CO<sub>2</sub>. After 24h plates were placed in a confocal microscope (ImageXpress Micro Confocal High-Content Screening (HCS) Imaging System (Molecular Devices) for analysis of real-time formation (time lapse) of ASC specks, after sensitization of cells with LPS and stimulation with ATP. Photos were recorded every 5 minutes up to 2 hours after the addition of ATP.

### Molecular Modeling - Computational Site Directed Mutagenesis Analysis

The three-dimensional (3D) structure and assembly of the mouse ASC inflammasome by combined NMR spectroscopy and cryo-electron microscopy was retrieved from Protein Data Bank, PDB (URL rcsb.org); (15)), entry code 2N1F (16), and the monomer 2N1H:A coordinates were used as template to mutate the amino acid residue Glu (polar, negatively charged), at the nineteenth position, to Lys (polar, positively charged) (E19K), in the N-terminal region (pyrin domain, PYD). The Met1 residue at the N-terminus portion was added. The molecular geometry was optimized, and partial atomic charges were assigned using the CHARMM force field (17). The energy minimized models, wild and mutated monomers, were used as input data for generating the molecular surfaces. The soft molecular surfaces were calculated using a faster and more approximate algorithm than that used for creating a solvent surface. For large molecules, this kind of surface provides better performance. The surfaces were colored according to the interpolated charges (intense blue: positively charged; intense red: negatively charged; white: non-charged) (**Figure 6A**) (Discovery Studio Visualizer 4.0; Accelrys Software Inc., 2005-2013).

### Statistics

Data were analyzed using ANOVA with Tukeys posttest for values with a normal distribution, or *Mann-Whitney U* test for comparison of two populations as indicated in the figure legends. *P*-values <0.05 were considered significant.

## RESULTS

### Reduction of Inflammatory Response Modulator 1 (*Irm1*) Locus Candidate Region

To increase the power of the statistical association between the *Irm1* locus and IL-1 $\beta$  production observed in our previous work (10) we carried out an additional linkage analysis between

(AIRmax x AIRmin)F2 genotype and inflammatory phenotypes, but in a larger pedigree including 693 (AIRmax x AIRmin)F2 mice. The results confirm and strengthen the mapping of the major *Irm1* locus controlling inflammation in chromosome 7, which was mapped in our earlier study (10). The LOD score peak for cell influx in inflammatory exudate increased from 3.61 to 15.74 and the LOD score for IL-1 $\beta$  production increased from 9.35 to 72.7 in the present F2 population. Thus, the large pedigree size allowed for a higher resolution mapping that narrowed the candidate region from 14 Mb to ~4 Mb in length, between rs13479505 (124486166 bp) and rs32381191 (128414876 bp), which includes 125 genes. IL-6 concentration in inflammatory exudates, which had not been tested in the previous analysis, showed a single and highly significant association (LOD score=18.4) overlapping the *Irm1* locus region (**Figures 1A, B**). Besides the *Irm1* locus, there are significant linkage signals for infiltrating cell numbers in chromosomes 4, 6 and 11 and one that reached suggestive level in chromosome 13.

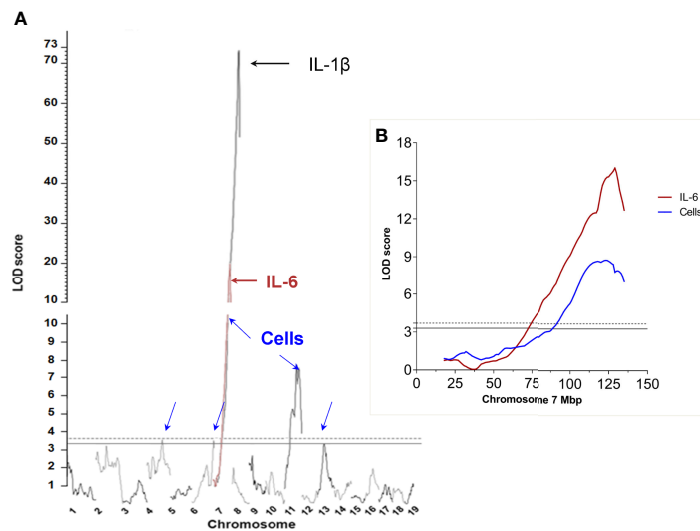
### BC07158, Pycard, Itgam and Rgs10 Genes Are the Putative Candidate Genes of *Irm1* Locus

The genomes of AIRmax and AIRmin mice have not been sequenced. Therefore, detailed SNP information is not available for these strains. In order to identify DNA variants inside the *Irm1* locus, the narrowed *Irm1* locus interval (~4Mb) was sequenced in 16 (AIRmax x AIRmin)F2 mice showing extreme phenotypes, that is, 8 with the highest (>5000 pg/mL) and 8 with the lowest (<100 pg/mL) levels of IL-1 $\beta$  production by blood leukocytes after LPS + ATP treatment, respectively.

The analysis of deep sequencing genotyping data identified 14 single nucleotide polymorphisms (SNPs) with association *P* values with the IL- $\beta$  levels of  $p < 7.49 \times 10^{-8}$  and False Discovery Rate (FDR) < 1x10<sup>-4</sup> between the two groups and the target region was narrowed to approximately 420 Kb. Among these SNPs, one is located in the intronic region of *BC017158*, two in the intronic region and one in the 3'-UTR of the *Itgam* gene, one in the *Pycard* coding region, one in the intronic region of *Rgs10* and eight in intergenic regions (**Table 1**). Linkage analysis in the (AIRmax x AIRmin)F2 population, run after inclusion of these SNPs, increased the LOD score to 92 for IL-1 $\beta$  and did not change the LOD score for number of infiltrating cells (Cells) or IL-6 levels in Biogel induced inflammatory exudates. **Figure 2** shows the dosage effect for IL-1 $\beta$  of the *Irm1* locus candidate genes alleles analyzed in all 693 (AIRmax x AIRmin)F2 mice.

### Silencing of BC017158 Reduces IL-1 $\beta$ Production

To understand whether the genes presenting polymorphisms are involved in the modulation of IL-1 $\beta$  production, we carried out an *in vitro* experiment in J774A.1 mouse macrophage cell line. We silenced *BC017158*, *Itgam*, *Pycard* and *Rgs10* expression in J774A.1 cells and then we measured mRNA levels by RT-qPCR and IL-1 $\beta$  release by ELISA in the supernatant of silenced and of unsilenced cells stimulated with LPS and ATP. Unfortunately, *Pycard* silencing was not so effective (i.e. we observed a less than



**FIGURE 1** | Genome wide genetic linkage analysis of loci affecting inflammatory response phenotypes in (AIRmax x AIRmin)F2 mice: **(A)** Number of infiltrating leukocytes (Cells) blue arrows, IL-6 concentration in Biogel-induced inflammatory exudate (red line and brown arrow) ex vivo IL-1 $\beta$  production by blood leukocytes stimulated with LPS and ATP (black arrow). **(B)** Detail of the peak LOD score for IL-6 levels (brown curve) and number of infiltrated cells (blue curve) at chromosome 7. Significance thresholds at  $\alpha=0.1$  (continuous horizontal line) and  $\alpha=0.05$  (dashed horizontal line).

2-fold down regulation). The results of this experiment showed that the silencing of *BC017158* gene determined a reduction of IL-1 $\beta$  levels ( $P < 0.001$ ) when compared to unsilenced cells, whereas no differences were observed in the levels of IL-1 $\beta$  production between unsilenced cells and cells silenced for *Itgam* and *Rgs10* (Table 2; Supplemental Figure 1).

### Pycard Genotypes Affect Inflammasome Driven IL-1 $\beta$ Production and Caspase-1 Activation in AIRmin Mice

Next we carried out a series of *in vivo* and *in vitro* experiments for the functional analysis of the *Pycard* C 127.993.599 T

polymorphism. Analysis of the frequency of this SNP in the parental AIRmax and AIRmin lines, revealed that the *Pycard* (C) allele was fixed in homozygosis in AIRmax mice during the selection process whereas the frequency of the T and C alleles are 61% and 39%, respectively, in AIRmin mice. We then produced AIRmin sublines bearing the 3 *Pycard* genotypes *Pycard*<sup>C/C</sup>, *Pycard*<sup>C/T</sup> and *Pycard*<sup>T/T</sup> by genotype-assisted mating. With these sublines we could evaluate the effect of *Pycard* variants on inflammatory response and IL-1 $\beta$  production under the influence of AIRmin genetic background.

