Maíra Macedo de Sant' Anna Pernavia

**PAPEL DOS RECEPTORES DO TIPO TOLL NA
MORTE CELULAR INDUZIDA POR ATIVAÇÃO
(AICD) DE LINFÓCITOS T**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a
obtenção do Título de Mestre em Ciências (Imunologia).

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. João Gustavo P. Amarante-Mendes

São Paulo
2009

RESUMO

Sant' Anna M.M. Papel dos receptores do tipo Toll na morte induzida por ativação (AICD) de linfócitos T [dissertação (Mestrado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2009.

A ativação dos linfócitos T tem como consequência a proliferação de clones antígeno-específicos e a diferenciação da progênie em células efetoras e de memória. A fase de expansão clonal é seguida pela redução do nível de linfócitos T ativados que depende, em parte, de um processo de morte celular induzida por ativação (AICD). Os receptores do tipo Toll (TLRs) foram inicialmente descritos em células da resposta imune inata e mais recentemente foram encontrados em linfócitos T. Resultados prévios do nosso grupo mostraram que macrófagos e células dendríticas quando são estimulados com LPS, um agonista de TLR4, produzem prostaglandina E₂, que inibe a AICD de linfócitos T CD4⁺ (Weinlich *et al*, 2008). Porém, os efeitos da ação direta de TLR nos linfócitos T sobre os processos de sobrevivência destas células ainda foram pouco elucidados. Sendo assim, o presente projeto tem como objetivo verificar se a estimulação dos diferentes TLRs pelos seus respectivos agonistas é capaz de modular a AICD em um modelo *in vitro* utilizando o hibridoma de linfócito T DO11.10. Inicialmente, demonstramos que este hibridoma expressa os TLR1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9 e 11, sendo que a expressão dos TLR8 e TLR9 ficou abaixo do limite detectável. Dentre todos os agonistas utilizados somente o Imiquimod, um agonista de TLR7, reduziu significativamente a morte celular quando adicionado durante a indução de AICD. Foi detectada uma forte inibição da expressão de CD95L, tanto no nível de mRNA quanto protéico em linfócitos estimulados via TCR/CD3 na presença de Imiquimod. Em conjunto, estes resultados indicam que, além de um efeito indireto e dependente de células da imunidade inata, agonistas de TLR podem também modular diretamente a sobrevivência de linfócitos T.

Palavras-chave: Receptores do tipo Toll; Apoptose; Fas; FasL; Padrões moleculares associados à patógenos; Imiquimod.

ABSTRACT

Sant' Anna M.M. Role of Toll-Like Receptors in the activation-induced cell death (AICD) of T cells hybridoma [Master thesis (Immunology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2009.

Activation of T cells results in antigen-specific clonal expansion and also differentiation to effector and/or memory cells. To maintain homeostasis, the majority of activated T cells must be removed after elimination of the invading pathogen. The main mechanism ensues this population contraction, namely *activation-induced cell death* (AICD). Following the discovery of *Toll-like receptors* (TLRs) on the surface of antigen-presenting cells and the establishment of their importance for innate immune response, the interest to investigate the effect of TLRs in the adaptive immune response were highly raised after the recent detection of TLRs in T cells. However, until now, very little is known about the role of these receptors in maturation, activation, differentiation, proliferation and death of T cells. As most of the TLR ligands are pathogen-derived, it is reasonable to ask whether these ligands can interfere with T cell death. Thus, the main goal of this research is to investigate the influence of TLR ligands on AICD of T lymphocytes. Initially, we demonstrated that this hybridoma expresses TLR1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9 and 11, and the expression of TLR8 and TLR9 was below the detectable limit. Among all TLR ligands used, imiquimod significantly reduced cell death rates when added during anti-CD3 stimulation of T cells (AICD). We detected a strong inhibition of CD95L expression at both mRNA and protein in lymphocytes stimulated via TCR/CD3 in the presence of Imiquimod, which directly correlates with the levels of AICD. Together, these results indicate that in addition to an indirect effect and cell dependent innate immunity, TLR agonists can also directly modulate the survival of T lymphocytes, suggesting a new way about how the immune system is able to perceive and react to the presence of pathogens.

