

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

VÍTOR PEDRO TARGHETTA

**O papel do receptor NLRP1 na resposta imune e progressão
do melanoma: uma abordagem *in vivo* e *in silico***

SÃO PAULO

2022

VÍTOR PEDRO TARGHETTA

O papel do receptor NLRP1 na resposta imune e progressão do melanoma: uma abordagem *in vivo* e *in silico*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Versão original

Orientador: Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara
Co-orientadora: Dra. Cristiane Naffah de Souza Breda

SÃO PAULO

2022

FICHA CATALOGRÁFICA

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Targhetta, Vitor Pedro

O papel do receptor NLRP1 na resposta imune e progressão do melanoma: uma abordagem in vivo e in sílico / Vitor Pedro Targhetta; orientador Niels Olsen Saraiva Câmara; coorientadora Cristiane Naffah de Souza Breda. -- São Paulo, 2022.

112 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Melanoma. 2. Receptores Imunológicos. 3. Linfócitos T. 4. Linfócitos B. 5. Marcador Molecular. I. Câmara, Niels Olsen Saraiva, orientador. II. Breda, Cristiane Naffah de Souza, coorientador. III. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Vítor Pedro Targhetta

Título da Dissertação/Tese: O papel do receptor NLRP1 na resposta imune e progressão do melanoma: uma abordagem *in vivo* e *in sílico*

Orientador: Niels Olsen Saraiva Câmara

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

Dedico este trabalho a todos que me ajudaram e incentivaram a seguir em frente.

A todos os pacientes, pelos quais não deixo de acreditar no potencial da ciência.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a meus pais, Rômulo e Néjela, por tudo o que fizeram por mim desde que me conheço por gente e por seu suporte inabalável em toda a minha caminhada. Por todos os conselhos e motivações, pelas caronas aos fins de semana para a USP (sempre dizendo que tinham algo pra fazer por lá, apenas para que eu não me sentisse culpado) e por sempre estarem ao meu lado. Nunca caberia em uma folha descrever como sou grato. Agradeço também a meus Irmãos, Natália, Heloísa e João, por sempre acreditarem em mim e me aguentarem de mau humor diversas vezes.

Agradeço a meu orientador Niels. Boss, chefinho, obrigado por tudo, de verdade! Cada vez tenho mais certeza de que não poderia ter escolhido um orientador melhor para o mestrado. Agradeço toda a atenção e calma, todo o suporte e liberdade que me deu. Pela sua consciência do momento em que foi desenvolvido o mestrado e como ele se desenrolou, por entender as dificuldades da pandemia e por estar sempre lá quando precisei. Agradeço acima disso, pelo exemplo de pessoa que você é e pelo que pude aprender com isso durante esses anos. (E também por todos os doces que já levou pro Lab)

Aos companheiros de Lab LIT, que fizeram dessa jornada mais agradável e menos maluca. Em especial a minha coorientadora Cris, por todos os ensinamentos e conversas, e ao Hedden e a Raquel, por todas as conversas e risadas, e por sempre estarem disponíveis para me ajudar nos experimentos quando precisei.

Ao Igor e Denny, pelos conselhos e por todas as conversas sobre o futuro e bioinformática. Esse trabalho não estaria do jeito que está sem o suporte de vocês. Mais do que isso, agradeço pela amizade de vocês.

Aos meus amigos, de longa e breve data. As amizades que fiz no ensino médio e continuam fortes até hoje, a todos os meus amigos de ambas as graduações. Vocês são muito importantes pra mim, e eu seria muito menos do que sou hoje sem vocês.

Ao CHAOS DPTO, pelos RPGs pelas conversas e pela amizade, por sempre jogarem uma luz nos períodos sombrios da pandemia.

A todos os funcionários do ICB e da USP, a todos os porteiros, funcionários do bandeijão, funcionários do biotério, a equipe de limpeza e diversos outros. Muito obrigado por fazerem possível esse trabalho.

A todos os camundongos que usei. Muito obrigado. Esse trabalho também é dedicado a vocês.

Este trabalho foi desenvolvido com o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Processos 2020/04408-8 e 2017/05264-7), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e da Coordenação de Aperfeiçoamentos de Pessoal de Nível Superior (CAPES, código de financiamento 001).

RESUMO

Targhetta, V.P. **O papel do receptor NLRP1 na resposta imune e progressão do melanoma: uma abordagem *in vivo* e *in silico*.** [dissertação] (Mestrado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2022.

Inflamassomas são complexos proteicos que de forma canônica levam a ativação da procaspase-1 e a consequente geração das formas ativas das citocinas IL-1 β e IL-18. NLRP1 foi o primeiro receptor descoberto com capacidade de formação do inflamassoma e é expresso de maneira robusta na pele e em células imunes. Mesmo tendo um relacionamento direto com a pele e o sistema imune, a relação de NLRP1 com melanomas ainda não é totalmente entendida. Este projeto teve como objetivo verificar a importância do inflamassoma NLRP1 na diferenciação celular em linfócitos TCD4+ e relacionar essa possível interação com uma resposta imune frente a modelos de melanoma. Uma imunofenotipagem comparativa mostrou que ambos os camundongos C57BL/6 e NLRP1 KO são semelhantes quanto às suas principais populações de células imunes, exceto por uma diminuição de linfócitos Treg esplênicos. A literatura tem mostrado que o ativador de NLRP1 Valboro-Pro (VbP) apresenta potentes efeitos antitumorais imunodependentes. Curiosamente, o tratamento com VbP em linfócitos TCD4+ *in vitro* não interferiu na viabilidade celular e mostrou ser capaz de reduzir de modo robusto as quantidades de células CD4+Foxp3+ observadas, sendo este evento independente de NLRP1. Tanto os modelos tumorais a partir da linhagem de melanoma murino B16-F10 em camundongos NLRP1 KO e C57Bl/6, assim como camundongos tratados ou não com VbP, não apresentaram diferenças estatísticas relevantes na progressão tumoral. Em paralelo, análises de biologia computacional foram realizadas tentando entender o papel de NLRP1 no melanoma e na resistência à imunoterapia em humanos. Nas abordagens aqui propostas, observamos, a partir da coorte TCGA-SKCM, que NLRP1 se correlaciona com um maior infiltrado inflamatório e seus genes coexpressos são primariamente relacionados à ativação de linfócitos T. Adicionalmente construímos um score de risco para prever a porcentagem de sobrevida em pacientes com melanoma, utilizando de genes relacionados as vias dos inflamassoma e da piroptose. Por fim, mostramos que NLRP1 não foi capaz de prever a resposta ao tratamento com anti-PD-1 em melanomas humanos. Nesse sentido, identificamos genes e isoformas diferencialmente expressas entre pacientes responsivos ou não responsivos e as relacionamos a um contexto celular global, analisando seus perfis transcricionais, vias de ontologia, modos de *splicing* e possíveis efeitos nas proteínas resultantes. Verificamos que uma resposta positiva ao tratamento é fortemente marcada pela presença de eventos relacionados a linfócitos B e à imunidade humoral, não sendo necessariamente refletido num grupo de genes diferencialmente expressos. Apesar de uma resposta humoral ter sido preditiva para pacientes responsivos a imunoterapia, a presença de linfócitos B determinada a partir de algoritmos de deconvolução dos dados de expressão gênica, não se mostrou com capacidade preditora. Por fim, os perfis de *splicing* e consequências proteicas também não tiveram caráter preditivo para discriminar entre pacientes respondedores e não respondedores. Como principais conclusões temos que os nossos resultados apontam para um possível novo mecanismo de delimitação da

diferenciação de células Tregs associado a VbP e que NLRP1 não interfere diretamente na diferenciação linfocitária nem no crescimento do melanoma em modelos murinos, assim como não influencia na resposta a imunoterapia em humanos.

Palavras-chave: Melanoma, Receptores Imunológicos, Linfócitos T, Linfócitos B, Marcador Molecular.

ABSTRACT

Targhetta, V.P. **The role of the NLRP1 receptor in the immune response and progression of melanoma: an *in vivo* and *in silico* approach.** [dissertation] (Masters in Immunology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2022.

Inflammasomes are protein complexes that lead to the activation of pro-caspase-1 and the consequent generation of the active forms of the cytokines IL-1 β and IL-18. NLRP1 was the first receptor discovered with inflammasome-forming capability and is robustly expressed in skin and immune cells. Even though it has a direct relationship with the skin and the immune system, the relationship of NLRP1 with melanomas is still not fully understood. This project aimed to verify the importance of the NLRP1 inflammasome in CD4⁺ T lymphocytes differentiation and to relate this possible interaction with an immune response against melanoma in mouse models. Comparative immunophenotyping showed that both C57BL/6 and NLRP1 KO mice are similar in their major immune cell populations, except for a decrease in splenic Treg lymphocytes. The literature has shown that the NLRP1 activator Valbora-Pro (VbP) has interesting immuno-dependent antitumor effects. Interestingly, treatment with VbP on CD4⁺ T lymphocytes *in vitro* did not interfere with cell viability and was shown to be able to robustly reduce the amounts of CD4⁺Foxp3⁺ cells. Both tumor models from the murine melanoma lineage B16-F10 in NLRP1 KO and C57Bl/6 mice, as well as mice treated or not with VbP, did not show relevant statistical differences in tumor progression. In parallel, computational biology analyzes were performed trying to understand the role of NLRP1 in melanoma and immunotherapy resistance in humans. In the approaches proposed here, we observed, from the TCGA-SKCM cohort, that NLRP1 correlates with a greater inflammatory infiltrate and its co-expressed genes are primarily related to the activation of T lymphocytes. In addition, we constructed a risk score to predict survival of melanoma patients, using genes related to the inflammasome and pyroptosis pathways. Finally, we showed that NLRP1 was not able to predict the response to anti-PD-1 treatment in human melanomas. In this sense, we identified genes and isoforms differentially expressed between responsive and non-responsive patients and related them to a global cellular context, analyzing their transcriptional profiles, ontology pathways, splicing modes and possible effects on the resulting proteins. We found that a positive response to treatment is strongly marked by the presence of events related to B lymphocytes and humoral immunity, not necessarily being reflected in a group of differentially expressed genes. Although a humoral response was predictive for immunotherapy-responsive patients, the presence of B lymphocytes determined from algorithms of deconvolution of gene expression data was not shown to be predictive. Finally, splicing profiles and protein consequences were also not predictive to discriminate between responders and non-responders. As main conclusions we have that our results point to a possible new mechanism of delimitation of the differentiation of Treg cells associated with VbP and that NLRP1 does not directly interfere in lymphocyte differentiation

or melanoma growth in murine models, as well as does not influence the response to immunotherapy in humans.

Keywords: Melanoma, Immunological Receptors, T lymphocytes, B lymphocytes, Molecular Markers.

1. Introdução

1.1 A família dos receptores do tipo NOD (NLR)

O sistema imune pode ser dividido, de maneira genérica, em dois grandes ramos, o sistema imune inato e o adaptativo. Enquanto o sistema adaptativo consiste em montar respostas clonais de altíssima especificidade via principalmente a geração de linfócitos B e T, o sistema imune inato é o responsável por respostas robustas e rápidas, porém não tão específicas, a partir principalmente do reconhecimento de moléculas evolutivamente conservadas que representem algum padrão de perigo, como ATP extracelular, por exemplo, ou moléculas de patógenos, como o lipossacarídeo LPS da parede celular de bactérias gram-negativas. Esse reconhecimento do sistema inato é feito a partir da atuação de uma variedade de receptores germinativos específicos que disparam complexas vias de sinalização efetoras após o reconhecimento de sua molécula alvo. São diversas as famílias desses receptores conhecidas atualmente, os quais são classificados principalmente com base em sua similaridade estrutural, compartimento celular em que se localizam e em seus principais ligantes (1).

Os receptores do tipo NOD (NLRs) representam uma ampla família dos receptores inatos citosólicos que são responsáveis por mediar ligantes relacionados a eventos de dano e estresse celular e ligantes de patógenos. NLRs podem ser subdivididos estruturalmente em quatro principais subfamílias: NLRC, NLRA, NLRB e NLRP, que possuem entre si funções relacionadas a regulação da autofagia, transdução de sinais, ativação da maquinaria transcricional e a geração de sinais pró-inflamatórios (2). Uma característica marcante dessa família, é a capacidade de alguns dos seus membros, após ativados, levarem a formação de um complexo multiproteico conhecido como inflamassoma. O inflamassoma canônico é o resultado da organização multimérica de um conjunto de proteínas diferentes que leva a clivagem e ativação da proteína pró-caspase-1 em caspase-1 ativa. Caspase-1 ativa por sua vez é capaz de levar ao processamento e maturação das formas ativas das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-18 e induzir um tipo de morte celular conhecida como piroptose a partir da clivagem da proteína gasdermina-D. Já o inflamassoma não canônico é o resultado da ativação das capases 5 e 4 em humanos (ou caspase 11 em modelos murinos) e promove diretamente a piroptose, ativando posteriormente de maneira indireta a via canônica (3).