Genotypes of the 4 genes mapping at the *Irm1* locus in AIRmax and AIRmin mice and in the AIRmin sublines are presented in

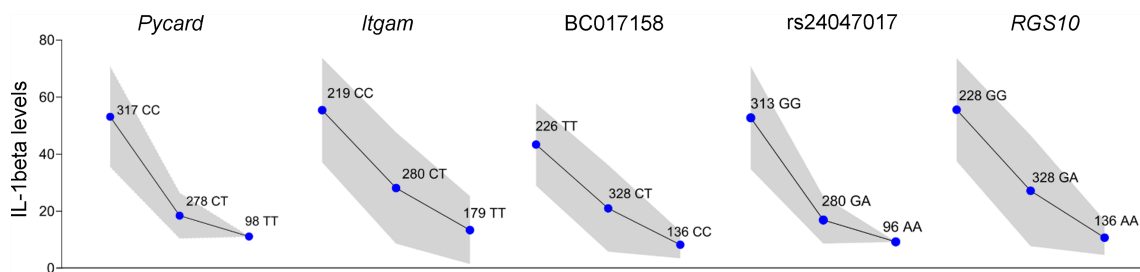
**TABLE 1** | Deep sequencing of the *Irm1* locus in 16 (AIRmax x AIRmin)F2 mice with extreme phenotypes for the IL-1 $\beta$  production.

Position	Phenotype group Numbers per Genotype		P-value <sup>#</sup>	FDR	SNP	Gene	Gene region
	HighIL1 $\beta$	LowIL1 $\beta$					
127993599	8CC	5CT;3TT	7.49E-08	7.36E-05	NA*	<b>Pycard</b>	coding
128019362	8CC	5CT;3TT	7.49E-08	7.36E-05	NA*	NoGene	/
128025368	8AA	4AG;4GG	7.49E-08	7.36E-05	rs254560907	NoGene	/
128029428	8CC	4CA;4AA	7.49E-08	7.36E-05	rs21219299	NoGene	/
128089822	8CC	4CT;4TT	7.49E-08	7.36E-05	rs50943650	<b>Itgam</b>	intron
128106432	8GG	4CC;4GC	7.49E-08	7.36E-05	rs26084205	<b>Itgam</b>	intron
128117516	8AA	4AT;4TT	7.49E-08	7.36E-05	rs32042651	<b>Itgam</b>	utr-3
128226371	8GG	4GA;4AA	7.49E-08	7.36E-05	rs47642836	NoGene	/
128276629	8TT	4TA;4AA	7.49E-08	7.36E-05	rs23194730	<b>BC017158</b>	intron
128310294	8GG	5AA;3GA	7.49E-08	7.36E-05	NA*	NoGene	/
128312770	8TT	8 DC	4.60E-09	6.34E-05	rs24047017	NoGene	/
128356485	8CC	7C/DT;1DT	7.49E-08	7.36E-05	NA*	NoGene	/
128359768	8TT	7T/DA;1DA	7.49E-08	7.36E-05	rs23254339	NoGene	/
128414876	8GG	4GA;4AA	7.49E-08	7.36E-05	rs32381191	<b>Rgs10</b>	intron

\*No annotated SNP available at this position.

<sup>#</sup>Association P-values of each SNP with the IL-1 $\beta$  levels from the tested F2 mice.

D, one base deletion; FDR, false discovery rate. Genes are highlighted in bold.



**FIGURE 2** | *Irm1* locus on chromosome 7 modulates IL-1  $\beta$  production in (AIRmax x AIRmin)F2 mice. Allele-dosage effect of the genotypes at *Irm1* locus on the IL-1  $\beta$  production (square root transformed) by blood leukocytes stimulated with LPS and ATP tested in the whole (AIRmax x AIRmin)F2 population. Values expressed as means and SD. ANOVA with Tukeys posttest.  $-\log P \sim 90$  for all markers.

**Table 3.** The three AIRmin sublines are homozygous for the AIRmin derived predominant alleles at *BC017158*, *Itgam* and *Rgs10*, irrespective of the *Pycard* genotypes.

Inflammatory response was measured in AIRmax and in the three AIRmin sublines by the number of infiltrating cells and IL-6 concentration in the Biogel-induced 24h exudate and of the *ex vivo* IL-1 $\beta$  production by circulating leukocytes after LPS and ATP inflammasome activation (**Figure 3**). IL-1 $\beta$  levels were similar in AIRmax ( $4.5 \pm 0.4$  ng/mL) and AIRmin<sup>*Pycard*C/C</sup> ( $3.4 \pm 2.4$  ng/mL) mice, although this last group presented increased variation in secreted IL-1 $\beta$  probably due to interference from other genes of the *Irm1* locus or from their genetic background. AIRmin<sup>*Pycard*C/T</sup> produced  $0.3 \pm 0.5$  and AIRmin<sup>*Pycard*T/T</sup>  $<0.05$  ng/mL IL-1 $\beta$  (**Figure 3A**). It is of note that the difference between AIRmax and AIRmin<sup>*Pycard*C/C</sup> reached the significance level of  $p < 0.1$  suggesting that their responses are different. However, we emphasize that the most important result of this experiment is the up regulation of IL-1 $\beta$  production caused by the *Pycard* WT allele in homozygosis in AIRmin mice. On the other hand, leukocyte influx and IL-6 levels in inflammatory exudates were similar in the 3 AIRmin sublines and significantly different from AIRmax (**Figures 3B, C**). Accordingly to IL-1 $\beta$  results, the presence of the *Pycard* C allele in homozygosis resulted in higher Caspase-1 activation when compared to mice carrying the homozygous *Pycard* TT genotype (**Figure 3D**). Again AIRmin<sup>*Pycard*C/C</sup> mice presented a lower caspase-1 activity than AIRmax, but a higher activity when compared with the AIRmin<sup>*Pycard*T/T</sup> mice ( $p < 0.05$ ). These results point to the major effect of *Pycard* alleles in inflammasome activation and IL-1 $\beta$  production, without influencing the Biogel-induced acute inflammatory reaction.

### Pycard Genotypes Affect Tumor Development in AIRmin Mice

AIRmax mice are resistant and AIRmin are susceptible to the development of lung tumors induced by the carcinogen urethane (18). On the other hand, AIRmax are susceptible and AIRmin are resistant to developing liver tumors (19). We then analyzed the possible role of *Pycard* genotypes in the behavior of the AIRmin sublines carrying WT or mutated gene alleles. The animals were treated at 7 days after birth with urethane (300 mg/Kg bw) and tumors in internal organs were analyzed at 270 days. In this experiment we observed a significant reduction in the multiplicity and total volume of lung tumors in AIRmin<sup>*Pycard*C/C</sup> when compared to AIRmin<sup>*Pycard*T/T</sup> mice (**Figures 4A, B**). Accordingly, AIRmin<sup>*Pycard*T/T</sup> were more resistant to developing liver tumors than the AIRmin<sup>*Pycard*C/C</sup> mice (**Figures 4D, E**).

In the macroscopic examination of the lung tissue, it is possible to observe five nodules distributed between the right and left lobes; in the microscopic examination the tumor distribution is 88% of the lobular area (**Figure 4C1**). The histopathological examination reveals an adenocarcinoma *in situ* well differentiated with extensive areas with glandular arrangement and invasive lesions originating from the large bronchi (**Figure 4C2-3**). The presence of neoplastic emboli in the lumen of blood and lymph vessels suggests possible metastasis (**Figure 4C4**). PAS staining shows excessive mucin accumulation in approximately 50% of the neoplastic area, characterizing mucinous adenocarcinoma (**Figure 4C5-6**).

Macroscopic histopathological examination of the liver tissue shows a nodule in the hepatic lobe (**Figure 4F**) and microscopic analysis reveals a well-delimited neoplastic mass with

**TABLE 2** | mRNA levels after gene silencing in J774A.1 cells and IL-1 $\beta$  production after stimulation with LPS + ATP. Results were from two independent experiments.

Gene	Relative quantity* (mean $\pm$ sd)	P-value $\wedge$	IL-1 $\beta$ # (mean $\pm$ sd)	P-value $\wedge$
<i>BC017158</i>	0.2 $\pm$ 0.06	0.008	0.02 $\pm$ 0.01	0.0001
<i>Itgam</i>	0.04 $\pm$ 0.07	0.008	0.8 $\pm$ 0.08	0.06
<i>Pycard</i>	0.6 $\pm$ 0.04	0.05	0.6 $\pm$ 0.02	0.001
<i>Rgs10</i>	0.05 $\pm$ 0.07	0.06	0.5 $\pm$ 0.07	0.06

\*mRNA levels calculated using control cells as reference; sd, standard deviation.