Key words: Toll-like receptors; Apoptosis; Pathogen-associated molecular pattern; Fas; FasL; Imiquimod.

1 INTRODUÇÃO

1.1 RECEPTORES DO TIPO TOLL (TLRs)

O gene para o receptor Toll foi descoberto em meados dos anos 80 por Eric Wieschaus e Christiane Nüsslein-Volhard como um gene que atuava durante o desenvolvimento embrionário da mosca *Drosophila melanogaster* para especificar o padrão dorsoventral correto do inseto. Durante as primeiras horas do desenvolvimento do ovo da *Drosophila*, um sinal é originado das células foliculares da mosca mãe e um programa de diferenciação no lado ventral do embrião é ativado. Como resultado, tem-se a ativação de um grande número de genes resultando na formação de estruturas específicas necessárias para a formação ventral da mosca. No *screening* genético realizado por Wieschaus e Nüsslein-Volhard, os quais ganharam o prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia em 1995 pelo seu trabalho pioneiro, eles verificaram que mutações nesse gene, atrapalhavam o desenvolvimento dorso-ventral da *Drosophila*. Nüsslein-Volhard nomeou esse gene de Toll, que seria um termo substituto para “*legal*”, estupendo, maravilhoso, impressionante. O receptor Toll não atraiu muito a atenção dos pesquisadores por alguns anos, até que outro impressionante aspecto de sua biologia foi descoberto: a sua implicação na resposta imune. Foi quando Bruno Lemaitre e Jules A. Hoffman observaram que mutações neste receptor ou nas moléculas da via de sinalização de Toll deixavam as moscas susceptíveis à infecção pelo fungo *Aspergillus fumigatus*. A causa desta susceptibilidade era que esta mutação afetava a produção do peptídeo microbiano drosomicina [1].

Mais tarde, Charles Janeway e Ruslan Medzhitov identificaram a presença de receptores semelhantes à Toll no genoma humano e os denominaram de *Toll-like receptor* (TLR) [2]. Esses receptores foram descritos primeiramente em componentes celulares da imunidade inata, que quando estimulados pelos seus respectivos ligantes, induziam a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, além de aumentar a expressão de moléculas co-estimuladoras por essas células. Sabe-se hoje que, tanto camundongos quanto humanos possuem receptores semelhantes à Toll (TLR), cada um aparentemente envolvido no

reconhecimento de um padrão molecular associado à patógenos (PAMPs) (Quadro 1).

Quadro 1: Toll-like receptors, seus respectivos agonistas e suas localizações celulares.

Toll-like receptor	Agonistas	Localização celular
TLR1/TLR2/TLR6	Peptidoglicana	Membrana celular
	Lipoproteínas	
	Lipoarabinomanano (micobactéria)	
	GPI (<i>T. cruzi</i>)	
	Zimosan	
TLR4	Lipopolissacarídeo (LPS)	
TLR5	Flagelina	
TLR10	Não identificado	
TLR11	<i>Profilin-like proteins</i>	
TLR3	dsRNA (Poly I:C)	Vesículas Endossomais
TLR7	Imiquimod	
TLR8	Resiquimod (R-848)	
TLR7/TLR8	ssRNA	
TLR9	CpG DNA	

O primeiro TLR isolado, conhecido como TLR4, é necessário para que o camundongo produza uma resposta inicial a lipopolissacarídeos bacterianos (LPS), um componente da superfície celular de bactérias gram-negativas. Animais com deficiência nesse receptor são excepcionalmente susceptíveis à infecção por bactérias gram-negativas [3]. Além de lipopolissacarídeos, os TLRs reconhecem diversos outros componentes de patógenos, como paredes celulares de bactérias, leveduras e fungos, flagelina, RNA viral e DNA bacteriano.

