

SILVIA LUCENA LAGE

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

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

Área de concentração: Imunologia

Orientadora: Profa. Dra. Karina Ramalho Bortoluci

Versão original

São Paulo
2015

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

1.1 Visão geral sobre o mecanismo de ação de adjuvantes vacinais

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

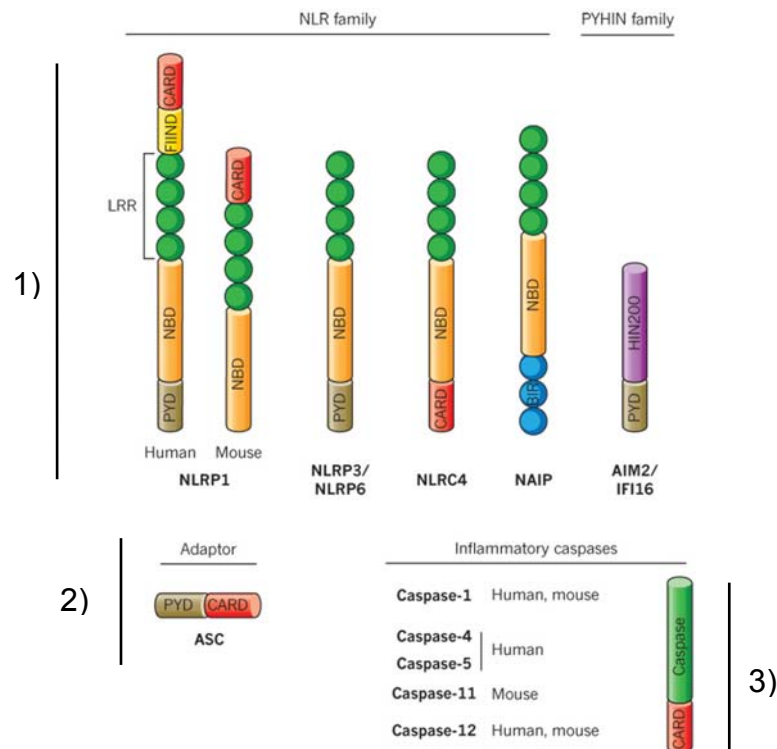
Entretanto, o papel dos TLRs na resposta de anticorpos induzida por adjuvantes vem sendo questionado. Recentes estudos demonstraram que os TLRs e as moléculas envolvidas nas suas vias de sinalização intracelular não são sempre requeridos para a resposta humoral induzida por alguns adjuvantes clássicos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

1.2 Ativação dos inflamassomas e suas consequências para a resposta imune

1.2.1 Formação e ativação dos inflamassomas

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

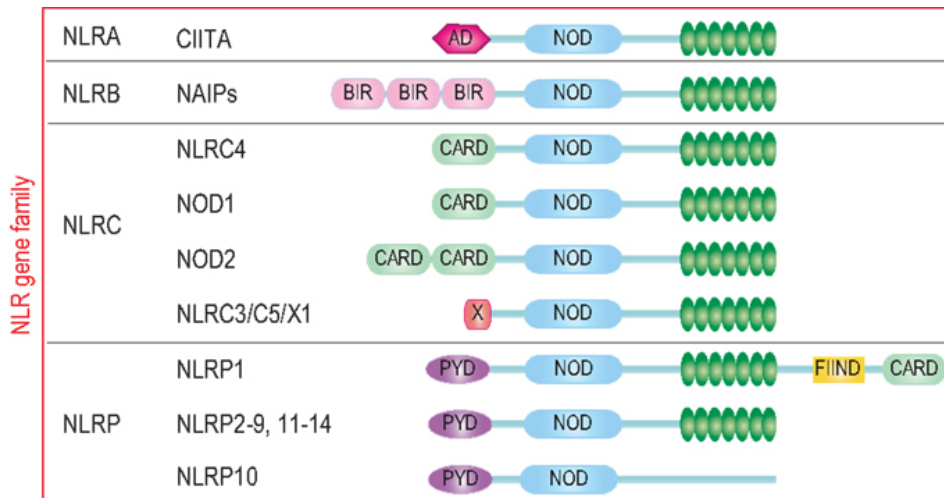
Figura 1- Moléculas que compõem os complexos inflamassomas.