#Ratio between IL-1 $\beta$  levels measured in silenced and in control cells.

$\wedge$  One-way ANOVA P-value.

**TABLE 3** | Genotypes of AIRmax and AIRmin mice and of AIRmin sublines of the 4 genes mapping at *Irm1* locus.

Mice	Genotypes			
	<i>Pycard/ASC</i>	<i>Itgam</i>	<i>BC017158</i>	<i>Rgs10</i>
AIRmax	CC	CC	TT	GG
AIRmin*	4CC:5CT:12TT	1CC:5CT:15TT	1TT:5TA:15AA	1GG:5GA:15AA
AIRmin <sup><i>PycardC/C</i></sup>	CC	TT	AA	AA
AIRmin <sup><i>PycardC/T</i></sup>	CT	TT	AA	AA
AIRmin <sup><i>PycardT/T</i></sup>	TT	TT	AA	AA

Number of mice: AIRmax (10♂ and 13♀); AIRmin (11♂ and 10♀); AIRminCC (4♂ and 4♀); AIRmin CT (4♂ and 4♀); AIRmin TT (4♂ and 4♀).

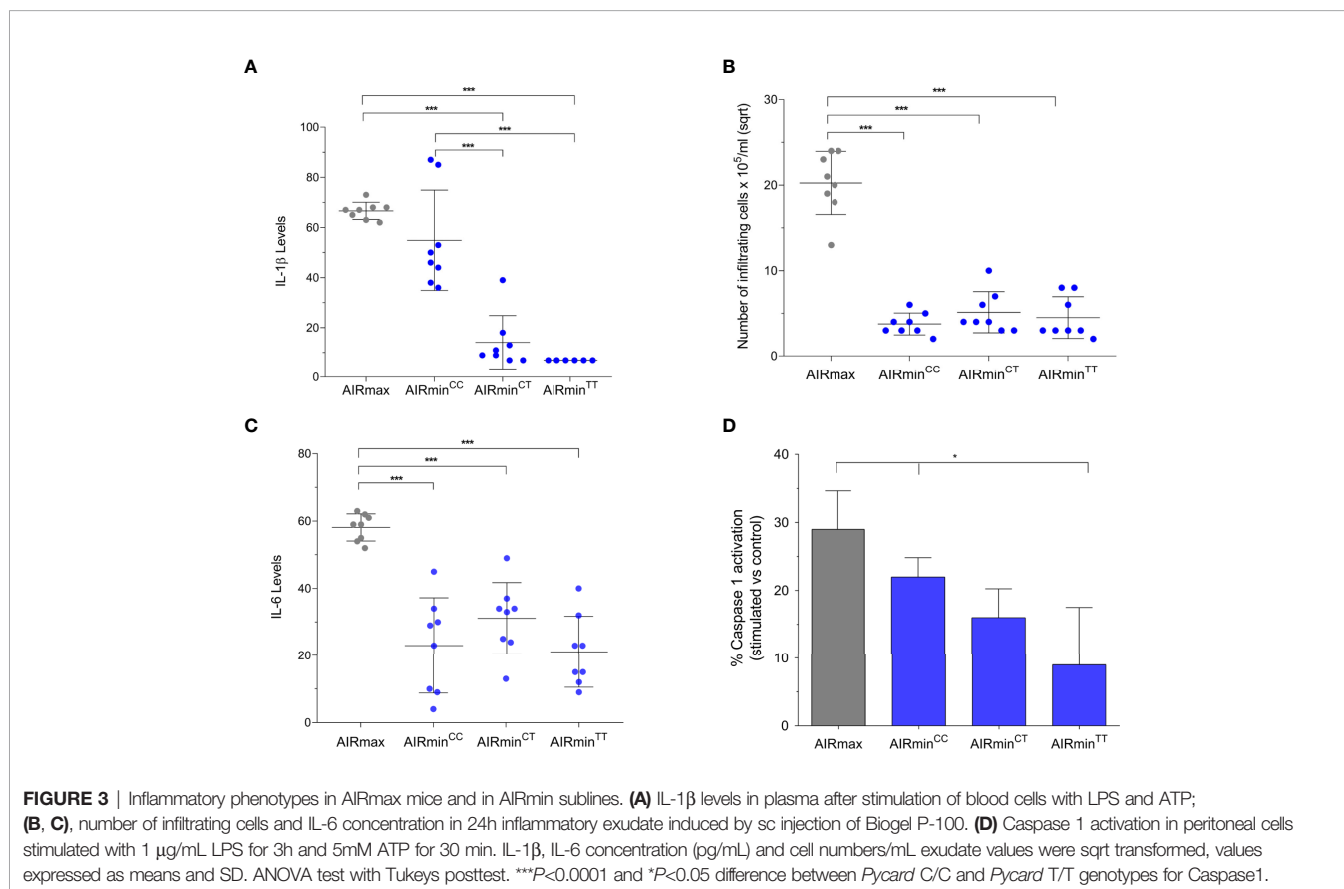
\*The frequency of the AIRmax *Pycard* alleles in AIRmin mice is 31% and of the AIRmax *Itgam*, *BC017058* and *Rgs10* alleles in AIRmin mice is 17%.

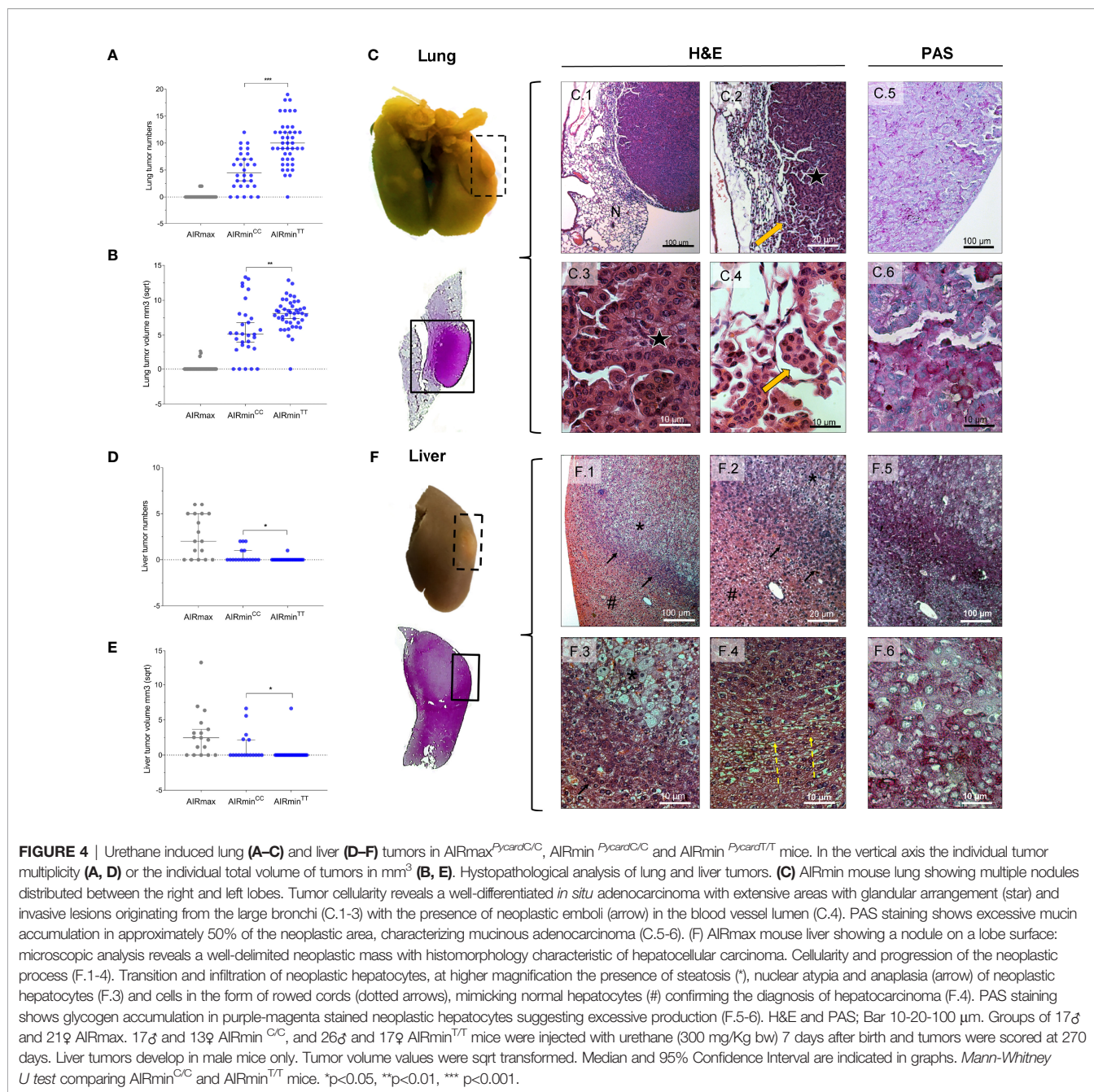
histomorphology characteristics of hepatocellular carcinoma (**Figure 4F1**). In detail, it is possible to see the transition and infiltration of neoplastic hepatocytes (**Figure 4F2**) and at higher magnification, the presence of steatosis, nuclear atypia and anaplasia of neoplastic hepatocytes (**Figure 4F3**). The composition of these cells in the form of cords, lined up mimicking normal hepatocytes, confirms the diagnosis of hepatocarcinoma (**Figure 4F4**). PAS staining shows glycogen accumulation in purple-magenta-stained neoplastic hepatocytes suggesting excessive production (**Figure 4F5-6**).