Estes receptores estão em sua maioria na superfície celular. Porém, podem também estar presentes em vesículas endossômicas (Quadro 1). Os TLRs são compostos por um domínio extracelular rico em leucina [LRRs (*leucine-rich repeats*)] responsável pelo reconhecimento de padrões moleculares de patógenos, uma região transmembrana e um domínio citoplasmático TIR (*Toll/interleukin-1 receptor*)

que, interage com o domínio TIR presente nas proteínas adaptadoras e tem papel fundamental na transdução de sinal por esse receptor [4].

Figura 1: Estrutura dos TLRs (*Toll-like receptors*).
FONTE: www.ccr.cancer.gov/news/frontiers/march2006/segal.asp.

Vale ressaltar que apesar dos TLRs serem de extrema importância no reconhecimento de microorganismos, eles não são os únicos PRRs (*Pattern-recognition receptors*) com esta função. Receptores de manose e de β -glucana são moléculas expressas na superfície celular que também participam do reconhecimento e captura de componentes microbianos. Além desses, existem receptores citosólicos como os NLR [NOD (*nucleotide-binding oligomerization domain*)-like receptors] e os RLR [RIG-I (retinoic acid-inducible gene I)-like receptors] cuja função é reconhecer, respectivamente, bactérias e vírus que atingem o citoplasma. Crescem cada vez mais na literatura as evidências que esses outros PRRs podem cooperar com os TLRs no desenvolvimento de uma resposta imune contra patógenos [5].

Além de produtos microbianos, componentes não associados a patógenos, inclusive moléculas endógenas, estão sendo descritos como ligantes de TLR. O exemplo mais citado é o reconhecimento de RNA e DNA endógenos realizado pelos TLR7 e TLR9, respectivamente. Acredita-se que a localização intracelular desses receptores seja uma estratégia para evitar o contato destes com ácidos nucleicos endógenos e facilitar a interação com material genético de microorganismos. Porém,

parece que, pelo menos em células dendríticas plasmocitóides (pDC) e linfócitos B, RNA e DNA do hospedeiro são capazes de ativar esses TLRs se, de alguma forma, entrarem no compartimento endossomal dessas células. Uma potencial fonte de RNA e DNA “self” é a grande quantidade de células que morrem por apoptose.

Normalmente, as células que passam por esse processo de morte celular são eliminadas rapidamente por macrófagos que, em seres humanos, não expressam TLR7 e TLR9. Porém, se há um atraso na eliminação de debris apoptóticos, ou se há auto-anticorpos que reconheçam antígenos expressos em células apoptóticas, esses complexos podem ser direcionados para pDCs ou linfócitos B, onde poderão ativar os TLR7 e TLR9 expressos nessas células. O resultado dessa auto-ativação é a secreção de IFN do tipo I por pDC, e se linfócitos B forem ativados pelo seu receptor de antígenos (BCR), isto pode induzir a diferenciação dessas células em células secretoras de anticorpos (plasmócitos). Estes dois mecanismos são bem aplicados no contexto de auto-imunidade, como por exemplo, no lúpus eritematoso sistêmico [6].

1.2 SINALIZAÇÃO VIA TLR

Após o reconhecimento dos PAMPs pelos TLRs, esses receptores se homodimerizam ou heterodimerizam e sofrem mudanças conformacionais que permitem o recrutamento das moléculas adaptadoras para o domínio TIR dos receptores. Inicia-se então, uma cascata de sinalização intracelular que resulta na produção de citocinas inflamatórias como $\text{TNF}\alpha$, IL-6, IL-1 β e IL-12 e no aumento da expressão de moléculas co-estimuladoras nas APCs. Além do mais, muitos TLRs são capazes de induzir a produção de IFN do tipo I, uma importante citocina de ação antiviral. Essa característica de induzir uma série de citocinas inflamatórias é resultado da ativação de fatores de transcrição como NF- κ B (*Nuclear Factor kappa B*), MAPKs (*mitogen-activated protein kinases*), p38 e JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) e membros da família IRF (*IFN-regulatory factor*).