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

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

Figura 2 - Classificação dos membros da família NLR.



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

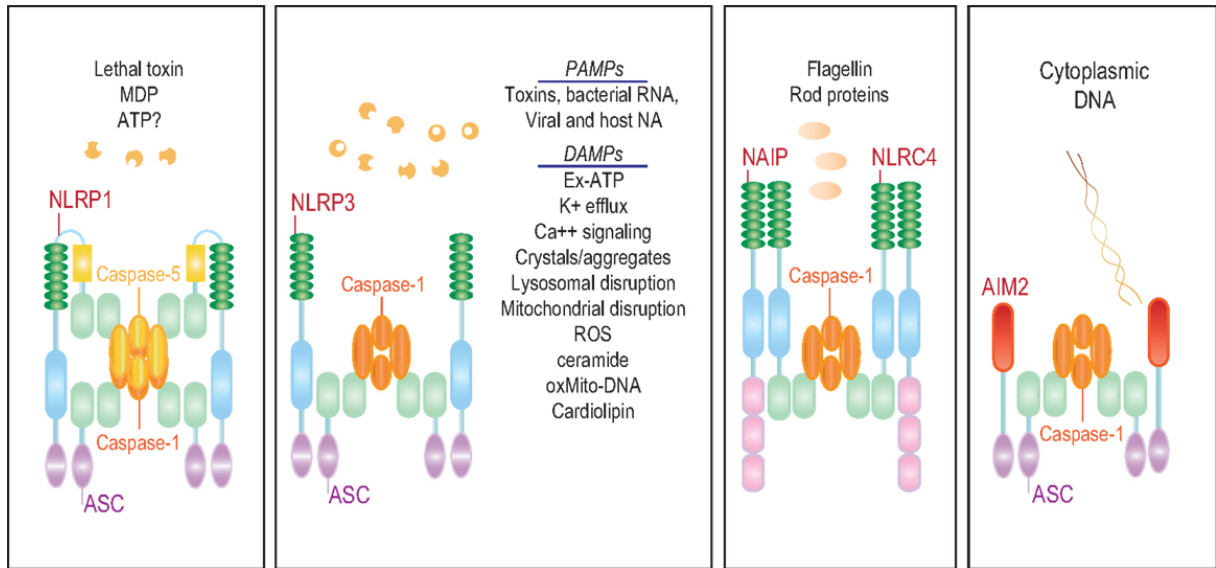
Juntamente com o inflamassoma formado pelo AIM2, os membros da família NLR: NLRP1, NLRP3 e NLRC4 formam os complexos melhor caracterizados (Figura 3). Em roedores, como camundongos e ratos, NLRP1 responde à presença citosólica da toxina letal do *Bacillus anthrax* (Faustin et al., 2007; Hellmich et al.,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

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

NLR4 para formarem o complexo inflamassoma. O inflamassoma NAIP/NLR4 é talvez o complexo inflamassoma mais estudado no que concerne a resistência à infecções. Seu envolvimento tem sido reportado no controle de infecções como *Salmonella typhimurium* (Mariathasan et al., 2004; Miao et al., 2010) *Legionella pneumophila* (Zamboni et al., 2006) *Pseudomonas aeruginosa* (Miao et al., 2008; Sutterwala et al., 2007), *Yersinia pestis* (Brodsky et al., 2010), *Shigella. flexneri* (Suzuki et al., 2007) e *Aeromonas veronii* (McCoy et al., 2010).