Brevemente, como um mecanismo geral da formação do inflamassoma clássico, após a ativação de um receptor com a capacidade de iniciação do inflamassoma, é recrutada a proteína adaptadora ASC (do inglês *apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD domain*) que possui em sua estrutura um domínio PYD (do inglês *pyrin domain*, presente na maioria dos receptores tipo NLR) e um CARD (do inglês *Caspase Activation and Recruitment Domain*, presente na pró-caspase-1). ASC interage de forma homotípica com o receptor a partir da ligação e subsequente polimerização via seu domínio PYD, e então recruta a pró-caspase-1 a partir de interações do tipo CARD-CARD, realizando assim uma ponte entre as interações do receptor e a pró-caspase-1. Essa associação leva a autocatálise de pró-caspase-1 em caspase-1 ativa, que desempenha o seu papel enzimático (1,4) (Figura 1).

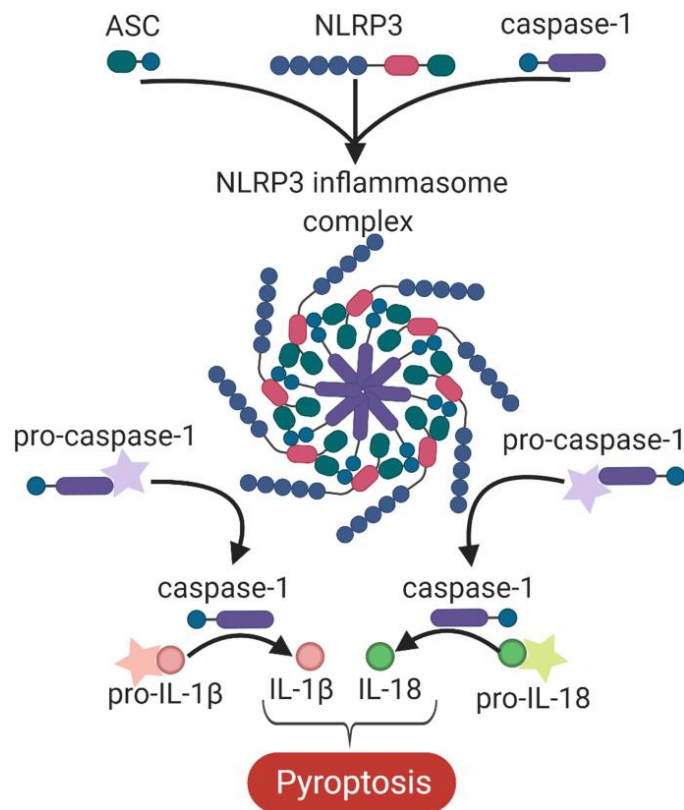


Figura 1. Mecanismo esquemático de ativação do inflamassoma mediado pelo receptor NLRP3. Imagem adaptada de O'Brien et al., 2020 (5).

1.2 O receptor NLRP1

O receptor NLRP1 (do inglês, *NLR Family Pyrin Domain Containing 1*), descoberto em 2002, foi o primeiro dos receptores citosólicos a ser descrito com a capacidade de iniciar o complexo do inflamassoma. Ele é expresso ao nível basal no citoplasma de forma ubíqua na grande maioria das células, porém principalmente na pele e em células imunes (6).

Interessantemente, NLRP1 de maneira oposta a outros receptores que formam o inflamassoma como o NLRP3, NLRC4, entre outros, possui consideráveis variações em sua ontologia relacionada a humanos e a camundongos. Em camundongos existem três genes parálogos: NLRP1a, NLRP1b e NLRP1c, sendo este último um pseudogene (7). Ainda, cada um desses genes é altamente variável tanto na sua presença como na sua sequência de nucleotídeos nas principais linhagens de camundongos. Em humanos é observado apenas um único gene (denominado aqui apenas como NLRP1).

Com base em dados de RNAseq, a pele é o tecido humano que apresenta o maior nível de expressão de NLRP1. Também é na pele que NLRP1 parece ser o principal receptor envolvido na formação do inflamassoma, em queratinócitos a expressão relativa do gene de NLRP1 medida em FPKM (*Fragments per kilobase of transcript per million fragments mapped*) é igual a 58,2, já a expressão de outros receptores como NLRP3, AIM2 e NLRC4 é bastante inferior, sendo menor que 1 (8). Polimorfismos de ganho de função em NLRP1 são associados a diversas patologias inflamatórias cutâneas, como MSPC (do inglês, *multiple self-healing palmoplantar carcinoma*) e queratose liquenoide crônica e podem levar a hiperplasia de queratinócitos via ação da citocina IL-1 β (8). NLRP1 é particularmente importante para a doença autoimune vitiligo, onde seus polimorfismos são diretamente associados a diferentes formas da doença e de modo similar é associado positivamente com a doença inflamatória cutânea psoríase (9,10). Além disso, em queratinócitos humanos observou-se que NLRP1 é o principal receptor envolvido na resposta à radiação UVB, e que sua ativação, e não a de NLRP3, é a principal responsável por levar a produção de IL-1 β e IL-18 nessas células, mesmo quando utilizados ativadores clássicos de NLRP3, como a nigericina (11,12). Essas evidências sugerem um papel central de NLRP1 na imunidade e manutenção da homeostasia na pele. Em linfócitos e monócitos humanos NLRP1 também já foi descrito no núcleo, porém uma função específica dessa proteína nesse local ainda é desconhecida (13,14).

Em relação à sua estrutura, NLRP1 de modo geral é composto em sequência N-C terminal pelos domínios PYD (presente apenas em humanos), NATCH (*NAIP*, *CIITA*, *HET-E* and *TP1*), e LRR (*Leucine Rich Repeat*), semelhantemente a outros membros pertencentes à família dos NLRs. Porém, de maneira exclusiva ao NLRP1, estão presentes também os domínios FIIND (*Function to Find Domain*), composto pelos subdomínios ZU5 e UPA, fundamentais para a ativação de NLRP1, e um domínio CARD (15,16)(Figura 2).

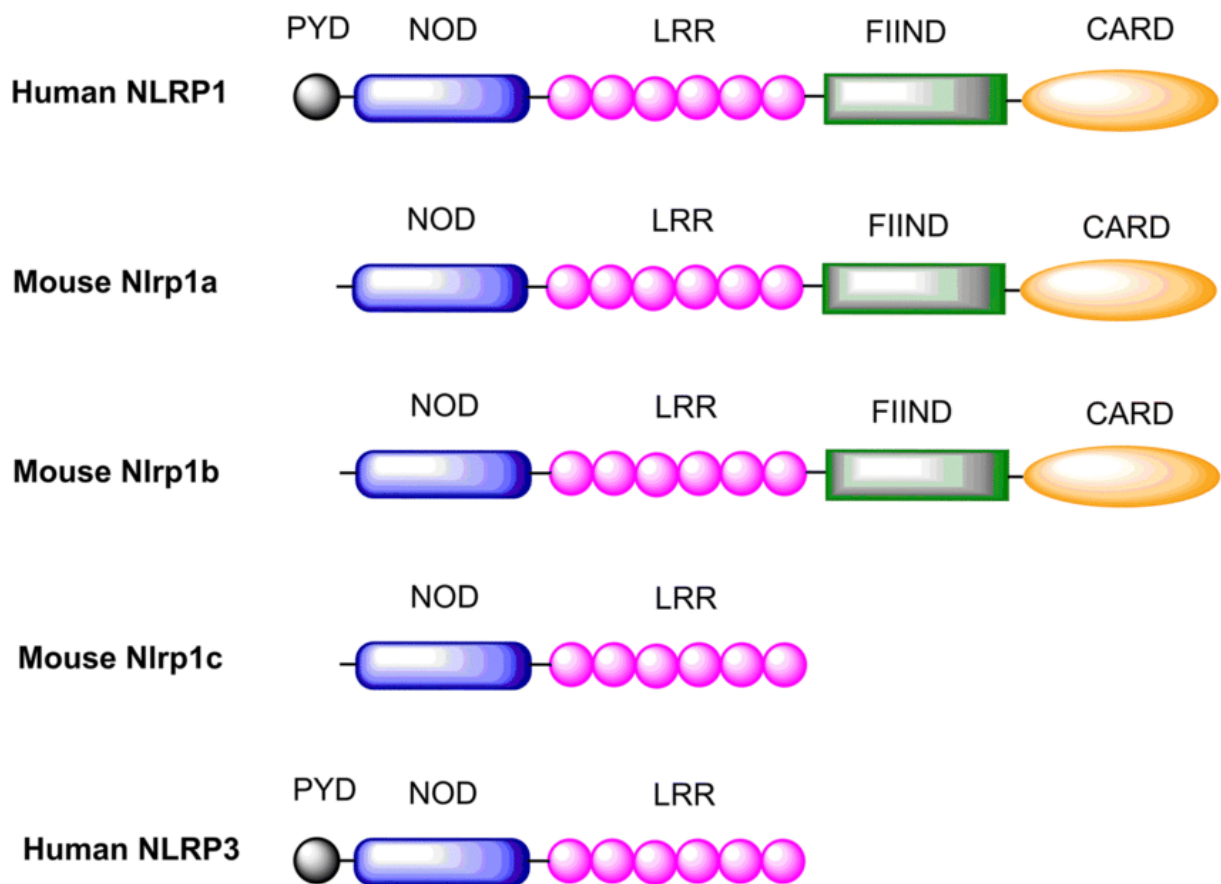


Figura 2. Estrutura do gene NLRP1 de humanos e de seus parálogos murinos. Estrutura do gene NLRP1 em humanos e camundongos detalhando seus principais domínios. Destacam-se a falta do domínio PYD nas espécies murinas e a similaridade com o inflamassoma NLRP3. Figura adaptada de (119).

1.3 Ativação de NLRP1

A ativação de NLRP1 é complexa, envolvendo uma série de etapas proteolíticas, que começaram a serem elucidadas apenas recentemente. Diversos compostos e estímulos com capacidade de ativar NLRP1 já foram descritos – com notáveis diferenças entre os modelos humanos e murinos. Entre os principais podemos citar o muramil dipeptidil e diversas proteases virais para o NLRP1 humano e o fator letal (LF) da toxina do *Bacillus anthrax*, também uma protease, para o NLRP1b murino (17-19).

O fato de proteases virais, assim como o LF (uma protease) serem capazes de ativar NLRP1, chama a atenção para o seu particular método de ativação. LF, por exemplo, é capaz de clivar a porção N-terminal da proteína NLRP1b, e assim induzir o seu processamento proteolítico por uma via de sinalização que leva a sua ubiquitinação e degradação proteossomal conhecido como “N-end-rule”. Durante esse processo, toda a região N terminal, até o subdomínio ZU5 é degradada, liberando o fragmento UPA-CARD. Esse fragmento liberado pode se associar a proteína efetora ASC e iniciar a via clássica dos inflamassomas clivando a pró-caspase-1 ou ainda, de maneira única entre os inflamassomas, por si só já ser o suficiente para o recrutamento e ativação da pró-caspase-1, devido a presença do domínio CARD no fragmento liberado (16,20,21).

O seu modo de ativação a partir de sua degradação proteolítica ficou conhecido como “degradação funcional” (*do inglês functional degradation*), e esse processo de degradação foi mostrado ser fundamental para ativar também os genes NLRP1a e NLRP1 humano, de maneira independente do estímulo inicial (15,22). Por necessariamente precisar ser degradado para ser ativado (liberando o seu fragmento UPA-CARD), o NLRP1 pode ser considerado um receptor da atividade de proteases específicas, tornando-se assim, em parte, um sensor de atividades enzimáticas para a imunidade inata (16).

Recentemente, foi demonstrado que NLRP1 humano, mas não o NLRP1 murino, pode ser ativado por DNA dupla fita, de maneira ainda dependente de ubiquitinação e degradação proteossomal do receptor (22).

1.3.1 O ativador de NLRP1 ValBoro-Pro (TALABOSTAT)

O ValBoro-Pro (VbP, talabostat, PT100) é um dipeptídeo amino borônico, que possui como função principal a inibição das dipeptidil peptidases 8 e 9 (DPP8 e 9) e DPP IV (CD26), enzimas serino-proteases que em geral clivam resíduos de Prolina na segunda posição (Xaa-Pro) (Figura 3). Apesar dessa molécula ser conhecida há pelo menos 20 anos, foi apenas em 2018 que a função de VbP como um ativador indireto de NLRP1, tanto das versões da proteína humana quanto murina, foi descoberta e desde então esse composto se tornou o método padrão para se estudar a atividade de NLRP1 e seus consequentes efeitos como a piroptose (23,24). O mecanismo único de ativação de VbP é resultado de um complexo normalmente formado entre NLRP1 e DPP8/9 que estabiliza NLRP1 em condições de homeostasia. Ambas as enzimas são capazes de se ligar diretamente ao NLRP1 pelo domínio FIIND e assim inibir uma autoproteólise que tende a acontecer entre os subdomínios ZU5 e UPA. Inibir DPP8/9 leva NLRP1 a se autodegradar – levando assim ao fenômeno de degradação funcional – e liberar o fragmento UPA-CARD iniciando assim a via dos inflamassomas. Dessa maneira, mutações em FIIND que impedem a ligação de DPP9 levam a síndromes autoinflamatórias devido à instabilidade e autoativação de NLRP1 (15,25).

Interessantemente, a grande maioria dos estudos envolvendo VbP anteriores a 2018 apontam uma importante função antitumoral imunodependente deste composto em camundongos. Nestes animais é observado que a atividade de VbP é totalmente dependente de linfócitos T e B para uma resposta positiva contra o tumor (26–28). Porém, em qual tipo celular o VbP atua diretamente, se seus efeitos são dependentes de NLRP1, o alvo secundário das enzimas dipeptidil peptidases relevantes, ou ainda os seus efeitos diretos nas células, são quase que totalmente desconhecidos.