We thus observed a modulation of carcinogenesis due to *Pycard* genotypes both at the incidence and at the multiplicity and size of malignant tumors.

## E19K Mutation at the Pyrin Domain of *Pycard* Interferes in ASC Specks Formation

The results indicate that the divergent IL-1 $\beta$  production through NLRP3 inflammasome activation between AIRmin and AIRmax mice can be traced to a single point mutation C 127.993.599 T at the *Pycard* gene. This mutation leads to the substitution of glutamic acid to lysine at residue 19 (E19K) in the Pyrin domain of the protein which is important for the assembly of the ASC speck (16). To assess the influence of the E19K mutation in ASC speck formation, Ficoll-Paque isolated blood leukocytes from AIRmax, and of AIRmin<sup>*PycardC/C*</sup> and AIRmin<sup>*PycardT/T*</sup> sublines were stimulated with LPS and ATP. Leukocytes were





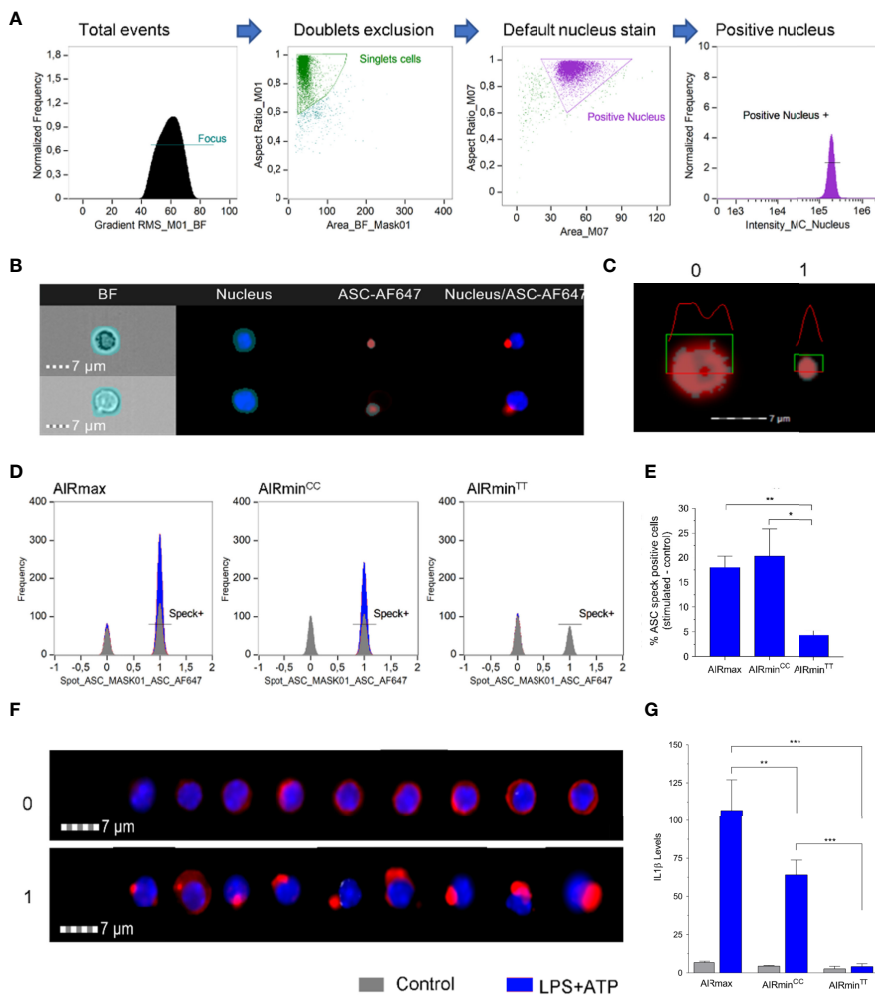
stained for ASC and analyzed by imaging flow cytometry (Figure 5). DAPI stained nucleated cells were separated by the presence or absence of ASC specks (Figures 5D-F). Controls are cells not stimulated with LPS and ATP. The speck positive cells (1) that appear in these control cells are represented in gray color. The ASC speck positive cells that appear as a result of the stimulus are shown in blue. Inflammation stimulation induced the appearance of large numbers of ASC speck positive cells in AIRmax and in AIRmin<sup>Pycard<sup>C/C</sup></sup> (blue curve Figure 5D), with high levels of secreted IL- $\beta$  (Figure 5G) whereas in AIRmin<sup>Pycard<sup>T/T</sup></sup> preparations, ASC speck positive cell number

is similar to that of controls (grey curve). The difference in IL-1 $\beta$  production between AIRmax and AIRmin<sup>Pycard<sup>C/C</sup></sup> is significant (p<0.01), confirming the results presented in Figure 3A. IL-1 $\beta$  levels in homozygous animals for the mutation did not reach the detection limit of the assay (10pg/mL) Figure 5G.

## Computational Site Directed Mutagenesis Analysis

The PYD N-terminal domain of each monomer from the mouse ASC protein presents 6 alpha helices and forms a helical filament in which each PYD interacts with six others through type I, II





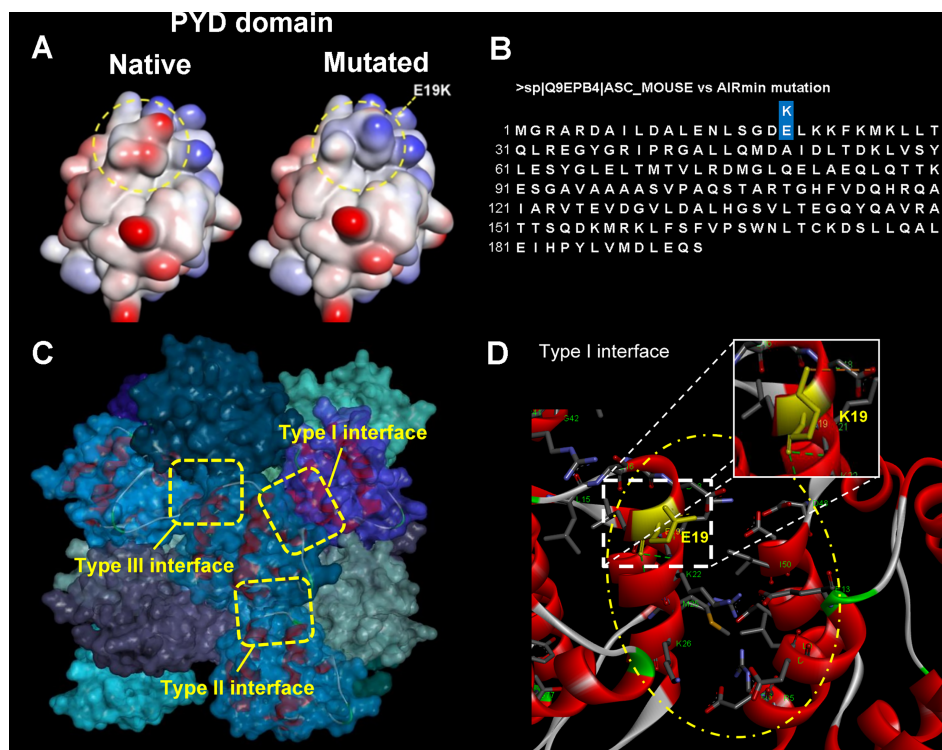
**FIGURE 5** | ASC-speck formation in LPS + ATP stimulated PBMCs from AIRmax<sup>Pycard<sup>C/C</sup></sup>, AIRmin<sup>Pycard<sup>C/C</sup></sup> and AIRmin<sup>Pycard<sup>T/T</sup></sup> mice. **(A)** Gate strategy for selected nucleus positive events in the Amnis ImageStream Imaging Flow Cytometer equipment from Luminex. **(B)** Mask definitions for the channels: BF – Brightfield, Nucleus stained with Hoechst, ASC protein stained with AF647. **(C)** Detail of the mask Spot\_ASC\_mask01 applied in the ASC-AF647 channel showing differences between 0 – ASC diffuse into cytoplasm and 1- ASC speck. **(D)** Representative histograms showing the positive (1) or negative (0) ASC speck cells in control (gray) or LPS+ATP stimulated (blue) PBMC from AIRmax, AIRmin<sup>Pycard<sup>C/C</sup></sup> and AIRmin<sup>Pycard<sup>T/T</sup></sup> mice. **(E)** Percentage of ASC specks containing stimulated cells (LPS+ATP) minus the unstimulated cells **(F)** Images of total events obtained from different regions of histogram to represent the characteristics 0 (ASC diffuse) or 1 (ASC speck). **(G)** IL-1β levels in supernatants of PBMCs from AIRmax, AIRmin<sup>Pycard<sup>CC</sup></sup> and AIRmin<sup>Pycard<sup>TT</sup></sup> activated with LPS+ATP or controls. IL-1β values in pg/mL were sqrt transformed. ANOVA with Tukeys posttest, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.