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

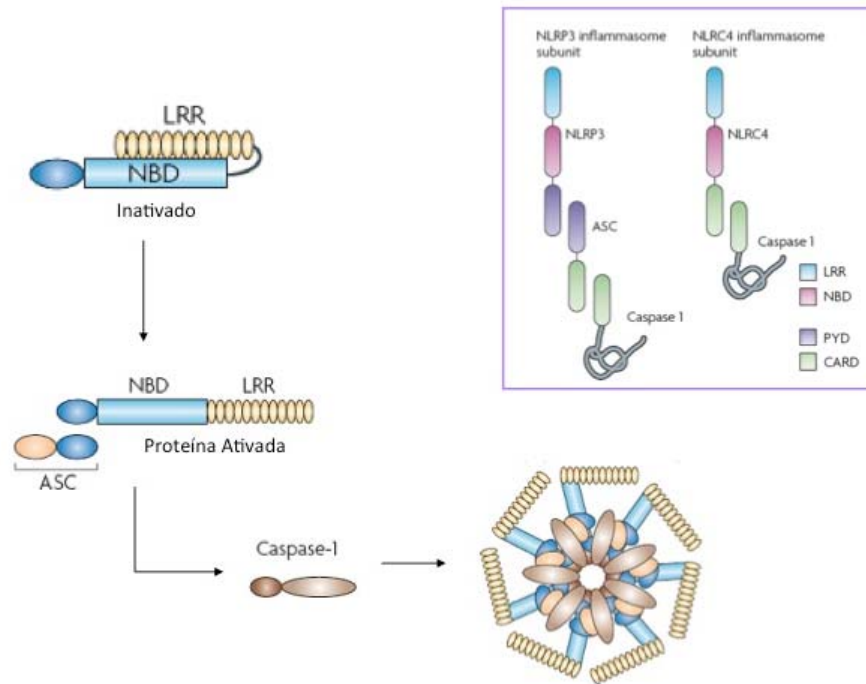
Figura 3 – Inflamassomas melhor caracterizados até o momento.



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

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

Figura 4 – Representação esquemática da formação do complexo inflamassoma.



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.2.3 Mecanismos efetores mediados pelos inflamassomas

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.3 Propriedades adjuvantes dos agonistas de inflamassomas

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

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

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

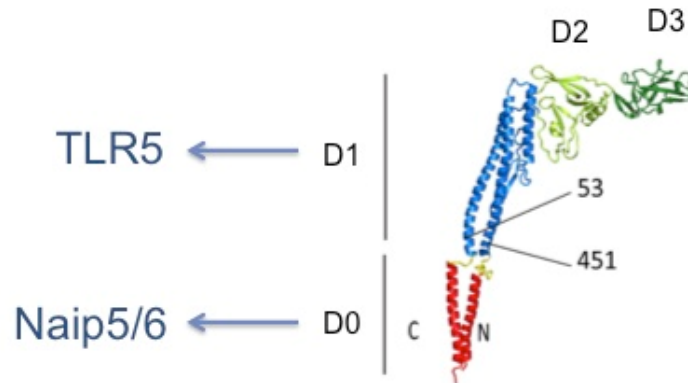
diferenciação de monócitos recrutados em DCs inflamatórias (Kool et al., 2008b) e é responsável pela indução de resposta imune humoral dependente de perfil Th2, em camundongos (Behrens et al., 2008). Outra proteína considerada um sinal de dano celular, o HMGB1, é uma proteína intracelular que se liga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

1.3.1 A flagelina bacteriana como ferramenta vacinal

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

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

Figura 5 – Representação esquemática da estrutura da flagelina.



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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.4 Justificativa

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

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

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

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

REFERÊNCIAS*

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

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

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

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

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

Akhter A, Gavrilin MA, Frantz L, Washington S, Ditty C, Limoli D, Day C, Sarkar A, Newland C, Butchar J, Marsh CB, Wewers MD, Tridandapani S, Kanneganti TD, Amer AO. Caspase-7 activation by the Nlrc4/Ipaf inflammasome restricts *Legionella pneumophila* infection. *PLoS Pathogen*. 2009;5(4):e1000361.

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

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

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

*De acordo com:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2008;27(50):6434-51.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

6.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Chemotherapy. 2015.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Silveira TN, Zamboni DS. Pore formation triggered by *Legionella* spp. is an NlrC4 inflammasome-dependent host cell response that precedes pyroptosis. *Infection and Immunity*. 2010;78(3):1403-13.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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