Recentemente, um ensaio clínico de fase II se iniciou a fim de avaliar a possibilidade da utilização de VbP em conjunto com imunoterapia para tratamento de tumores sólidos (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04171219>). Isso demonstra que, apesar de suas evidentes funções antitumorais e promissora possibilidade de uso na clínica, pouco ainda se sabe sobre os mecanismos e vias de atuação dessa molécula.

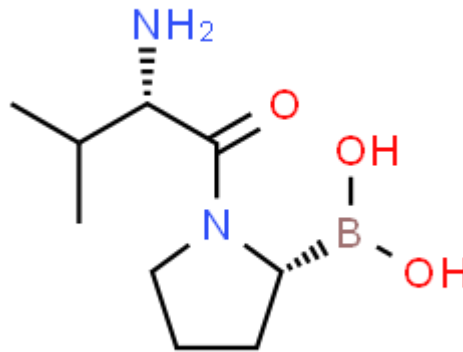


Figura 3. Estrutura química da molécula de VbP. Molécula de fórmula $C_9H_{19}BN_2O_3$ e peso molecular 214 Da. Adaptado de www.chemspider.com.

1.4 NLRP1 e o metabolismo celular

A importância do NLRP1 no metabolismo celular ainda não está clara. Mogridge et al. demonstraram que a redução dos níveis de ATP disponíveis no citosol pode levar a ativação de NLRP1 de maneira independente de clivagem N-terminal e dependente da fosforilação em AMPK (29). De maneira oposta, em humanos foi observado que a inibição de NLRP1 mediada por Bcl-2 ou Bcl-XL provém de uma interação de pequenos *loops* dessas proteínas que bloqueiam a ligação de ATP ao NLRP1 e, desse modo, previnem sua oligomerização (30), o que indica possíveis particularidades entre os modelos humanos e murinos.

De forma interessante, camundongos NLRP1 nocautes desenvolvem obesidade espontânea, mediada pela acumulação de ácidos graxos, possuem taxas de lipólise diminuídas e não regulam a glicose sanguínea. Esses efeitos são exacerbados em dietas ricas em ácidos graxos ou ricas em proteínas. Por sua vez, camundongos com ganho de função em NLRP1 apresentam uma redução do tecido adiposo e são resistentes às disfunções metabólicas causada pela dieta (31). Curiosamente, a IL-18, uma das principais citocinas circulantes e diretamente relacionada ao inflamassoma, é capaz de ativar AMPK e levar a fosforilação de ácidos graxos (FAO) no músculo esquelético (32).

Além disso, diversas proteínas da via glicolítica, entre elas aldolase, GAPDH, piruvato quinase, entre outras, foram identificadas como substratos de caspase-1 ativa. De fato, a

ativação do inflamassoma por NLRC4 diminui as taxas de glicólise pela clivagem de proteínas pertencentes a essa via (33).

Relações adicionais, agora com NLRP1 como resultado de condições metabólicas, principalmente relacionadas ao metabolismo lipídico, também foram observadas. Macrófagos murinos deficientes no fator de transcrição SRBP-1a (do inglês, *Sterol Regulatory Element Binding Protein-1a*), importante na regulação dos níveis de lipídeos celulares, secretam menos IL-1 β e têm o nível de mRNA de NLRP1a reduzido. Ademais, neste mesmo modelo foi mostrado que SBPR-1a é capaz de induzir a expressão de NLRP1a a partir da ligação em sua região promotora (34). Em modelos humanos, os níveis do transcrito de NLRP1 estão elevados em condições de estresse de retículo endoplasmático a partir da ativação de seu promotor pelo fator de transcrição ATF4 (35). A partir disso, uma relação entre metabolismo e a transcrição de NLRP1 é esperada, visto que é conhecido que diversas condições metabólicas induzem o estresse de retículo, como, por exemplo, obesidade, diabetes tipo 2, lipotoxicidade e câncer. ATF4 é particularmente importante para a regulação metabólica em linfócitos T CD4+ em camundongos, aumentando suas taxas de glicólise, glutaminólise e fosforilação oxidativa (36). Por fim, a Proteína Quinase R (PKR), um receptor de reconhecimento de padrões de patógenos virais, se mostrou importante para a ativação de NLRP1 (37). PKR também é relacionada a eventos como estresse metabólico, obesidade, diabetes, inflamação, envelhecimento, e níveis aumentados de PKR se correlacionam com o aumento da resistência à insulina (38).

1.5 Linfócitos Treg e Th17

O equilíbrio da resposta imunológica depende tanto de estímulos pró como anti-inflamatórios a fim de redefinir um estado de homeostasia. Os linfócitos T CD4+ representam uma parte crucial desse equilíbrio e, entre essas células, seus subtipos Th17 e Treg podem representar extremos opostos de um contínuo de inflamação. Os linfócitos Th17 são considerados células altamente pró-inflamatórias, caracterizadas pela expressão dos fatores de transcrição ROR- γ t e STAT3, da citocina IL-17, e se utilizam de um aumento da taxa glicolítica e de vias metabólicas relacionadas a síntese de ácidos graxos. Tregs por sua vez desempenham um papel importante na supressão da resposta imune, sendo marcadas pelo

fator de transcrição Foxp3, por citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- β e são marcadas pelo uso da FAO como sua principal via metabólica (39,40).

Linfócitos Th17 são altamente plásticos e podem se transdiferenciar em fenótipos diferentes de outras subpopulações CD4+, principalmente Th1 e Tregs, bem como em linfócitos Th2, Tfh e Tr1, dependendo dos estímulos presentes e da ativação de seus respectivos fatores de transcrição. Em relação à plasticidade Th17/Th1, citocinas como IL-12, IL-23 e IL-1 β , na ausência de TGF- β levaram, em modelos *in vitro*, a conversão de células Th17 para um fenótipo Th1, secretando tanto IFN-g como IL-17 e induzindo os fatores de transcrição STAT4 e T-bet. Ainda, linfócitos Th17 podem se converter de maneira robusta em linfócitos Th1 e se tornarem células “ex-Th17” Th1, deixando quase que totalmente de produzir IL-17. A plasticidade Th17/Treg, por sua vez, é ainda mais forte e significativa, principalmente por TGF- β ser um fator comum em ambas as ativações, o que leva a ambos os subtipos celulares dividirem essa via de diferenciação. Estudos tanto *in vitro*, como *in vivo* demonstram que Tregs e células Th17 são capazes de secretar IL-17 e IL-10, com ambos os fatores de transcrição ROR- γ t e Foxp3 ativos. Diferentemente da plasticidade Th17/Th1, a plasticidade no caso Th17/Treg pode acontecer inteiramente para ambos os subtipos celulares, podendo fazer com que o linfócito se torne “ex-Foxp3” ou “ex-Th17” (41,42).

Interessantemente, o metabolismo aparece como um dos principais fatores que regulam o balanço Th17-Tregs. A inibição do metabolismo glicolítico mediado por HIF-1a leva a uma dramática redução na diferenciação de linfócitos Th17 e a um aumento no nível de linfócitos Tregs (43,44). A inibição de síntese de ácidos graxos mediada pelo nocaute do gene ACC1 em camundongos mostrou diminuir a frequência de linfócitos Th17 e aumentar Tregs (45). E o uso de metformina, um agonista de AMPK e promotor da FAO, aumenta os níveis de linfócitos Tregs enquanto diminui os níveis de linfócitos Th17 (43).

De modo similar, os receptores do tipo NLR parecem ter, até certo grau, um papel importante na diferenciação de linfócitos TCD4+, com algumas relações não clássicas de receptores da família NLRP com diferentes ativações de linfócitos já tendo sido descritas anteriormente. NLRP3 por exemplo, possui sua localização celular majoritariamente nuclear nestas células. NLRP3 murino atua nos linfócitos TCD4+ especificamente durante a diferenciação para o perfil Th2, podendo interagir com o fator de transcrição IRF4 e induzir a expressão de genes relacionados à diferenciação desse subtipo celular (46). Em humanos,

NLRP3 em associação com fatores do complemento se mostraram também promover a diferenciação para o perfil Th1 (47). Nessa linha, o aumento da expressão e ativação de NLRP1 em condições como o vitiligo e psoríase é associada com um aumento da secreção de IL-1 β , do número de linfócitos Th17 e da citocina IL-17 (10). NLRP1 e a sinalização por citocinas da família IL-1 também se mostraram importantes para a geração de linfócitos Th17 na resposta imune contra a toxina colérica (48). De maneira oposta, durante a diferenciação *in vitro* de linfócitos Th17 murinos a expressão do mRNA de NLRP1 é drasticamente reduzida, o que não é observado em dados de RNA-seq de linfócitos humanos (49). Camundongos nocautes para NLRP1 (NLRP1 KO) quando diferenciados para o subtipo Th17 apresentam um aumento da citocina IL-17 e do receptor de IL-23, assim como dos fatores de transcrição ROR- γ t e STAT3, quando comparadas a seus respectivos controles, indicando ser a presença de NLRP1 um potencial inibidor para a ativação Th17 neste modelo (50).

1.6 Melanoma

O melanoma é uma neoplasia maligna, responsável por cerca de 1%-5% dos tumores cutâneos. Melanomas se originam a partir dos melanócitos, que são células derivadas da crista neural e estão presentes na pele, folículos capilares, meninges, mucosas e nos olhos. Melanócitos normalmente são células com baixo grau de proliferação e responsáveis principalmente pela produção de melanina, um pigmento que é produzido na grande maioria da população em resposta a dano ao DNA induzido por radiação UV, como uma forma de amenizar os efeitos deletérios desse tipo de radiação. Melanomas surgem a partir de mutações que levam os melanócitos a instabilidade genética e aquisição de algum fenótipo como a resistência a apoptose ou estímulos a proliferação ou sobrevivência celular, sendo as principais mutações observadas acometendo os oncogenes BRAF (cerca de 80%-90% dos casos sendo a substituição V600E), NF1 e NRAS (51). Por estarem primariamente na pele, melanomas possuem como principal agente etiológico para seu desenvolvimento a exposição à radiação UV, o que leva esse tipo tumoral a possuir uma das maiores cargas mutacionais dentre todos os tipos de cânceres (52,53). Apesar da relativa baixa incidência, melanomas são tidos como o tipo de neoplasia mais agressivo da pele, sendo responsáveis por mais de 65% das fatalidades dentre os tumores nessa localidade (52,54). De fato, a grande capacidade

metastática, associada a considerável resistência a terapias convencionais representam uma parte importante de sua letalidade, fazendo desse tipo tumoral um desafio clínico e um foco na busca de possíveis novas terapias.

1.6.1 O anti-PD-1 como imunoterapia no melanoma

Na última década, uma revolução no tratamento de diversos tipos tumorais se originou a partir do uso de anticorpos monoclonais inibidores de *checkpoints* imunológicos. A inibição de alvos como CTLA-4 (*Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*), PD-1 (*Programmed Cell Death Protein 1*) ou seu ligante PD-L1/PD-L2 (*Programmed Cell Death Ligand 1/2*) trouxeram benefícios clínicos sem precedentes.

PD-1 é um receptor presente tanto em linfócitos T e B como em diversos tipos celulares imunes inatos, como macrófagos e células dendríticas (DCs). A ligação de PD-L1 a PD-1, é capaz de levar a uma drástica redução da ativação, proliferação e capacidade citotóxica de linfócitos T, levando essas células a um fenótipo de exaustão. A ligação de PD-L1 a PD-1, em linfócitos T, leva a fosforilação de ITIMs (*tyrosine-based inhibitory motifs*) e ITSMs (*tyrosine-based switch motifs*) *downstream* a PD-1, o que é capaz de recrutar as fosfatases SHP-1 e SHP-2. Essas proteínas por sua vez desfosforilam diversas moléculas relacionadas a via de sinalização por TCR, assim como suprimem importantes vias de proliferação e sobrevivência celular, como as vias PI3K/AKT, mTOR e RAS/MAPK/ERK (55).

Essa inibição da resposta imune, por períodos delimitados é um fenômeno importante na manutenção da homeostasia em condições normais, porém, são vários os tipos de tumores se utilizam dessa via para criar um ambiente imunossuprimido e assim escapar da imunidade antitumoral. A expressão de PD-L1 é reservada normalmente a macrófagos, DCs, células epiteliais e em certas condições a linfócitos T e B ativados. Porém, foi observado também que tanto células tumorais, como tipos celulares presentes no microambiente tumoral são capazes de expressar PD-L1 e assim levar a imunossupressão local, favorecendo o crescimento tumoral (56).

Para o tratamento do melanoma, dois são os anticorpos anti-PD-1 atualmente aprovados para uso: nivolumab e pembrolizumab. Desde sua aprovação em 2014 pela FDA, os anticorpos anti-PD-1 se tornaram a primeira linha de tratamento contra o melanoma

metastático nos Estados Unidos, mesmo em pacientes PD-L1 negativos. Porém, apesar dos grandes avanços, a ausência de resposta ou a aquisição de resistência ao tratamento com anti-PD-1, assim como de imunoterapias em geral, é um fenômeno comum na prática clínica (56,57).