and III interfaces (PDB ID 2N1F (16) (Figure 6C). The amino acid residues from helices 1 and 4, on subunit/monomer H, and from helix 3, in monomer G, are placed in the type I interface. Regarding type I interface, electrostatic interactions between residues of opposite charges (salt bridges, for instance; Figure 6D) are established contributing to filament stabilization (16). The positively charged side chain of residues K21, K22, K26 (helix 2), and R41 (helix 3), on monomer/subunit H, as well as the negatively charged side chain of residues D6, D10, E13 (helix 1), D48, D51, and D54 (helix 4), on monomer/subunit G, are involved in those electrostatic interactions. It is noteworthy that the E19K mutation is placed in a region defined as type I interface. The computational model obtained from site directed mutagenesis analysis revealed that the E19K mutation

found in AIRmin mice (gene sequence in Figure 6B) does not significantly change the conformational arrangement, but it does change the electronic density distribution regarding the type I interface (Figure 6A). In this regard, the E19K mutation would be predicted to impair filament formation. On the other hand, according to molecular docking simulations run by our research group (data not shown), the E19K mutation seems to not interfere in the interaction process of the PYD domain with the NLRP3 receptor.

### PYCARD E19K Substitution Impairs ASC Speck Formation in J774A.1 Cells

We used CRISPR to knock out the *Pycard* gene in J774A.1 cells (Supplemental Figure 2). While non-edited J774A.1 cells



**FIGURE 6** | Computational modeling of site directed E19K mutation at PYD domain of ASC protein in mouse and ASC speck formation in J774A.1 cells overexpressing WT or mutated E19K ASC. **(A)** Interpolated charge surfaces of ASC PYD in native and E19K mutated monomers (blue color: positively charged region; red color: negatively charged region; white color: non-charged region). **(B)** ASC protein amino acid sequence with the indication of the E19K substitution. **(C)** 3D arrangement of the ASC-PYD filament [PDB ID 2N1F, fifteen monomers (14)]. Side view of the ASC-PYD filament in molecular surface representation. Three asymmetric interaction interface types, I-III, which are characteristic for the filament architecture, are indicated by dashed square rectangles. The E19 residue is located at the type I interface region. **(D)** Electrostatic interactions established in the type I interface (yellow oval form; subunits/monomers H and G). The amino acid residues are shown in stick models, where carbon atoms are in gray color, oxygens in red, nitrogen atoms in blue, sulfur in orange, and hydrogens in white; the protein subunits are in ribbon representation (Discovery Studio Visualizer 4.0; Accelrys Software Inc., 2005-13). We present two different fields (upper and lower) for each cell preparation that were observed at 5 and 120 minutes after the stimulus.

produced 600 pg/mL IL-1 $\beta$  after stimulation with LPS and ATP, IL-1 $\beta$  levels in supernatants of *Pycard* deficient stimulated cells were below the detection limit of the ELISA method.

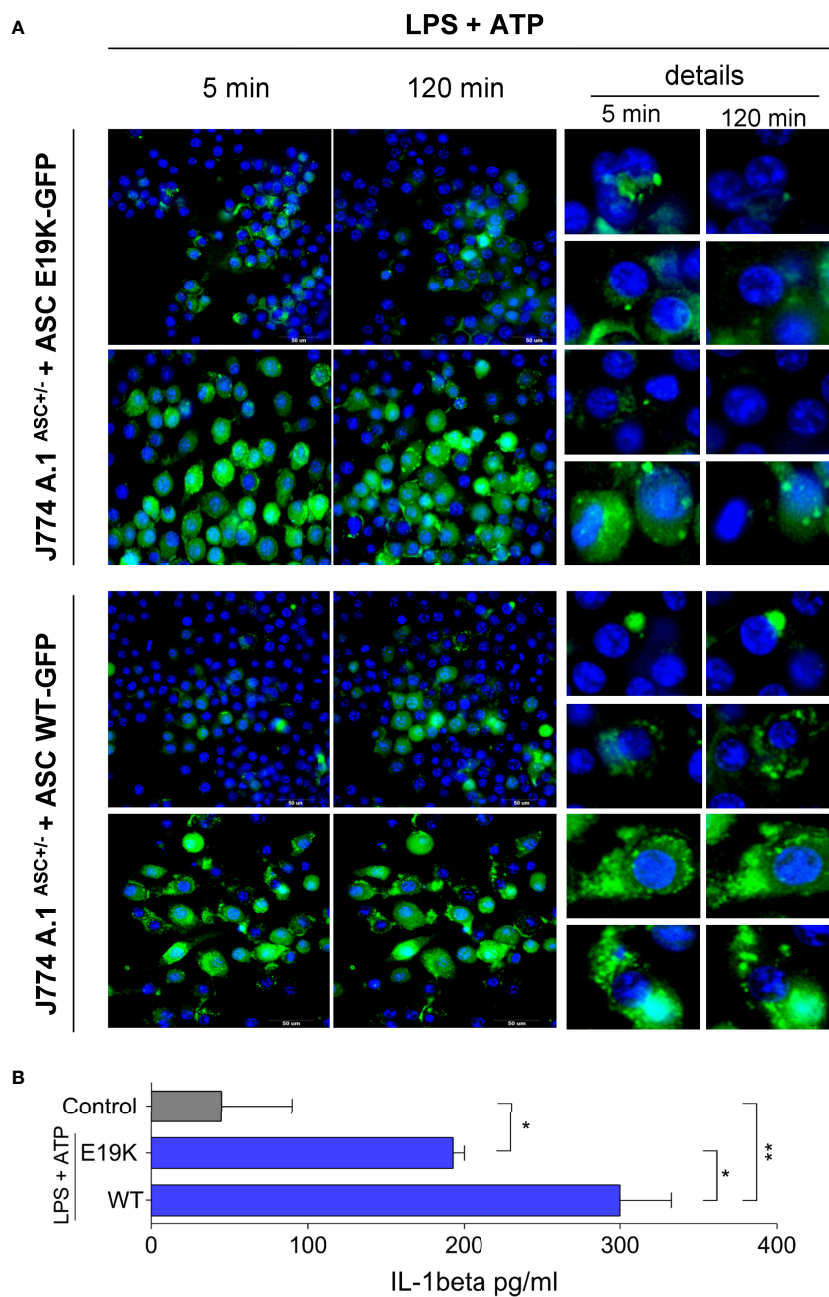
Retroviral transduction was then used to generate J774A.1ASC<sup>+/-</sup> cells stably expressing fluorescent WT or E19K mutated ASC, in order to interrogate the interference of the E19K polymorphism on ASC speck formation after NLRP3 inflammasome activation, without the interference of AIRmin genetic background. FACS sorted cells were stimulated with LPS and ATP and images were taken in time lapse at HCS (*High Content Screening*). ASC expression levels varied more in cells transduced with mutated form (**Supplemental Figure 4C**), so we looked for fields where the expression was similar in the two preparations. In these we observed that the percentage of cells with specks is similar at the beginning of the reaction but the specks in several cells bearing the mutated form of ASC do not persist over time.