Apesar da revolução no tratamento, é estimado que mais de 50% dos pacientes que possuem melanoma não responderão ou irão adquirir resistência ao tratamento. Ao olharmos a resposta anti-PD-1 de maneira mais geral, esse número é ainda maior, com cerca de apenas 10 – 30% dos pacientes produzindo respostas robustas e duradouras (57,58). Os mecanismos de resistência são em sua grande maioria desconhecidos e podem agir em virtualmente qualquer etapa da formação de uma resposta imune, seja na geração das células antitumorais, como por exemplo a falta de neoantígenos ou um tumor sem relevantes infiltrados imunes, seja na função imuno-efetora, como a utilização de mais de uma via de checkpoint imunológico pelo tumor e/ou a presença de células supressoras como Tregs e subtipos de macrófagos, ou ainda, a resistência pode ocorrer na memória imunológica, como no caso de células extremamente exaustas (59). Devido a isso, é grande a busca de biomarcadores que possam indicar o futuro terapêutico de um paciente, e apesar disso, ainda é vaga a presença de um marcador robusto e preciso na imunoterapia do melanoma. Para o melanoma, podem ser considerados três os principais marcadores preditivos atuais: 1. A expressão de PD-L1 pelas células tumorais. 2. Relevantes infiltrados imunes, principalmente linfócitos CD8+, e 3. A carga mutacional do tumor, que tende a ser refletida na presença de neoantígenos (59–61). Apesar de mais bem aceitos, esses marcadores ainda são questionáveis, principalmente se levarmos em conta os benefícios da terapia a longo prazo.

1.7 NLRP1 no melanoma e na resistência a terapia

Devido a importância de NLRP1 na pele, é de se esperar que esses receptores tenham relevância em alguns eventos nessa localização, como já é o caso da psoríase e algumas outras doenças onde a inflamação constitui parte importante do processo patológico. Apesar disso, são relativamente inconclusivos os estudos da relação direta desse receptor em tumores nessa localização.

Em modelos celulares de melanomas humanos foi observado que NLRP1 desempenha um papel pró-tumoral, sendo associado a um aumento do tamanho e da viabilidade do tumor, a um aumento da produção e secreção de IL-1 β pelas células tumorais, da atividade de NF- κ B e a regular negativamente a apoptose mediada pelas caspases 9, 3 e 7 (14). De acordo com isso, variantes patogênicas de NLRP1 em humanos, onde ocorre ganho de função de NLRP1, aumentam a susceptibilidade a tumores de pele, levando à hiperplasia de células epiteliais justamente via atuação parácrina das citocinas IL-1 β , IL-1a e IL-18 e NF- κ B (62). Interessantemente, NLRP1 parece ter um efeito oposto em relação a tumores do tipo carcinoma de células escamosas, uma neoplasia do tipo não melanoma e derivada diretamente de queratinócitos. Nesse tipo tumoral, foi observado uma diminuição tanto da expressão como do nível proteico de NLRP1 e de outros componentes relacionados a via dos inflamassomas, como ASC e IL-1 β (63).

NLRP1 também foi visto ser importante para outros tumores, como o de mama no qual, em humanos, sua expressão nesses tecidos é maior que nos tecidos adjacentes e foi associada a migração e progressão tumoral. Sua superexpressão na linhagem MCF-7 aumentou significativamente os tumores gerados em camundongos nudes, afetando o fenótipo celular de maneira promotora da proliferação e induzindo o fenômeno da transição epitélio mesênquima (64). De maneira oposta, a expressão de NLRP1 é diminuída em adenocarcinomas pulmonares quando comparados ao tecido normal. Nesse caso, uma baixa expressão de NLRP1 é correlacionada a uma menor sobrevivência dos pacientes e a um maior infiltrado inflamatório local (65).

Além de impactar diretamente na tumorigênese, NLRP1 já foi associado adicionalmente a induzir resistência a quimioterápicos alquilantes do DNA, como o caso da droga temozolamida, em inibidores de BRAF como o vemurafenib e em inibidores da via MAPK/ERK, podendo inclusive ser alvo do fator de transcrição oncogênico ATF4 (66–68).

Por ser importante em queratinócitos e a na resposta a radiação UV, que podem iniciar os sinais da inflamação e os propagar na pele, e associado aos dados apresentados até aqui, podemos concluir que NLRP1 possui um alto potencial de influenciar o desenvolvimento tumoral de melanomas, sendo capaz de afetar tanto a célula tumoral como o seu microambiente.

2. Hipótese

Formulamos a hipótese de que o receptor NLRP1 tem um impacto direto no microambiente tumoral em melanomas, possivelmente sendo capaz de atuar na diferenciação linfocitária ao reduzir a diferenciação de linfócitos TCD4+ para um perfil Th17 e contribuir para a polarização de um perfil de células Tregs. Adicionalmente, acreditamos que NLRP1 e seus componentes da via do inflamassoma possuem relevância em uma resposta imune na pele e sejam importantes no microambiente tumoral e em uma resposta positiva ao tratamento com anti-PD-1 em melanomas humanos.

3. Objetivos

- Verificar a importância do NLRP1 em linfócitos T CD4+ e na geração de uma resposta imune Th17/Tregs em modelo murino de melanoma subcutâneo; e
- Avaliar datasets públicos buscando verificar a importância de NLRP1 no melanoma e na resistência a imunoterapia em humanos.

4. Conclusões

A partir dos resultados apresentados acima, concluímos que:

- Não existem grandes diferenças na porcentagem de infiltrados imunes, nem na intensidade das proteínas características dos principais tipos celulares imunes entre camundongos C57BL/6 e NLRP1 KO;
- Linfócitos T CD4+ (*naïve* e ativados) e DCs são resistentes à morte celular causada pela ativação de NLRP1;
- O tratamento com VbP é capaz de reduzir drasticamente o número de linfócitos T Foxp3+ e CD25+ diferenciados *in vitro* de maneira independente de NLRP1;
- A resposta antitumoral frente a modelos de melanoma subcutâneo parece ser independente de NLRP1, e o tratamento com seu ativador, VbP, como agente único não influencia no crescimento do melanoma em camundongos, nem nas populações de células TCD4+ e TCD8+;
- A expressão de genes relacionados ao inflamassoma podem servir como um marcador preditivo da sobrevida no melanoma em humanos;
- NLRP1 se correlaciona a uma melhor sobrevida e a um infiltrado inflamatório em melanomas, mas não é preditivo para pacientes responsivos a imunoterapia;
- A presença prévia de eventos relacionados a resposta imune humoral e a vias relacionadas a linfócitos B tendem a ser um bom marcador para uma resposta positiva ao tratamento anti-PD-1, tanto ao nível de genes como de transcritos; e
- Diferentes eventos de *splicing* e a análise da consequência proteica em isoformas diferencialmente usadas tendem a não serem bons marcadores preditivos entre R e PD no tratamento com anti-PD-1.

5. Referências

1. Platnich JM, Muruve DA. NOD-like receptors and inflammasomes: A review of their canonical and non-canonical signaling pathways. Vol. 670, *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Academic Press Inc.; 2019. p. 4–14.
2. Kim YK, Shin J-S, Nahm MH. NOD-Like Receptors in Infection, Immunity, and Diseases. *Yonsei Med J*. 2016 Jan 1;57(1):5. Available from: <https://eymj.org/DOIx.php?id=10.3349/ymj.2016.57.1.5>
3. Downs KP, Nguyen H, Dorfleutner A, Stehlik C. An overview of the non-canonical inflammasome. Vol. 76, *Molecular Aspects of Medicine*. Elsevier Ltd; 2020. p. 100924.
4. Saxena M, Yeretssian G. NOD-like receptors: Master regulators of inflammation and cancer. Vol. 5, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Research Foundation; 2014. p. 327.
5. O'Brien WT, Pham L, Symons GF, Monif M, Shultz SR, McDonald SJ. The NLRP3 inflammasome in traumatic brain injury: Potential as a biomarker and therapeutic target. Vol. 17, *Journal of Neuroinflammation*. BioMed Central Ltd.; 2020. p. 1–12.
6. Chavarría-Smith J, Vance RE. The NLRP1 inflammasomes. *Immunol Rev* [Internet]. 2015 May 1 [cited 2022 Jan 15];265(1):22–34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25879281/>
7. Sastalla I, Crown D, Masters SL, McKenzie A, Leppla SH, Moayeri M. Transcriptional analysis of the three *Nlrp1* paralogs in mice. *BMC Genomics*. 2013 Mar 18;14(1):1–10. Available from: <https://bmcbgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-14-188>
8. Zhong FL, Mamaï O, Sborgi L, Boussofara L, Hopkins R, Robinson K, et al. Germline NLRP1 Mutations Cause Skin Inflammatory and Cancer Susceptibility Syndromes via Inflammasome Activation. *Cell*. 2016 Sep 22;167(1):187-202.e17. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27662089/>
9. Jin Y, Mailloux CM, Gowan K, Riccardi SL, Laberge G, Bennett DC, et al. NALP1 in vitiligo-associated multiple autoimmune disease. *N Engl J Med*. 2007;356(12):1216–25.
10. Zwicker S, Hattinger E, Bureik D, Batycka-Baran A, Schmidt A, Gerber PA, et al. Th17 micro-milieu regulates NLRP1-dependent caspase-5 activity in skin autoinflammation. *PLoS One*. 2017 Apr 1 ;12(4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28422993/>
11. Fenini G, Grossi S, Contassot E, Biedermann T, Reichmann E, French LE, et al. Genome Editing of Human Primary Keratinocytes by CRISPR/Cas9 Reveals an Essential Role of the NLRP1 Inflammasome in UVB Sensing. *J Invest Dermatol*. 2018 Dec 1;138(12):2644–52.
12. Burian M, Yazdi AS. NLRP1 Is the Key Inflammasome in Primary Human Keratinocytes. Vol. 138, *Journal of Investigative Dermatology*. Elsevier B.V.; 2018. p. 2507–10.

13. Kummer JA, Broekhuizen R, Everett H, Agostini L, Kuijk L, Martinon F, et al. Inflammasome components NALP 1 and 3 show distinct but separate expression profiles in human tissues suggesting a site-specific role in the inflammatory response. *J Histochem Cytochem*. 2007 May;55(5):443–52. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17164409/>
14. Zhai Z, Liu W, Kaur M, Luo Y, Domenico J, Samson JM, et al. NLRP1 promotes tumor growth by enhancing inflammasome activation and suppressing apoptosis in metastatic melanoma. *Oncogene*. 2017 Jul 6;36(27):3820–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28263976/>
15. Huang M, Zhang X, Toh GA, Gong Q, Wang J, Han Z, et al. Structural and biochemical mechanisms of NLRP1 inhibition by DPP9. *Nature*. 2021 Mar 17;592(7856):773–7. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41586-021-03320-w>
16. Mitchell PS, Sandstrom A, Vance RE. The NLRP1 inflammasome: new mechanistic insights and unresolved mysteries. *Curr Opin Immunol*. 2019 Oct 1;60:37–45. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31121538/>
17. Hellmich KA, Levinsohn JL, Fattah R, Newman ZL, Maier N, Sastalla I, et al. Anthrax Lethal Factor Cleaves Mouse Nlrp1b in Both Toxin-Sensitive and Toxin-Resistant Macrophages. *PLoS One*. 2012;7(11):1–5.
18. Boyden ED, Dietrich WF. Nalp1b controls mouse macrophage susceptibility to anthrax lethal toxin. *Nat Genet*. 2006;38(2):240–4.
19. Tsu B V., Beierschmitt C, Ryan AP, Agarwal R, Mitchell PS, Daugherty MD. Diverse viral proteases activate the nlrp1 inflammasome. *Elife*. 2021 Jan 1;10:1–76.
20. Neiman-Zenevich J, Liao KC, Mogridge J. Distinct regions of NLRP1B are required to respond to anthrax lethal toxin and metabolic inhibition. *Infect Immun*. 2014 ;82(9):3697–703. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24935976/>
21. Chavarría-Smith J, Mitchell PS, Ho AM, Daugherty MD, Vance RE. Functional and Evolutionary Analyses Identify Proteolysis as a General Mechanism for NLRP1 Inflammasome Activation. *PLoS Pathog*. 2016 Dec 7;12(12).
22. Bauernfried S, Scherr MJ, Pichlmair A, Duderstadt KE, Hornung V. Human NLRP1 is a sensor for double-stranded RNA. *Science (80-)*. 2021 Jan 29;371(6528).
23. Gai K, Okondo MC, Rao SD, Chui AJ, Ball DP, Johnson DC, et al. DPP8/9 inhibitors are universal activators of functional NLRP1 alleles. *Cell Death Dis* 2019 108. 2019 Aug 5;10(8):1–10. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41419-019-1817-5>
24. Okondo MC, Rao SD, Taabazuing CY, Chui AJ, Poplawski SE, Johnson DC, et al. Inhibition of Dpp8/9 Activates the Nlrp1b Inflammasome. *Cell Chem Biol*. 2018;25:262–267.e5. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2017.12.013>