Otherwise, specks were seen in WT cells that persisted up to 120 min after stimulation with ATP (**Figure 7**). We also observed an increase in ASC expression at times after the stimulus.

The two preparations of cells transduced with both forms of the gene produced IL-1 $\beta$ , but the levels were significantly higher in the cells transduced with the wild type *Pycard* allele (**Figure 7B**).

## DISCUSSION

The aim of the present study was to reduce the *Irm1* locus interval at chromosome 7 mapped in our previous study (10) to identify candidate genes regulating the acute inflammatory response and IL-1 $\beta$  production. The large size (693 mice) of the (AIRmax x AIRmin)F2 pedigree used here, allowed a high resolution mapping that reduced the *Irm1* candidate region to 4 Mb in length, including 125 genes. This locus regulates inflammasome-induced IL-1 $\beta$  production by circulating leukocytes, as well as the local leukocyte influx and the level of IL-6 in the inflammatory exudates induced by Biogel. The mapping of the IL-6 regulation to the *Irm1* locus, confirms its importance in the modulation of acute inflammation. In addition, other significant linkage signals for leukocyte influx



**FIGURE 7** | ASC speck formation in J774A.1ASC<sup>+/-</sup> cells stably expressing WT ASC or mutated E19K ASC linked to GFP after stimulation with LPS (1 $\mu$ g/mL for 3 h) and 5mM ATP. **(A)** ASC specks formation 5 min and 120 min after ATP addition. In detail the appearance and evolution of ASC specks, which are small and tend to disappear with time in cells expressing the mutated form, and apparently are more frequent and persistent in cells overexpressing the WT *Pycard* allele. Images were taken in two different fields (upper and lower) for each cell preparation at 5 and 120 minutes after ATP addition in High Content Screening (HCS) equipment. **(B)** IL-1 $\beta$  secretion (pg/mL) by cells after stimulation with LPS (1  $\mu$ g/mL for 3h) and ATP (5mM ATP for 1h), mean and SD, ANOVA with Tukeys posttest \*P<0.05, \*\* P<0.01.

were mapped in chromosomes 4, 6, 11 and a suggestive signal mapped in chromosome 13, demonstrating the multigenic control of this complex phenotype.

Deep sequencing of (AIRmax x AIRmin)F2 mice groups presenting extreme and opposite IL-1 $\beta$  levels narrowed the

*Irm1* locus region controlling this phenotype to 420 Kbp containing four genes. Through *in vitro* investigation of these genes, we individuated *BC017158* as a possible *Irm1* candidate able to reduce IL-1 $\beta$  levels when silenced in a macrophage cell line and *Pycard* the only gene that presented a missense mutation

(exon 1) which impaired IL-1 $\beta$  production and ASC specks formation in AIRmin mice.

Regarding the role of *BC017158* our results demonstrated that its silencing in J774.1 cells strongly reduced IL-1 $\beta$  levels. Moreover, the identification of a SNP in an intronic region of *BC017158*, led us to hypothesize that this SNP could act by modulating the level of protein expression or the formation of an alternative protein isoform. Little information is available in literature about *BC017158* functions; this gene is orthologous to human RUS family member 1 (*Rusf1*) that codes for a putative transmembrane protein that may be involved in protein-protein interaction. There are several microRNAs that interact with different *BC017158* transcripts, possibly modulating their expression levels. One example is muMir155 which is involved in a miRNA-based regulatory network that is implicated in macrophage activation for modulating inflammatory responses (20). Our results nevertheless suggest a role of the *BC017158* gene in inflammation through regulation of IL-1 $\beta$  production.

Although *Pycard* candidacy for *Irm1* locus was excluded in our previous work, because the SNPs detected along the gene did not show significant frequency deviation between the AIRmax and AIRmin groups tested at that time (10), results of the present work led us to reconsider its involvement in determining the divergent acute inflammatory response in AIR lines. In the previous analysis we assumed that alleles at any loci influencing the phenotypes in AIRmax and AIRmin populations were fixed in homozygosity. However, the high degree of genetic heterogeneity of the lines does not guarantee that the genotyped SNPs close to or inside the QTL are homozygous. In the present work we carried out the analysis based on heterozygosity at the QTL within the two populations, even if the theoretical assumption of homozygosity fixation at all QTLs is correct. Here, the candidacy of *Pycard* for exerting the effects of the *Irm1* locus is supported by the deep sequencing of (AIRmax X AIRmin)F2 mice showing extreme high or low IL-1 $\beta$  levels after LPS + ATP treatment. We identified a SNP in the first exon of the *Pycard*, thus suggesting that the two *Pycard* alleles could differently modulate IL-1 $\beta$  levels in AIRmax and AIRmin mice. This was confirmed *in vivo* by the up regulation of IL-1 $\beta$  production that we observed in stimulated blood leukocytes from AIRmin<sup>*Pycard*C/C</sup> mice, homozygous for the AIRmax *Pycard* WT C allele, compared to AIRmin<sup>*Pycard*T/T</sup>. This effect can be attributed to the *Pycard* variants since the 3 AIRmin sublines: AIRmin<sup>*Pycard*C/C</sup>, AIRmin<sup>*Pycard*C/T</sup> and AIRmin<sup>*Pycard*T/T</sup> are homozygous for the predominant AIRmin alleles at the other genes mapping at *Irm1* locus: *BC017158*, *Itgam* and *Rgs10*.

It is noteworthy that this *Pycard* variant does not exist among the 8 inbred lines (A/J, BALB/cJ, CBA/J, C57BL/6J, DBA2/J, P/J, SJL/J and SWR/J) used for the production of the initial population (F0) that was bidirectionally selected for the production of the AIRmax and AIRmin strains (9). It is possible that this mutation was present in some animal(s) used for mating in the foundation population (F0) or that the mutation occurred during the selection process, maybe by cytosine deamination, a very common phenomenon that

results in mutations and which accounts for almost half of the known pathogenic SNPs (21).

Other authors recently described *Pycard* as the candidate gene of the locus called *Irm3*. This study, similar to our QTL mapping for IL-1 $\beta$  production dependent on inflammasome activation, was done in bone marrow-derived macrophages originated from crosses between AKR and DBA2 mice that differ in the quantitative production of this cytokine. *Pycard* was considered the causal candidate of the locus due to a SNP between the AKR and DBA/2 lines in the 3' UTR region (22). AKR was not part of the 8 inbred strains that formed the initial population of the selection process of the AIRmax and AIRmin strains, however the results corroborate the importance of variants in this gene or in nearby non-coding regions for the activation of the inflammasome for IL-1 $\beta$  production.

PYCARD or ASC for Apoptosis-Associated Speck-like protein (ASC) containing a Pyrin and a caspase-recruitment domain (CARD) is the inflammasome complex adaptor protein. The N-terminal pyrin domain (PYD) of ASC links to NOD like receptors such as NLRP3 by homotypic PYD interactions and links to caspase-1 by homotypic C-terminal caspase recruitment and activation domain (CARD) interaction, which cleaves pro-IL1 $\beta$  and pro-IL18 to active forms that are then released. Caspase-1 also activates the pore-forming gasdermin D inducing cell death by pyroptosis.

ASC speck formation constitutes a suitable readout for inflammasome activation. Studies combining NMR and cryo-electron microscopy defined the structure and complex formation of PYCARD specks (16). ASC undergoes PYD-dependent oligomerization with successive ASC proteins forming filaments that condense into macromolecular structures. ASC PYD is polar and self-interaction is specifically based on and stabilized by amino acid residues having opposite charges in each side of two subunits (type I interface). E13A, E19A, K21A, K26A, R41A, D48A, D51A, L68A, L73A, K21A and K26A mutations were induced in PYCARD PYD domain and have shown the importance of those residues for the PYD-PYD interaction and, consequently, for the ASC speck formation (23–25). Despite the fact that several residues participate in the interaction interface between ASC PYD subunits and, therefore, some changes can be tolerated, studies have demonstrated that a proper balance of the charged residues in the interaction type I interface is important for filament formation. Herein, we have provided data to suggest that the naturally occurring ASC PYD domain mutation, E19K, detected in AIRmin mice, resulting in the substitution by a positively charged Lysine residue is likely disruptive to the correct formation of ASC specks.