25. Zhong FL, Robinson K, Teo DET, Tan KY, Lim C, Harapas CR, et al. Human DPP9 represses NLRP1 inflammasome and protects against autoinflammatory diseases via both peptidase activity and FIIND domain binding. *J Biol Chem.* 2018 Dec 7;293(49):18864–78. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30291141/>
26. Adams S, Miller GT, Jesson ML, Watanabe T, Jones B, Wallner BP. PT-100, a small molecule dipeptidyl peptidase inhibitor, has potent antitumor effects and augments antibody-mediated cytotoxicity via a novel immune mechanism. *Cancer Res.* 2004 Aug 1;64(15):5471–80.
27. Jones B, Adams S, Miller GT, Jesson MI, Watanabe T, Wallner BP. Hematopoietic stimulation by a dipeptidyl peptidase inhibitor reveals a novel regulatory mechanism and therapeutic treatment for blood cell deficiencies. *Blood.* 2003 Sep 1;102(5):1641–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12738665/>
28. Walsh MP, Duncan B, Larabee S, Krauss A, Davis JPE, Cui Y, et al. Val-boroPro accelerates T cell priming via modulation of dendritic cell trafficking resulting in complete regression of established murine tumors. *PLoS One.* 2013 Mar 12;8(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23554941/>
29. Liao KC, Mogridge J. Activation of the Nlrp1b inflammasome by reduction of cytosolic ATP. *Infect Immun.* 2013 Feb;81(2):570–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23230290/>
30. Faustin B, Chen Y, Zhai D, Le Negrate G, Lartigue L, Satterthwait A, et al. Mechanism of Bcl-2 and Bcl-XL inhibition of NLRP1 inflammasome: Loop domain-dependent suppression of ATP binding and oligomerization. *Proc Natl Acad Sci.* 2009 Mar 10;106(10):3935–40. Available from: <https://www.pnas.org/content/106/10/3935>
31. Andrew Murphy AJ, Kraakman MJ, Kammoun HL, Croker BA, Febbraio MA, Murphy AJ, et al. IL-18 Production from the NLRP1 Inflammasome Prevents Obesity and Metabolic Syndrome. *Cell.* 2016; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2015.09.024>
32. Lindegaard B, Matthews VB, Brandt C, Hojman P, Allen TL, Estevez E, et al. Interleukin-18 activates skeletal muscle AMPK and reduces weight gain and insulin resistance in mice. *Diabetes.* 2013 Sep ;62(9):3064–74. Available from: </pmc/articles/PMC3749341/>
33. Rathinam VAK, Fitzgerald KA. Inflammasome Complexes: Emerging Mechanisms and Effector Functions. *Cell.* 2016 May 5;165(4):792–800. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27153493/>
34. Im SS, Yousef L, Blaschitz C, Liu JZ, Edwards RA, Young SG, et al. Linking lipid metabolism to the innate immune response in macrophages through sterol regulatory element binding protein-1a. *Cell Metab.* 2011 May 4;13(5):540–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21531336/>
35. D’Osualdo A, Anania VG, Yu K, Lill JR, Kaufman RJ, Matsuzawa SI, et al. Transcription Factor ATF4 Induces NLRP1 Inflammasome Expression during Endoplasmic Reticulum Stress. *PLoS One.* 2015 Jun 18;10(6). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26086088/>

36. Yang X, Xia R, Yue C, Zhai W, Du W, Yang Q, et al. ATF4 Regulates CD4 + T Cell Immune Responses through Metabolic Reprogramming. *Cell Rep.* 2018 May 8;23(6):1754–66. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29742431/>
37. Lu B, Nakamura T, Inouye K, Li J, Tang Y, Lundbäck P, et al. Novel role of PKR in inflammasome activation and HMGB1 release. *Nature.* 2012 Aug 30;488(7413):670–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22801494/>
38. Gal-Ben-Ari S, Barrera I, Ehrlich M, Rosenblum K. PKR: A kinase to remember. *Front Mol Neurosci.* 2019 Jan 7;11:480.
39. Lee YS, Wollam J, Olefsky JM. An Integrated View of Immunometabolism. *Cell.* 2018;172(1–2):22–40. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.12.025>
40. Mockler MB, Conroy MJ, Lysaght J. Targeting T cell immunometabolism for cancer immunotherapy; understanding the impact of the tumor microenvironment. *Front Oncol.* 2014;4 MAY(May):1–11.
41. Kolls J, Sandquist I. Update on regulation and effector functions of Th17 cells. *F1000Research.* 2018;7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29527301/>
42. Guéry L, Hugues S. Th17 Cell Plasticity and Functions in Cancer Immunity. *Biomed Res Int;* 2015. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26583099/>
43. Sun L, Fu J, Zhou Y. Metabolism controls the balance of Th17/T-regulatory cells. *Front Immunol.* 2017 Nov 27;8(NOV):1632.
44. Wang R, Solt LA. Metabolism of murine TH 17 cells: Impact on cell fate and function. *Eur J Immunol.* 2016 Apr 1;46(4):807–16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26893133/>
45. Berod L, Friedrich C, Nandan A, Freitag J, Hagemann S, Harmrolfs K, et al. De novo fatty acid synthesis controls the fate between regulatory T and T helper 17 cells. *Nat Med.* 2014;20(11):1327–33. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25282359/>
46. Bruchard M, Rebé C, Derangère V, Togbé D, Ryffel B, Boidot R, et al. The receptor NLRP3 is a transcriptional regulator of TH2 differentiation. *Nat Immunol.* 2015 Jul 21;16(8):859–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26098997/>
47. Arbore G, West EE, Spolski R, Robertson AAB, Klos A, Rheinheimer C, et al. T helper 1 immunity requires complement-driven NLRP3 inflammasome activity in CD4⁺ T cells. *Science.* 2016 Jun 17; 352(6292). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27313051/>
48. Larena M, Holmgren J, Lebens M, Terrinoni M, Lundgren A. Cholera Toxin, and the Related Nontoxic Adjuvants mmCT and dmLT, Promote Human Th17 Responses via Cyclic AMP–Protein Kinase A and Inflammasome-Dependent IL-1 Signaling. *J Immunol.* 2015 Apr 15; 194(8):3829–39. Available from: <https://www.jimmunol.org/content/194/8/3829>

49. Linder A, Bauernfried S, Cheng Y, Albanese M, Jung C, Keppler OT, et al. CARD8 inflammasome activation triggers pyroptosis in human T cells. *EMBO J*. 2020 Oct 1; 39(19):e105071. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.15252/embj.2020105071>
50. Costa FRC, Leite JA, Rassi DM, da Silva JF, Elias-Oliveira J, Guimarães JB, et al. NLRP1 acts as a negative regulator of Th17 cell programming in mice and humans with autoimmune diabetes. *Cell Rep*. 2021 May 25;35(8). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34038731/>
51. Leonardi GC, Falzone L, Salemi R, Zanghi A, Spandidos DA, Mccubrey JA, et al. Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy (Review). Vol. 52, *International Journal of Oncology*. Spandidos Publications; 2018. p. 1071–80.
52. Domingues B, Lopes JM, Soares P, Pópulo H. Melanoma treatment in review. *ImmunoTargets Ther*. 2018 Jun 7;7:35–49. Available from: <https://www.dovepress.com/melanoma-treatment-in-review-peer-reviewed-fulltext-article-ITT>
53. Livingstone A, Agarwal A, Stockler MR, Menzies AM, Howard K, Morton RL. Preferences for Immunotherapy in Melanoma: A Systematic Review. *Ann Surg Oncol*. 2020 Feb 1;27(2):571–84. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1245/s10434-019-07963-y>
54. Shain AH, Bastian BC. From melanocytes to melanomas. *Nat Rev Cancer* 2016 166. 2016 Apr 29;16(6):345–58. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrc.2016.37>
55. Wu Q, Jiang L, Li S cheng, He Q jun, Yang B, Cao J. Small molecule inhibitors targeting the PD-1/PD-L1 signaling pathway. *Acta Pharmacol Sin* 2020 421. 2020 Mar 9;42(1):1–9. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41401-020-0366-x>
56. Han Y, Liu D, Li L. PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *Am J Cancer Res*. 2020 ; 10(3):727–42. Available from: www.ajcr.us/
57. Liu J, Chen Z, Li Y, Zhao W, Wu JB, Zhang Z. PD-1/PD-L1 Checkpoint Inhibitors in Tumor Immunotherapy. *Front Pharmacol*. 2021 Sep 1;12:2339.
58. Weiss SA, Wolchok JD, Sznol M. Immunotherapy of Melanoma: Facts and Hopes. *Clin Cancer Res*. 2019 Sep 1;25(17):5191–201. Available from: <https://clincancerres.aacrjournals.org/content/25/17/5191>
59. Jenkins RW, Barbie DA, Flaherty KT. Mechanisms of resistance to immune checkpoint inhibitors. *Nat Publ Gr [Internet]*. 2018 [cited 2022 Jan 14];118. Available from: www.bjcancer.com
60. Ren D, Hua Y, Yu B, Ye X, He Z, Li C, et al. Predictive biomarkers and mechanisms underlying resistance to PD1/PD-L1 blockade cancer immunotherapy. *Mol Cancer*. 2020 Jan 30;19(1):1–19. Available from: <https://link.springer.com/articles/10.1186/s12943-020-1144-6>
61. Song H, Lee S, Lee S-H, Kim M, Lee SY, Yoon S-S, et al. Transcriptional analysis of immune modulatory genes in melanoma treated with PD-1 blockade. *bioRxiv*. 2020 Dec 21;2020.12.20.397000. Available

from: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.12.20.397000v1>

62. Zhong FL, Mamaï O, Sborgi L, Boussofara L, Hopkins R, Robinson K, et al. Germline NLRP1 Mutations Cause Skin Inflammatory and Cancer Susceptibility Syndromes via Inflammasome Activation. *Cell*. 2016;167(1):187-202.e17.
63. Sand J, Fenini G, Grossi S, Hennig P, Di Filippo M, Levesque M, et al. The NLRP1 Inflammasome Pathway Is Silenced in Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *J Invest Dermatol [Internet]*. 2019; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jid.2019.01.025>
64. Wei Y, Huang H, Qiu Z, Li H, Tan J, Ren G, et al. NLRP1 Overexpression Is Correlated with the Tumorigenesis and Proliferation of Human Breast Tumor. *Biomed Res Int*. 2017;2017.
65. Shen E, Han Y, Cai C, Liu P, Chen Y, Gao L, et al. Low expression of NLRP1 is associated with a poor prognosis and immune infiltration in lung adenocarcinoma patients. *Aging (Albany NY)*. 2021 Mar 3;13(5):7570–88.
66. Zhai Z, Samson JM, Yamauchi T, Vaddi PK, Matsumoto Y, Dinarello CA, et al. Inflammasome sensor nlrp1 confers acquired drug resistance to temozolomide in human melanoma. *Cancers (Basel)*. 2020 Sep 1;12(9):1–22.
67. Zhai Z, Vaddi PK, Samson JM, Takegami T, Fujita M. Nlrp1 functions downstream of the mapk/erk signaling via atf4 and contributes to acquired targeted therapy resistance in human metastatic melanoma. *Pharmaceuticals*. 2021 Jan 1;14(1):1–15.
68. Okamoto M, Liu W, Luo Y, Tanaka A, Cai X, Norris DA, et al. Constitutively active inflammasome in human melanoma cells mediating autoinflammation via caspase-1 processing and secretion of interleukin-1 β . *J Biol Chem*. 2010 Feb 26;285(9):6477–88.
69. Li T, Fu J, Zeng Z, Cohen D, Li J, Chen Q, et al. TIMER2.0 for analysis of tumor-infiltrating immune cells. *Nucleic Acids Res*. 2020 Jul 2;48(W1):W509–14.
70. Ru B, Wong CN, Tong Y, Zhong JY, Zhong SSW, Wu WC, et al. TISIDB: an integrated repository portal for tumor–immune system interactions. Wren J, editor. *Bioinformatics*. 2019 Oct 15 ;35(20):4200–2. Available from: <https://academic.oup.com/bioinformatics/article/35/20/4200/5418799>
71. Chandrashekar DS, Karthikeyan SK, Korla PK, Patel H, Shovon AR, Athar M, et al. UALCAN: An update to the integrated cancer data analysis platform. *Neoplasia (United States)*. 2022 Mar 1;25:18–27.
72. Vasaikar S V., Straub P, Wang J, Zhang B. LinkedOmics: Analyzing multi-omics data within and across 32 cancer types. *Nucleic Acids Res*. 2018 Jan 1;46(D1):D956–63.
73. Kim D, Paggi JM, Park C, Bennett C, Salzberg SL. Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. *Nat Biotechnol* 2019 378. 2019 Aug 2;37(8):907–15. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41587-019-0201-4>

74. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*. 2009 Aug;25(16):2078–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19505943/>
75. Pertea M, Kim D, Pertea GM, Leek JT, Salzberg SL. Transcript-level expression analysis of RNA-seq experiments with HISAT, StringTie and Ballgown. *Nat Protoc* 2016 119. 2016 Aug 11;11(9):1650–67. Available from: <https://www.nature.com/articles/nprot.2016.095>
76. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*. 2010 Jan 1;26(1):139–40. Available from: <https://academic.oup.com/bioinformatics/article/26/1/139/182458>
77. Vitting-Seerup K, Sandelin A, Berger B. IsoformSwitchAnalyzeR: analysis of changes in genome-wide patterns of alternative splicing and its functional consequences. *Bioinformatics* [Internet]. 2019 Nov 1 [cited 2022 Jan 18];35(21):4469–71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30989184/>
78. Punta M, Coggill PC, Eberhardt RY, Mistry J, Tate J, Boursnell C, et al. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2012 Jan 1 [cited 2022 Jan 18];40(D1):D290–301. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article/40/D1/D290/2903007>
79. Kang YJ, Yang DC, Kong L, Hou M, Meng YQ, Wei L, et al. CPC2: a fast and accurate coding potential calculator based on sequence intrinsic features. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2017 Jul 3 [cited 2022 Jan 18];45(W1):W12–6. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article/45/W1/W12/3831091>
80. Almagro Armenteros JJ, Tsirigos KD, Sønderby CK, Petersen TN, Winther O, Brunak S, et al. SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nat Biotechnol* 2019 374. 2019 Feb 18 ;37(4):420–3. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41587-019-0036-z>
81. Mészáros B, Erdős G, Dosztányi Z. IUPred2A: context-dependent prediction of protein disorder as a function of redox state and protein binding. *Nucleic Acids Res*. 2018 Jul 2;46(W1):W329–37. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article/46/W1/W329/5026265>
82. Wu T, Hu E, Xu S, Chen M, Guo P, Dai Z, et al. clusterProfiler 4.0: A universal enrichment tool for interpreting omics data. *Innov*. 2021 Aug 28;2(3). Available from: <http://www.cell.com/article/S2666675821000667/fulltext>
83. Okondo MC, Rao SD, Taabazuing CY, Chui AJ, Poplawski SE, Johnson DC, et al. Inhibition of Dpp8/9 Activates the Nlrp1b Inflammasome. *Cell Chem Biol* [Internet]. 2018;25(3):262-267.e5. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2017.12.013>
84. Johnson DC, Okondo MC, Orth EL, Rao SD, Huang HC, Ball DP, et al. DPP8/9 inhibitors activate the CARD8 inflammasome in resting lymphocytes. *Cell Death Dis* 2020 118 [Internet]. 2020 Aug 14 [cited 2022 Jan 16];11(8):1–10. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41419-020-02865-4>

85. Fitzgerald AA, Wang S, Agarwal V, Marcisak EF, Zuo A, Jablonski SA, et al. DPP inhibition alters the CXCR3 axis and enhances NK and CD8+ T cell infiltration to improve anti-PD1 efficacy in murine models of pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Immunother Cancer*. 2021 Nov 4;9(11):e002837.
86. Walsh MP, Duncan B, Larabee S, Krauss A, Davis JPE, Cui Y, et al. Val-BoroPro Accelerates T Cell Priming via Modulation of Dendritic Cell Trafficking Resulting in Complete Regression of Established Murine Tumors. *PLoS One*. 2013 Mar 12;8(3):e58860. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0058860>
87. Hugo W, Zaretsky JM, Sun L, Song C, Moreno BH, Hu-Lieskovan S, et al. Genomic and Transcriptomic Features of Response to Anti-PD-1 Therapy in Metastatic Melanoma. *Cell*. 2016 Mar 24;165(1):35–44.
88. Riaz N, Havel JJ, Makarov V, Desrichard A, Urba WJ, Sims JS, et al. Tumor and Microenvironment Evolution during Immunotherapy with Nivolumab. *Cell* [Internet]. 2017 Nov 2 [cited 2022 Jan 8];171(4):934-949.e15. Available from: <http://www.cell.com/article/S0092867417311224/fulltext>
89. Froussios K, Mourão K, Simpson G, Barton G, Schurch N. Relative Abundance of Transcripts (RATs): Identifying differential isoform abundance from RNA-seq. *F1000Research* 2019 8213 [Internet]. 2019 Feb 24 [cited 2022 Jan 19];8:213. Available from: <https://f1000research.com/articles/8-213>
90. Vitting-Seerup K, Sandelin A. The Landscape of Isoform Switches in Human Cancers. *Mol Cancer Res* [Internet]. 2017 Sep 1 [cited 2022 Jan 8];15(9):1206–20. Available from: <https://mcr.aacrjournals.org/content/15/9/1206>
91. He F, Jacobson A. Nonsense-Mediated mRNA Decay: Degradation of Defective Transcripts Is Only Part of the Story. *Annu Rev Genet*. 2015 Nov 23;49:339. Available from: </pmc/articles/PMC4837945/>
92. Park SH, Ham S, Lee A, Möller A, Kim TS. NLRP3 negatively regulates Treg differentiation through Kpna2-mediated nuclear translocation. *J Biol Chem*. 2019 Nov 22;294(47):17951–61. Available from: <http://www.jbc.org/article/S0021925820303690/fulltext>
93. Waumans Y, Baerts L, Kehoe K, Lambeir AM, De Meester I. The dipeptidyl peptidase family, prolyl oligopeptidase and prolyl carboxypeptidase in the immune system and inflammatory disease, including atherosclerosis. *Front Immunol*. 2015;6(JUL):387.
94. Klemann C, Wagner L, Stephan M, von Hörsten S. Cut to the chase: a review of CD26/dipeptidyl peptidase-4's (DPP4) entanglement in the immune system. *Clin Exp Immunol*. 2016 Jul 1 ;185(1):1. Available from: </pmc/articles/PMC4908298/>
95. Salgado FJ, Pérez-Díaz A, Villanueva NM, Lamas O, Arias P, Nogueira M. CD26: a negative selection marker for human Treg cells. *Cytometry A* [Internet]. 2012 Oct [cited 2022 Jan 23];81(10):843–55. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22949266/>
96. Justa-Schuch D, Silva-Garcia M, Pilla E, Engelke M, Kilisch M, Lenz C, et al. DPP9 is a novel component of

- the N-end rule pathway targeting the tyrosine kinase Syk. *Elife*. 2016 Sep 10;5(September).
97. Masters SL, Gerlic M, Metcalf D, Preston S, Pellegrini M, O'Donnell JA, et al. NLRP1 inflammasome activation induces pyroptosis of hematopoietic progenitor cells. *Immunity* [Internet]. 2012 Dec 14 [cited 2022 Jan 23];37(6):1009. Available from: [/pmc/articles/PMC4275304/](#)
 98. Sand J, Fenini G, Grossi S, Hennig P, Di Filippo M, Levesque M, et al. The NLRP1 Inflammasome Pathway Is Silenced in Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *J Invest Dermatol*. 2019 Aug 1;139(8):1788-1797.e6.
 99. Johnson DC, Taabazuing CY, Okondo MC, Chui AJ, Rao SD, Brown FC, et al. DPP8/DPP9 inhibitor-induced pyroptosis for treatment of acute myeloid leukemia. *Nat Med*. 2018 Aug 1;24(8):1151–6.
 100. De Vasconcelos NM, Vliegen G, Gonçalves A, De Hert E, Martin-Perez R, Van Opdenbosch N, et al. DPP8/DPP9 inhibition elicits canonical Nlrp1b inflammasome hallmarks in murine macrophages. *Life Sci Alliance*. 2019 Feb 4;2(1).
 101. Lu L, Wang P, Zou Y, Zha Z, Huang H, Guan M, et al. Il-1 β promotes stemness of tumor cells by activating smad/id1 signaling pathway. *Int J Med Sci*. 2020;17(9):1257–68.
 102. Meadors JL, Cui Y, Chen QR, Song YK, Khan J, Merlino G, et al. Murine rhabdomyosarcoma is immunogenic and responsive to T-cell-based immunotherapy. *Pediatr Blood Cancer*. 2011 Dec 1;57(6):921–9.
 103. Nahas MR, Stroopinsky D, Rosenblatt J, Cole L, Pyzer AR, Anastasiadou E, et al. Hypomethylating agent alters the immune microenvironment in acute myeloid leukaemia (AML) and enhances the immunogenicity of a dendritic cell/AML vaccine. *Br J Haematol*. 2019 May 1;185(4):679–90.
 104. Rausch J, Lopez PA, Bialojan A, Denny M, Langguth P, Probst HC, et al. Combined immunotherapy: CTLA-4 blockade potentiates anti-tumor response induced by transcutaneous immunization. *J Dermatol Sci*. 2017 Sep 1;87(3):300–6.
 105. Albershardt TC, Parsons AJ, Reeves RS, Flynn PA, Campbell DJ, ter Meulen J, et al. Therapeutic efficacy of PD1/PDL1 blockade in B16 melanoma is greatly enhanced by immunization with dendritic cell-targeting lentiviral vector and protein vaccine. *Vaccine*. 2020 Apr 9;38(17):3369–77.
 106. Ji S, Lee J, Lee ES, Kim DH, Sin JI. B16 melanoma control by anti-PD-L1 requires CD8+ T cells and NK cells: application of anti-PD-L1 Abs and Trp2 peptide vaccines. *Hum Vaccines Immunother*. 2021 Jul 3 ;17(7):1910–22. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21645515.2020.1866951>
 107. Zhai Z, Liu W, Kaur M, Luo Y, Domenico J, Samson JM, et al. NLRP1 promotes tumor growth by enhancing inflammasome activation and suppressing apoptosis in metastatic melanoma. *Oncogene*. 2017;36(27):3820–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2017.26>
 108. Ou T, Wei Y, Long Y, Pan X, Yao D. A Novel Pyroptosis-Related Prognostic Signature for Cervical Squamous Cell Carcinoma. *Int J Gen Med*. 2022;15:2057–73.

109. Zhou C, Li C, Zheng Y, Liu X. Identification of pyroptosis-related signature for cervical cancer predicting prognosis. *Aging (Albany NY)*. 2021 Nov 11;13(22):24795–814.
110. Zheng S, Xie X, Guo X, Wu Y, Chen G, Chen X, et al. Identification of a Pyroptosis-Related Gene Signature for Predicting Overall Survival and Response to Immunotherapy in Hepatocellular Carcinoma. *Front Genet*. 2021 Dec 3;12:2528. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2021.789296/full>
111. Ye Y, Dai Q, Qi H. A novel defined pyroptosis-related gene signature for predicting the prognosis of ovarian cancer. *Cell Death Discov*. 2021 Jun 1;7(1):1–11.
112. Xu Z, Xie Y, Mao Y, Huang J, Mei X, Song J, et al. Ferroptosis-Related Gene Signature Predicts the Prognosis of Skin Cutaneous Melanoma and Response to Immunotherapy. *Front Genet*. 2021 Nov 3;12:2139. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2021.758981/full>
113. Hu D, Cao Q, Tong M, Ji C, Li Z, Huang W, et al. A novel defined risk signature based on pyroptosis-related genes can predict the prognosis of prostate cancer. *BMC Med Genomics*. 2022 Dec 1;15(1):24. Available from: <https://bmcmmedgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12920-022-01172-5>
114. Pan XQ, Huang W, Jin LW, Lin HZ, Xu XY. A Novel Pyroptosis-Related Prognostic Signature for Risk Stratification and Clinical Prognosis in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Dis Markers*. 2022;2022.
115. Thibult ML, Mamessier E, Gertner-dardenne J, Pastor S, Just-landi S, Xerri L, et al. PD-1 is a novel regulator of human B-cell activation. *Int Immunol*. 2013 Feb 1;25(2):129–37. Available from: <https://academic.oup.com/intimm/article/25/2/129/2950762>
116. Griss J, Bauer W, Wagner C, Simon M, Chen M, Grabmeier-Pfistershammer K, et al. B cells sustain inflammation and predict response to immune checkpoint blockade in human melanoma. *Nat Commun*. 2019 Sep 13 ;10(1):1–14. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-019-12160-2>
117. Yuan S, Liu Y, Till B, Song Y, Wang Z. Pretreatment Peripheral B Cells Are Associated With Tumor Response to Anti-PD-1-Based Immunotherapy. *Front Immunol*. 2020 Oct 9;11:2208.
118. Cabrita R, Lauss M, Sanna A, Donia M, Skaarup Larsen M, Mitra S, et al. Tertiary lymphoid structures improve immunotherapy and survival in melanoma. *Nature*. 2020 Jan 15;577(7791):561–5. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41586-019-1914-8>
119. Yap JKY, Pickard BS, Chan EWL, Gan SY. The Role of Neuronal NLRP1 Inflammasome in Alzheimer's Disease: Bringing Neurons into the Neuroinflammation Game. *Mol Neurobiol*. 2019 Nov 1;56(11):7741–53. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12035-019-1638-7>
120. Marques-Coelho D, Iohan L da CC, Melo de Farias AR, Flaig A, Letournel F, Martin-Négrier ML, et al. Differential transcript usage unravels gene expression alterations in Alzheimer's disease human brains. *npj Aging Mech Dis*. 2021 71. 2021 Jan 4;7(1):1–15. Available from:

<https://www.nature.com/articles/s41514-020-00052-5>

6. Anexos

ANEXO A – Produção científica e atividades extracurriculares

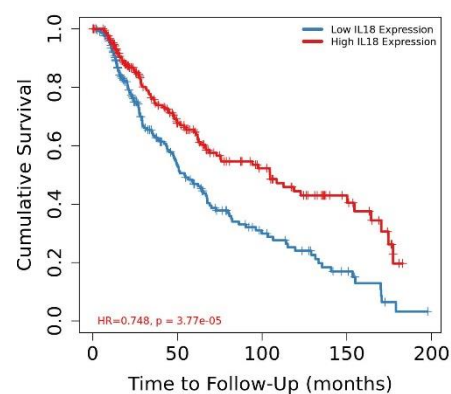
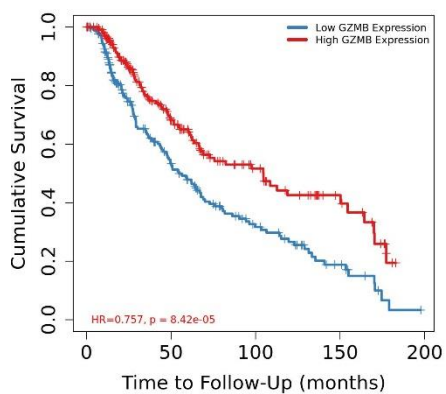
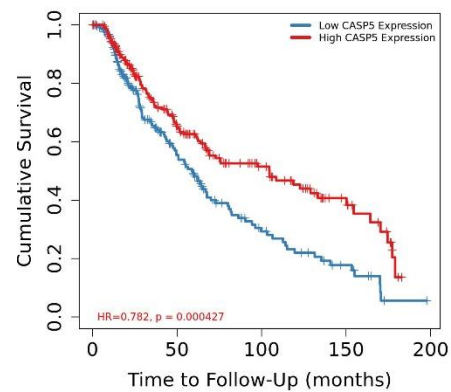
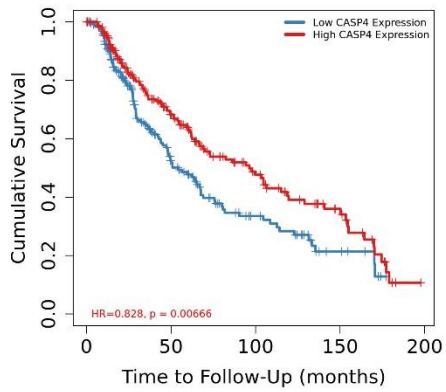
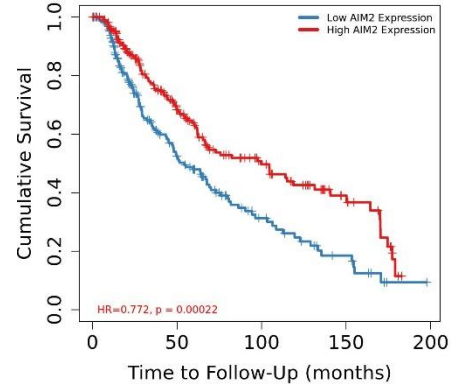
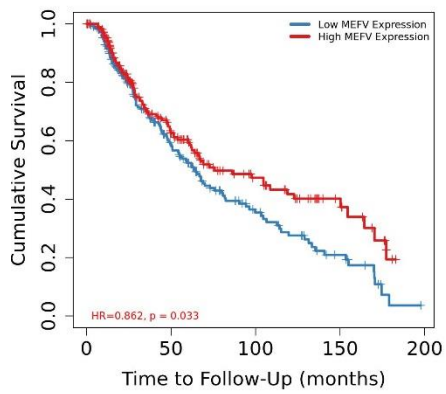
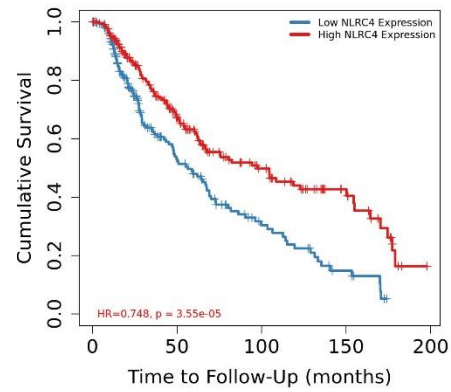
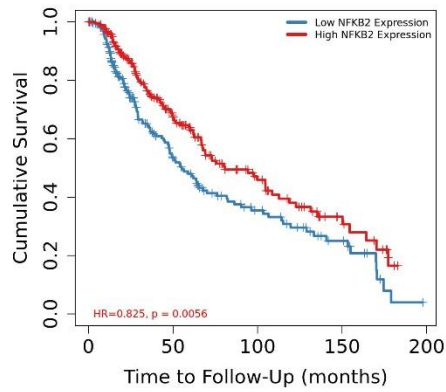
Artigos publicados

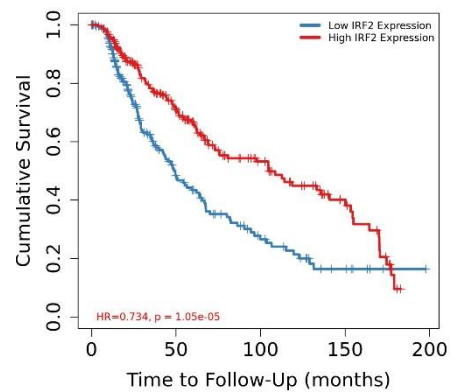
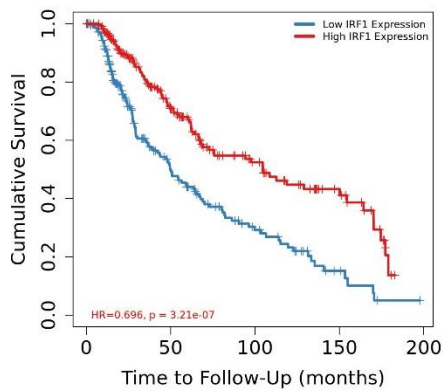
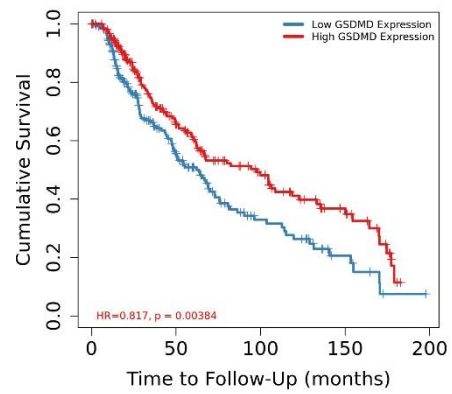
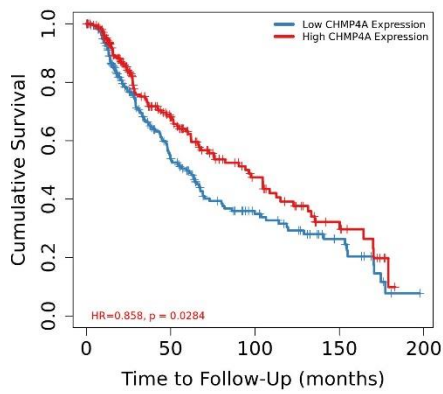
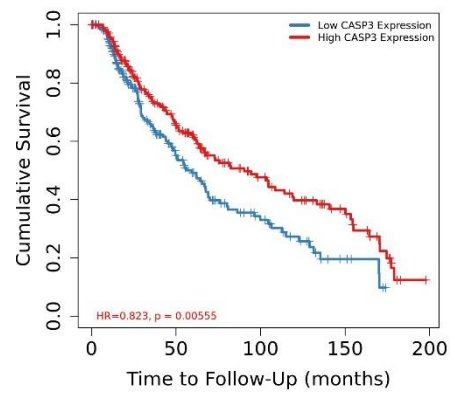
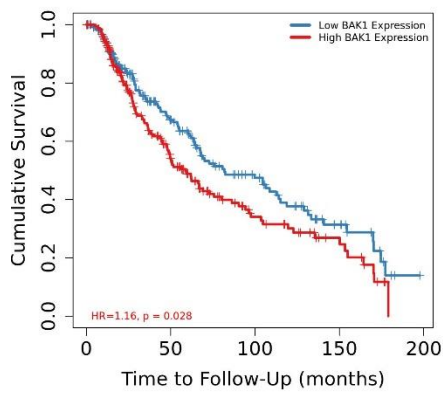
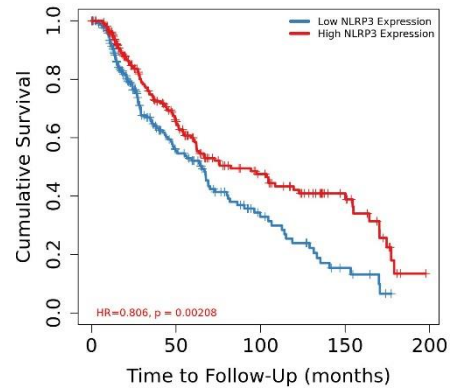
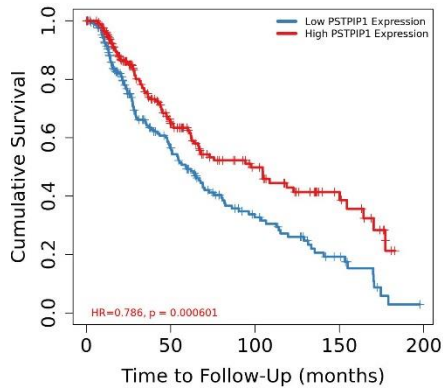
- Leite JA, Ghirotto B, Targhetta VP, Lima J de, Câmara NOS. Sirtuins as pharmacological targets in neurodegenerative and neuropsychiatric disorders. *Br J Pharmacol.* 2021; Available from: <https://bpspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/bph.15570>
- Targhetta VP, Amaral MA, Camara NOS. Through DNA sensors and hidden mitochondrial effects of SARS-CoV-2. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 2021 Aug 23; 27:20200183. Available from: <http://www.scielo.br/j/jvatitd/a/THP3Lynn4JvsgFfbLNNd8GP/?lang=en>

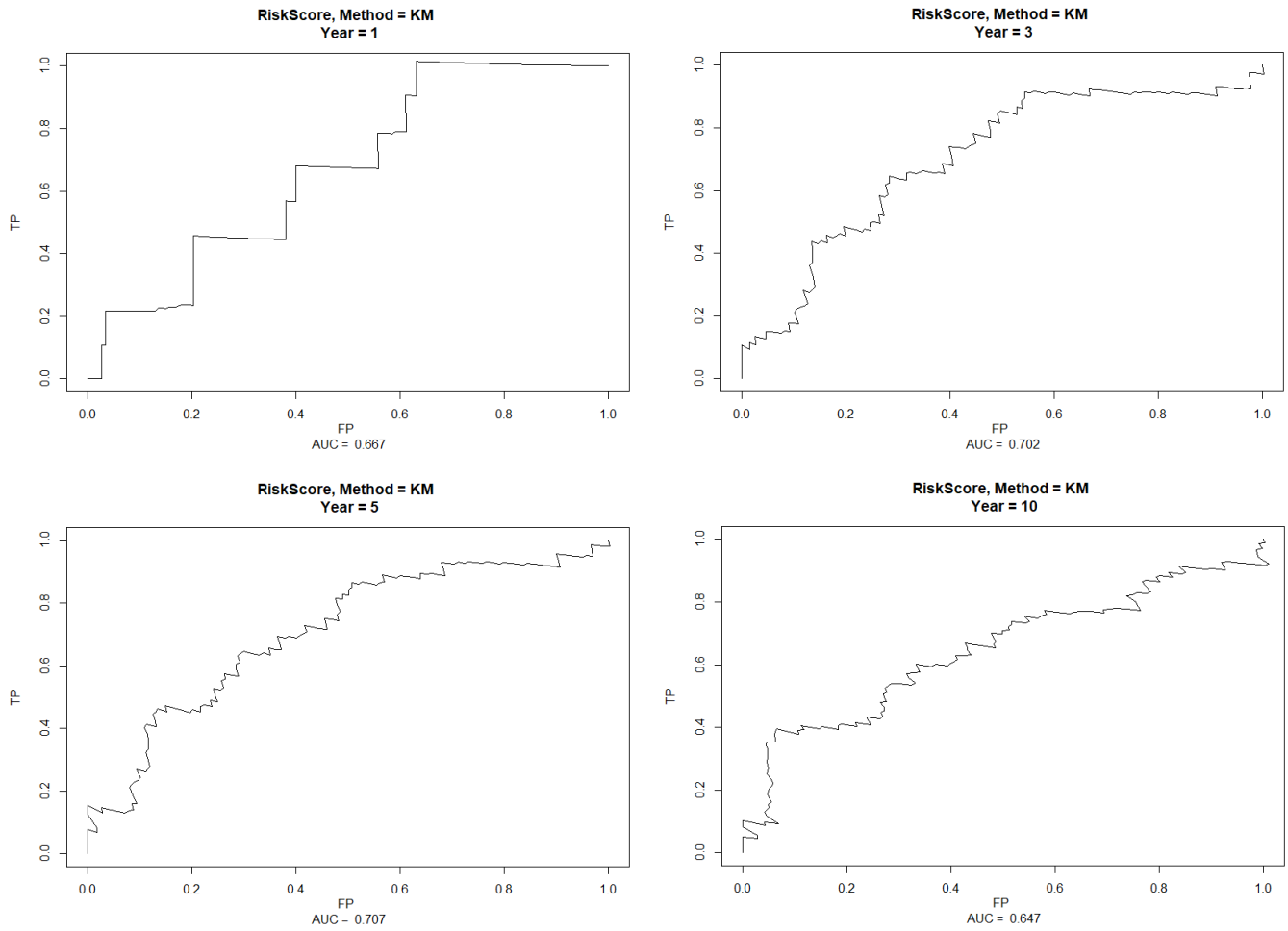
Participação em eventos e congressos

- *IX Annual Meeting of the Postgraduate Program in Immunology. Video Presentation. 2020.*
- *X Annual Meeting of the Postgraduate Program in Immunology. The role of NLRP1 in the Th17 cell response. 2021.*
- Curso de Imunometabolismo – SBI, 25 e 26 de agosto de 2021
- 45º Congresso Anual da Sociedade Brasileira de Imunologia (SBI)
- *“The Ageing Immune System” 2021 Masoro Barshop Conference on Ageing*
- *11th Annual Inflammation Symposium – Fox Chase Cancer Center*
- *OMICS and DATA SCIENCE – rsg-brazil*

ANEXO B – Curvas de sobrevivência dos pacientes da coorte TCGA-SKCM em relação aos genes utilizados para a construção do score de risco





ANEXO C – Curvas ROC e área sobre a curva do escore de risco proposto na subcoorte de teste

Curvas ROC e respectivas áreas sob curva representativas de 1, 3, 5 e 10 anos de sobrevivência dos pacientes da coorte de teste a partir do modelo de escore de risco construído.

ANEXO D – Tabela de DEGs (primeiros 40 colocado segundo FDR)

Hugo etal.			Riaz etal.		
Gene	logFC	FDR	Gene	logFC	FDR
LGR6	-5,94807	0,000325	CD19	5,16345	1,78E-05
FOXC2	-3,21445	0,000325	CLEC17A	4,961907	1,78E-05
VTN	7,216877	0,000325	DGKE	3,871306	5,87E-05
ALDOB	9,69302	0,00064	LINC02397	4,258734	5,87E-05
HPX	7,809717	0,000965	TNFRSF13C	3,321461	0,000374
ALDH1L2	-2,244	0,000965	FBN2	3,512566	0,000374
SFN	8,513224	0,000965	CHRM5	6,122846	0,001078
TMEM100	-3,80373	0,000965	PPP1R16B	2,183362	0,002148
KRT17	8,033243	0,000965	NIBAN3	4,223945	0,002229
STC2	-2,5121	0,000965	ATP8B1	4,459509	0,004078
BGLAP	-3,85625	0,000965	TRBC2	4,426571	0,005085
IGKV2-24	-8,92701	0,000965	P2RX5	4,618682	0,005649
ADCYAP1	-6,59831	0,001475	CNR2	4,347126	0,006307
FHL5	-2,83852	0,001477	BANK1	3,61849	0,006307
ELN	-2,99882	0,002792	IGHV3-73	6,008519	0,006809
APOA1	9,54674	0,002856	GP1BA	2,620746	0,00981
MTCO3P12	6,946061	0,002856	FGA	2,681825	0,010482
ITIH4	5,861479	0,002856	PAX5	4,163989	0,010978
LYPD3	5,263303	0,002856	TLR10	3,607103	0,011769
PLPPR4	-3,91866	0,002876	ANKRD33B	2,020597	0,011769
CKM	6,357994	0,002978	FMO5	2,751404	0,015418
ADH6	6,419969	0,003141	GPR18	3,210347	0,015719
TNNC2	4,992222	0,003141	IRAG2	2,598152	0,018261
HSD17B13	5,150582	0,00349	KCNJ2	2,219429	0,019796
LAYN	-2,88423	0,00349	CXCL13	3,616969	0,020866
MXRA8	-2,6391	0,003687	ATP2A3	2,289812	0,02309
NAPSA	-4,08532	0,003707	PWAR5	2,429592	0,023234
SSTR2	-3,34587	0,003707	VPREB3	5,151672	0,023234
DRAXIN	-4,52765	0,003707	FAM151A	5,006001	0,023234
MMP13	-5,86391	0,003707	GRAP	2,27906	0,023234
SLC10A4	-4,15433	0,003975	FCER2	4,812744	0,023234
C1QTNF12	-3,41493	0,004055	PSCA	4,274734	0,023234
FLG	5,064885	0,004064	NELL2	2,133039	0,023234
GOLGA8S	-4,19676	0,004064	C1orf116	-4,7682	0,023576
ACAN	-3,07484	0,004064	TCL1A	5,288537	0,02424
AOC3	-3,0246	0,004064	RGS13	4,29795	0,024622
KRT10	4,051685	0,004064	PRSS12	3,451193	0,024622
TRPA1	-4,61093	0,004064	CR2	5,779791	0,024622
FOXL1	-2,70874	0,004064	SEPTIN1	2,357646	0,025517
MSX1	-2,90135	0,004064	FDCSP	5,054474	0,025517

ANEXO E – Tabela de DETs (primeiros 40 colocado segundo FDR)

Hugo et al.			Riaz et al.		
Gene	logFC	FDR	Gene	logFC	FDR
PRKAR1A	-5,76526	0,002279	HSD17B11	5,821103	1,42E-06
VTN	7,428951	0,002279	EDEM1	7,9071	1,46E-06
FOXC2	-3,21475	0,002279	H6PD	8,508955	3,37E-05
MXRA8	-4,39504	0,002279	P2RX5-TAX1BP3	4,486697	7,20E-05
PKDCC	-2,58872	0,002279	PEBP1	4,442066	0,00014
ALDOB	9,88216	0,002279	LINC02397	4,229326	0,00076
RAVER1	-5,98233	0,002279	METTL8	3,115886	0,002931
FGFR1	-4,87433	0,002386	RPS2	3,287305	0,002931
FAM131B	-6,07347	0,002386	DIABLO	2,445009	0,003029
YAP1	-5,70705	0,002798	NA	4,781712	0,003029
TMEM199	3,596895	0,002798	TNFRSF13C	3,323819	0,003029
MUC20P1	-4,87136	0,002798	CHRM5	6,151158	0,005036
HPX	8,639264	0,002798	CD19	4,940663	0,005799
SFN	8,642478	0,002798	CS	4,998358	0,009142
ZMIZ1-AS1	-3,64397	0,003559	SH2B3	5,325294	0,009313
IGKV2-24	-8,87973	0,004202	HPR	5,539297	0,009831
DCSTAMP	-5,3066	0,004202	LINC00926	2,935665	0,01082
NTSR1	-5,28774	0,004517	C6	6,216106	0,014981
TSHZ3	-2,00545	0,004788	ORM1	9,007842	0,014981
SLC27A5	6,166467	0,004788	STOM	6,448116	0,014981
ABHD14B	4,677792	0,004979	TNRC18	4,685953	0,015277
ITGA5	-4,00714	0,005303	CNOT1	7,450285	0,016858
MFAP2	-4,24881	0,005303	ICAM2	4,815926	0,016858
PRICKLE4	-1,93775	0,005303	PRG4	5,633063	0,016858
COL17A1	6,59135	0,005303	PEAK1	5,157014	0,016858
EIF3L	6,850041	0,005803	TRBC2	4,418252	0,017387
STC2	-2,51727	0,005996	ALB	4,207403	0,017387
SORCS2	-4,43424	0,006246	ARPC4-TTLL3	-10,4027	0,01892
CARD8	-3,79733	0,006246	FCRL1	4,373402	0,019662
NAPSA	-5,13893	0,00626	PRDX6	5,035841	0,01975
MUC20	-4,34231	0,00626	P2RX5	4,310434	0,01975
CEP131	-3,70485	0,007352	MGST1	2,261289	0,020511
ATP6V1G1	-2,95303	0,007352	IGHV3-73	5,980696	0,020511
NID1	-9,18878	0,007522	FGB	2,634822	0,020511
TWF2	-2,1518	0,007767	CNR2	4,328116	0,022806
PJKK	-3,83524	0,007884	BSCL2	5,140424	0,024256
MTCO3P12	6,894132	0,00823	NCOA2	5,264839	0,02445
CKM	6,395805	0,009129	CYP2C9	7,135159	0,025576
HSD17B13	5,319274	0,009129	ADD3	5,016356	0,02877
UCHL1	-4,96916	0,010253	CALM2	4,536903	0,02877

ANEXO F – Exons do novo transcrito

Na tabela abaixo é possível observar as posições genômicas do novo possível transcrito encontrado do gene RDH16. Em destaque estão as únicas diferenças (cerca de 50nt) entre ambos os datasets.

Transcript	Hugo etal.		Riaz etal.	
	56951378	56959374	56951431	56959374
Exon1	56951378	56952246	56951431	56952246
Exon2	56952827	56952990	56952827	56952990
Exon3	56954906	56955164	56954906	56955164
Exon4	56957138	56959374	56957138	56959374

Em comparação, o consorcio ENSEMBL tem em seu banco de dados apenas duas isoformas anotadas, sendo uma delas referente as posições [56951438-56959374](#), porém contendo apenas 3 exons, e outra não codificante com posição [56951431-56957608](#), contendo também apenas 3 exons

ANEXO G – Tabela de DUTs (40 melhores colocados segundo ValorQ)

gene_name	IF1	IF2	dIF	isoform_switch_q_valu e	switchConsequencesGen e	Rank
RNF216	0,366	0,516	0,15	0	NA	1
PLCG1	0,638	0,766	0,128	0	NA	2
GOLM1	0,439	0,318	-0,12	0	FALSE	3
GOLM1	0,556	0,673	0,117	0	FALSE	4
ETFA	0,256	0,134	- 0,123	0	TRUE	5
FURIN	0,655	0,487	- 0,168	0	NA	6
KIAA0319L	0,652	0,779	0,128	0	NA	7
NAXE	0,334	0,467	0,134	0	NA	8
RGS14	0,473	0,599	0,126	0	NA	9
GRK2	0,439	0,648	0,209	0	NA	10
MAGED1	0,285	0,421	0,136	0	NA	11
DYNC1H1	0,702	0,809	0,106	0	NA	12
SDAD1	0,542	0,672	0,13	0	TRUE	13
MT-ATP6	0,18	0,583	0,403	0	TRUE	14
SLC39A14	0,477	0,312	- 0,165	2,00E-301	FALSE	15
EPS15	0,338	0,539	0,202	1,07E-299	TRUE	16
MRPL37	0,337	0,593	0,257	1,06E-279	TRUE	17
CTNNBIP1	0,15	0,049	- 0,101	1,43E-270	FALSE	18
BAG4	0,626	0,441	- 0,185	9,54E-253	FALSE	19
BAG4	0,36	0,547	0,187	1,05E-252	FALSE	20
COPS3	0,594	0,282	- 0,311	1,74E-251	NA	21
RNASEK- C17orf49	0,197	0,301	0,104	1,50E-249	NA	22
SEL1L	0,438	0,326	- 0,112	1,40E-245	NA	23
WDR36	0,329	0,599	0,271	1,07E-243	FALSE	24
ARFGAP2	0,304	0,412	0,108	6,16E-243	NA	25
THADA	0,336	0,449	0,113	8,77E-239	FALSE	26
IGHG2	0,226	0,046	-0,18	1,08E-238	NA	27
PPP1R21	0,299	0,441	0,142	1,06E-232	TRUE	28
CEP350	0,207	0,334	0,127	4,82E-223	NA	29
SLC41A3	0,419	0,558	0,139	1,69E-220	NA	30
GLB1L	0,118	0,225	0,108	2,21E-215	NA	31
CDKN1C	0,284	0,454	0,17	2,70E-212	NA	32
FAM13B	0,336	0,451	0,115	3,91E-208	NA	33
EDEM3	0,251	0,433	0,182	1,85E-191	FALSE	34
MYOF	0,521	0,672	0,151	1,69E-179	NA	35
TMTC4	0,158	0,27	0,112	4,51E-179	TRUE	36

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "O papel de NLRP1 na resposta antitumoral mediada por linfócitos Th17.", protocolada sob o CEUA nº 2906200220, sob a responsabilidade de **Niels Olsen Saraiva Câmara e equipe; Vitor Pedro Targhetta; Cristiane Naffah de Souza** - 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 da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo) (CEUA-ICB/USP) na reunião de 24/08/2020.

We certify that the proposal "The role of NLRP1 inflamassome in the antitumor response mediated by Th17 lymphocytes.", utilizing 57 Genetically modified mice (GMO) (30 males and 27 females), 57 Isogenics mice (30 males and 27 females), protocol number CEUA 2906200220, under the responsibility of **Niels Olsen Saraiva Câmara and team; Vitor Pedro Targhetta; Cristiane Naffah de Souza** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Biomedical Sciences Institute (University of São Paulo) (CEUA-ICB/USP) in the meeting of 08/24/2020.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: 24 meses

Depto/Setor: [Imunologia](#)

Origem:	Biotério do Departamento de Imunologia		
Espécie:	Camundongo geneticamente modificado (OGM)	sexo: Machos	Idade ou peso: 7 a 12 semanas
Linhagem:	NLRP1b KnockOut	N amostral:	30
Origem:	Biotério do Departamento de Imunologia		
Espécie:	Camundongos isogênicos	sexo: Machos	Idade ou peso: 7 a 12 semanas
Linhagem:	C57Bl/6	N amostral:	30
Origem:	Biotério do Departamento de Imunologia		
Espécie:	Camundongos isogênicos	sexo: Fêmeas	Idade ou peso: 7 a 12 semanas
Linhagem:	C57Bl/6	N amostral:	27
Origem:	Biotério do Departamento de Imunologia		
Espécie:	Camundongo geneticamente modificado (OGM)	sexo: Fêmeas	Idade ou peso: 7 a 12 semanas
Linhagem:	NLRP1b KnockOut	N amostral:	27

São Paulo, 01 de agosto de 2022



Universidade de São Paulo
**Comissão de Ética no
Uso de Animais**

Luciane Valéria Sita

Profa. Dra. Luciane Valéria Sita
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

Prof. Dr. Francemilson Goulart da Silva
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)