In fact, we could observe this effect by the higher number of ASC positive cells in stimulated blood leukocytes from AIRmax or AIRmin<sup>*Pycard*C/C</sup> compared with AIRmin<sup>*Pycard*T/T</sup> mice. The results show that the expression of the AIRmax derived *Pycard* allele in the AIRmin genetic background clearly interferes with inflammasome activation and ASC speck formation. Furthermore, we got a similar picture when the two variants of the gene were overexpressed in J774A.1 cells. After

inflammasome stimulation with LPS + ATP, J774A.1 cells overexpressing the *Pycard* WT allele produced ASC specks, some large ones that persist up to 120 minutes, whereas small specks that decrease over time were observed in the cells bearing the mutant allele (Figure 7). These are preliminary results and further in-depth studies of the actual interference of the mutation in the formation of specks are required. Our hypothesis was based in studies of other groups that clearly demonstrated the importance of residues in interface 1 of the PYD protein domain for filament formation (17–19). A deficient formation of ASC specks in AIRmin could explain a lower activation of Caspase-1, and a decreased release of IL-1 $\beta$  by stimulated cells. However, we observed that cells transduced with the mutated form were able to produce IL-1 $\beta$  indicating that the E19K is not defective, but just less functional than the wild type. Besides that, comparing the IL-1 $\beta$  production by J774 cells expressing the mutated ASC with the very low responses we obtained with cells from AIRmin<sup>*Pycard*C/T</sup> AIRmin<sup>*Pycard*T/T</sup> animals, we can conclude that the genetic background, or other genes located in the *Irm1* locus, might contribute to the low response of these mice.

Inflammasome activation plays central roles in autoimmune and neurodegenerative diseases, infections and cancer (26). Besides their central role in inflammasomes for cytokine release, ASC specks can be released to the extracellular space, accumulate in inflamed tissues and can be internalized by surrounding inflammatory cells inducing inflammation chronicity or amplification, therefore worsening the disease or contributing to cure (26, 27). The AIRmax and AIRmin mouse lines differ in natural resistance to infections, to the induction of autoimmune diseases and chemical carcinogenesis as well as in tissue repair capacity (18, 19, 28–34). These phenotypes might be influenced by the differential *Irm1* locus-dependent inflammasome activation between the two lines described here. In fact, AIRmin mice bearing the AIRmax *Pycard* allele (AIRmin<sup>*Pycard*C/C</sup>) were more resistant to the development of lung adenocarcinomas and more susceptible to developing hepatocarcinomas than AIRmin<sup>*Pycard*T/T</sup>, following the behavior of AIRmax mice (11, 19).

In the case of the lung, it is worth noting that AIRmin mice and the two AIRmin<sup>*Pycard*C/C</sup> and AIRmin<sup>*Pycard*T/T</sup> sublines carry the lung tumor susceptibility allele at the major Pulmonary Adenoma Susceptibility 1 (*Pas1*) locus, unlike AIRmax, which have the resistance allele (11, 29). It was thus interesting to observe *Pycard* as modifier of a major cancer susceptibility gene. In the case of the liver, in previous studies with AIRmax and AIRmin mice, we mapped two loci controlling susceptibility to liver tumors (chromosomes 2 and 9) (12) and, even in the background of AIRmin, resistance was modulated by the *Pycard* CC genotype. These results suggest that polymorphisms of this gene interfere with carcinogenesis in both organs.

The main point of this study is that the AIRmax and AIRmin mice and the AIRmin<sup>*Pycard*C/C</sup> and AIRmin<sup>*Pycard*T/T</sup> sublines are the only mice described in the literature where the *in vivo* phenotypic effect of a naturally occurring missense mutation of the *Pycard* gene can be evaluated and are therefore a novel research tool.

Furthermore, whole genome linkage analysis using SNPs in a heterogeneous (AIRmax x AIRmin)F2 population involved *Pycard* as well as *BC017158* (*Rusf1*) in the control of IL-1 $\beta$  production. These genes map to the unique and extremely significant *Irm1* locus controlling NLRP3 inflammasome activation (35, 36). Further studies are needed to clarify how *Pycard* and *BC017158* genes interact in the modulation of IL-1 $\beta$  production.

Genes at the major *Irm1* locus as well as genes mapping to the interval of other significant QTLs evidenced in WGA analysis are candidates to contribute to the control of acute inflammatory response. Altogether, our results help in understanding the genetic mechanism of the acute inflammation process.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The variant data for this study are deposited in the European Variation Archive (EVA) at EMBL-EBI under accession number Project: PRJEB53276; Analyses: ERZ10780065.

## ETHICS STATEMENT

All procedures were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of Butantan Institute (protocol n° 3587190320), and all animals received humane care, according to the criteria outlined in the “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” prepared by the National Academy of Sciences and published by the National Institutes of Health.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

TD and OI contributed to conception, design and writing of the manuscript. AB prepared DNA samples and contributed to linkage analysis, performed CRISPr experiments and wrote sections of the manuscript. FC contributed to linkage analysis, performed gene silencing experiments and wrote sections of the manuscript. JS performed analysis of ASC specks formation in HCS and Image stream and wrote sections of the manuscript. RP performed and organized sequencing data. BS contributed to the CRISPr experiments. MF and JJ contributed to linkage and sequencing data analysis. JJ performed the design of primers for qPCR analysis. WC and OR produced the mouse lines, performed inflammation assays and carcinogenesis experiments. MI performed caspase 1 assays and contributed to CRISPr experiments design. NS and LM contributed to inflammation, IL-1 and IL-6 analysis. GM contributed to plasmid production and purification for CRISPr experiments. CDP performed HCS analysis and contributed to CRISPr RNA guides design. SE performed hystopathological analysis of tumors. MG performed design of WT and mutated *Pycard* gene sequences for viral transduction of J774A.1 cells. KP performed molecular modeling and computational site directed mutagenesis analysis and wrote a section of the manuscript. All authors contributed to manuscript revision, read, and approved the submitted version.

## FUNDING

This study received funding from São Paulo Research Foundation (FAPESP) process number 2016/07007-9 and FAPESP/GlaxoSmithKline Grant 2020/13139-0. JGS was supported by FAPESP post doc fellowship, process number 2017/06736-0; OGR, NS and JRJ were partially supported by Fundação Butantan; OCMi and MDF were partially supported by Brazilian Council for Research (CNPq), and Fundação Butantan. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

## REFERENCES

- Wyss-Coray T, Rogers J. Inflammation in Alzheimer Disease—A Brief Review of the Basic Science and Clinical Literature. *Cold Spring Harb Perspect Med* (2012) 2(1):a006346. doi: 10.1101/cshperspect.a006346
- Szebeni GJ, Vizler C, Kitajka K, Puskas LG. Inflammation and Cancer: Extra- and Intracellular Determinants of Tumor-Associated Macrophages as Tumor Promoters. *Mediators Inflamm* (2017) 2017:9294018. doi: 10.1155/2017/9294018
- Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, Stress, and Diabetes. *J Clin Invest* (2005) 115(5):1111–9. doi: 10.1172/JCI25102
- Maskrey BH, Megson IL, Whitfield PD, Rossi AG. Mechanisms of Resolution of Inflammation: A Focus on Cardiovascular Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2011) 31(5):1001–6. doi: 10.1161/ATVBAHA.110.213850
- Latz E, Duenwell P. NLRP3 Inflammasome Activation in Inflammaging. *Semin Immunol* (2018) 40:61–73. doi: 10.1016/j.smim.2018.09.001
- Libby P. Inflammatory Mechanisms: The Molecular Basis of Inflammation and Disease. *Nutr Rev* (2007) 65(12 Pt 2):S140–146. doi: 10.1111/j.1753-4887.2007.tb00352.x
- Bagaitkar J. Cellular Dynamics of Resolving Inflammation. *Blood* (2014) 124(11):1701–3. doi: 10.1182/blood-2014-07-589341
- Li J, Zhang S, Amaya E. The Cellular and Molecular Mechanisms of Tissue Repair and Regeneration as Revealed by Studies in *Xenopus*. *Regeneration (Oxf)* (2016) 3(4):198–208. doi: 10.1002/reg2.69
- Ibanez OM, Stiffel C, Ribeiro OG, Cabrera WK, Massa S, de Franco M, et al. Genetics of Nonspecific Immunity: I. Bidirectional Selective Breeding of Lines of Mice Endowed With Maximal or Minimal Inflammatory Responsiveness. *Eur J Immunol* (1992) 22(10):2555–63. doi: 10.1002/EJL1830221014
- Vorroro F, Galvan A, Cabrera WH, Carneiro PS, Ribeiro OG, De Franco M, et al. Genetic Control of IL-1 Beta Production and Inflammatory Response by the Mouse Irm1 Locus. *J Immunol* (2010) 185(3):1616–21. doi: 10.4049/jimmunol.1000358
- Galvan A, Cabrera W, Vorroro F, Jensen JR, Borrego A, Starobinas N, et al. Genetic Linkage Analysis Identifies Pas1 as the Common Locus Modulating Lung Tumorigenesis and Acute Inflammatory Response in Mice. *Genes Immun* (2013) 14(8):512–7. doi: 10.1038/gene.2013.49
- Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome Engineering Using the CRISPR-Cas9 System. *Nat Protoc* (2013) 8(11):2281–308. doi: 10.1038/nprot.2013.143
- Lage SL, Dominical VM, Wong CS, Sereti I. Evaluation of Canonical Inflammasome Activation in Human Monocytes by Imaging Flow Cytometry. *Front Immunol* (2019) 10:1284. doi: 10.3389/fimmu.2019.01284
- Mochalova EN, Kotov IA, Rozenberg JM, Nikitin MP. Precise Quantitative Analysis of Cell Targeting by Particle-Based Agents Using Imaging Flow Cytometry and Convolutional Neural Network. *Cytometry A* (2020) 97(3):279–87. doi: 10.1002/cyto.a.23939
- Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, et al. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* (2000) 28(1):235–42. doi: 10.1093/nar/28.1.235
- Sborgi L, Ravotti F, Dandey VP, Dick MS, Mazur A, Reckel S, et al. Structure and Assembly of the Mouse ASC Inflammasome by Combined NMR Spectroscopy and Cryo-Electron Microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2015) 112(43):13237–42. doi: 10.1073/pnas.1507579112

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank FAPESP, GSK, CNPq and Butantan Foundation for supporting this study.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.899569/full#supplementary-material>

- MacKerell AD, Bashford D, Bellott M, Dunbrack RL, Evanseck JD, Field MJ, et al. All-Atom Empirical Potential for Molecular Modeling and Dynamics Studies of Proteins. *J Phys Chem B* (1998) 102(18):3586–616. doi: 10.1021/jp973084f
- Maria DA, Manenti G, Galbiati F, Ribeiro OG, Cabrera WH, Barrera RG, et al. Pulmonary Adenoma Susceptibility 1 (Pas1) Locus Affects Inflammatory Response. *Oncogene* (2003) 22(3):426–32. doi: 10.1038/sj.onc.1206157
- de Carvalho LR, Borrego A, Jensen JR, Cabrera WH, Santos AM, Ribeiro OG, et al. Genetic Predisposition to Hepatocarcinogenesis in Inbred and Outbred Mouse Lines Selected for High or Low Inflammatory Response. *J Immunol Res* (2019) 2019:5298792. doi: 10.1155/2019/5298792
- Mann M, Mehta A, Zhao JL, Lee K, Marinov GK, Garcia-Flores Y, et al. An NF- $\kappa$ B-microRNA Regulatory Network Tunes Macrophage Inflammatory Responses. *Nat Commun* (2017) 8(1):851. doi: 10.1038/s41467-017-00972-z
- Tang J, Lee T, Sun T. Single-Nucleotide Editing: From Principle, Optimization to Application. *Hum Mutat* (2019) 40(12):2171–83. doi: 10.1002/humu.23819
- Ritchey B, Hai Q, Han J, Barnard J, Smith JD. Genetic Variant in 3' Untranslated Region of the Mouse Pycard Gene Regulates Inflammasome Activity. *Elife* (2021) 10:e68203. doi: 10.7554/eLife.68203
- de Alba E. Structure, Interactions and Self-Assembly of ASC-Dependent Inflammasomes. *Arch Biochem Biophys* (2019) 670:15–31. doi: 10.1016/j.abb.2019.05.023
- Hoss F, Rodriguez-Alcazar JF, Latz E. Assembly and Regulation of ASC Specks. *Cell Mol Life Sci* (2017) 74(7):1211–29. doi: 10.1007/s00018-016-2396-6
- Sharma M, de Alba E. Structure, Activation and Regulation of NLRP3 and AIM2 Inflammasomes. *Int J Mol Sci* (2021) 22(2):872–909. doi: 10.3390/ijms22020872
- de Souza JG, Starobinas N, Ibanez OCM. Unknown/enigmatic Functions of Extracellular ASC. *Immunology* (2021) 163(4):377–88. doi: 10.1111/imm.13375
- Franklin BS, Latz E, Schmidt FI. The Intra- and Extracellular Functions of ASC Specks. *Immunol Rev* (2018) 281(1):74–87. doi: 10.1111/imr.12611
- Jensen JR, Galvan A, Borrego A, Cabrera WH, Ribeiro OG, Starobinas N, et al. Genetic Control of Renal Tumorigenesis by the Mouse Rtm1 Locus. *BMC Genomics* (2013) 14:724. doi: 10.1186/1471-2164-14-724
- Araujo LM, Ribeiro OG, Siqueira M, De Franco M, Starobinas N, Massa S, et al. Innate Resistance to Infection by Intracellular Bacterial Pathogens Differs in Mice Selected for Maximal or Minimal Acute Inflammatory Response. *Eur J Immunol* (1998) 28(9):2913–20. doi: 10.1002/(SICI)1521-4141(199809)28:09<2913::AID-IMMU2913>3.0.CO;2-3
- Biozzi G, Ribeiro OG, Saran A, Araujo ML, Maria DA, De Franco M, et al. Effect of Genetic Modification of Acute Inflammatory Responsiveness on Tumorigenesis in the Mouse. *Carcinogenesis* (1998) 19(2):337–46. doi: 10.1093/carcin/19.2.337
- Correa MA, Borrego A, Jensen JR, Cabrera WH, Barros M, Katz ISS, et al. Mice Selected for Acute Inflammation Present Altered Immune Response During Pristane-Induced Arthritis Progression. *BioMed Res Int* (2018) 1267038. doi: 10.1155/2018/1267038
- Di Pace RF, Massa S, Ribeiro OG, Cabrera WH, De Franco M, Starobinas N, et al. Inverse Genetic Predisposition to Colon Versus Lung Carcinogenesis in Mouse Lines Selected Based on Acute Inflammatory Responsiveness. *Carcinogenesis* (2006) 27(8):1517–25. doi: 10.1093/carcin/bgl080
- Vigar ND, Cabrera WH, Araujo LM, Ribeiro OG, Ogata TR, Siqueira M, et al. Pristane-Induced Arthritis in Mice Selected for Maximal or Minimal Acute

- Inflammatory Reaction. *Eur J Immunol* (2000) 30(2):431–7. doi: 10.1002/1521-4141(200002)30:2<431::AID-IMMU431>3.0.CO;2-4
34. De Franco M, Carneiro Pdos S, Peters LC, Vorraro F, Borrego A, Ribeiro OG, et al. Slc11a1 (Nramp1) Alleles Interact With Acute Inflammation Loci to Modulate Wound-Healing Traits in Mice. *Mamm Genome* (2007) 18(4):263–9. doi: 10.1007/s00335-007-9012-x
35. de Souza JG, Jensen JR, Starobinas N, Monteleone LF, Cabrera WH, Ibañez OC. Pycard Gene Polymorphism and Pristane Induced Arthritis in Mice Selected for Acute Inflammatory Response. *Osteoarthr Cartil* (2019) 27:S381. doi: 10.1016/j.joca.2019.02.381
36. Ibañez OM, Starobinas N, Monteleone LF, Borrego A, Icimoto MY, Cabrera WK, et al. Novel Pycard Gene Polymorphism Impairs Nlpr3 Inflammasome-Induced IL-1 $\beta$  Production in Mice Selected for Low Inflammatory Response. *J Immunol* (2018) 200(1 Supplement):Abstract 115.10.

**Conflict of Interest:** Author KP is startup founder CEO, Director of the Computer-Aided Drug Design Division of ALCHEMY – Inovation, Research & Development Ltd, University of São Paulo, Brazil.

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

**Publisher's Note:** All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Borrego, Colombo, de Souza, Jensen, Dassano, Piazza, Rodrigues dos Santos, Ribeiro, De Franco, Cabrera, Icimoto, Starobinas, Magalhães, Monteleone, Eto, DeOcesano-Pereira, Goldfeder, Pasqualoto, Dragani and Ibañez. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.