A sinalização pelos receptores do tipo Toll é iniciada através da interação desses receptores com proteínas citoplasmáticas adaptadoras e co-adaptadoras incluindo MyD88 (*myeloid differentiation factor 88*), MAL (*MyD88 adaptor-like*)/TIRAP (*TIR domain-containing adaptor protein*), TRIF (*TIR-domain-containing adaptor*

inducing $IFN-\beta$) e TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*). A utilização de todas essas moléculas adaptadoras e co-adaptadoras culmina na ativação de NF- κ B com exceção de SARM (*Sterile α - and Armadillo-Motif Containing Protein*), uma molécula recentemente descrita que está envolvida na regulação negativa da sinalização de TLR [7]. Não se sabe exatamente como SARM exerce o seu papel, mas parece que SARM inibe TRIF através da sua interação direta com a molécula. O tratamento de células com LPS leva ao aumento dos níveis protéicos de SARM, indicando um mecanismo de *feedback* negativo na via de TRIF (TRL4 e TLR3) [7]. A via de sinalização de TLR dependente de MyD88 é compartilhada por todos os receptores, com exceção do TLR3 cuja molécula adaptadora envolvida é TRIF (Figura 2).

Figura 2: Via de sinalização por distintos receptores TLRs.
FONTE: Werts, C. et al., 2006.

Dentre os TLRs que seguem essa via de sinalização está o TLR4. O domínio TIR desse receptor interage com o mesmo domínio da molécula adaptadora MyD88 que recruta membros da família IRAK (*IL-1R associated kinase*), como a IRAK-4. IRAK-4 se ativa e fosforila IRAK1 formando um complexo MyD88-IRAKs. Uma vez fosforiladas, as IRAKs são liberadas desse complexo e interagem com TRAF6 [(*TNF (tumour necrosis factor) receptor-associated factor 6*)] ativando-a. TRAF6 ativa TAK1 [*TGF (transforming growth factor)- β -activated kinase 1*] que, por sua vez ativa duas

vias de sinalização, uma envolvendo o complexo IKK (*inhibitor of NF- κ B kinase*) e outra os membros da família das MAPKs (p38 e JNK). O complexo IKK é composto por duas quinases, designadas I κ - α e I κ - β e uma subunidade regulatória I κ K γ /NEMO. O IKK fosforila I κ B, uma proteína citoplasmática que é retentora do fator de transcrição NF- κ B no citoplasma. Uma vez fosforilado, I κ B se dissocia do complexo com o NF- κ B, permitindo sua entrada no núcleo e a ativação de diversos genes envolvidos na síntese de citocinas pró-inflamatórias [8].

Além de ativar NF- κ B por uma via dependente de MyD88, o TLR4 pode ativar esse fator de transcrição também por uma via dependente de TRIF. Porém, quando utiliza essa última via necessita de uma molécula co-adaptadora denominada TRAM [8]. A explicação para o fato de alguns TLRs utilizarem moléculas co-adaptadoras em sua sinalização é baseada no conceito de complementaridade eletrostática. Embora os receptores do tipo Toll sejam altamente conservados, os domínios TIR desses receptores parecem possuir características eletrostáticas distintas. Por exemplo, a interação entre o TLR4 e MyD88 não ocorre de forma direta, sendo MAL a molécula co-adaptadora responsável por essa interação. O domínio TIR de MAL é altamente eletronegativo enquanto que o domínio de TIR de MyD88 é altamente eletropositivo. Como o domínio TIR do TLR4 também é eletropositivo, seria impossível ocorrer a interação direta entre TLR4/MyD88 [9].

Os membros da família dos IRFs (IRF1, IRF3, IRF5 e IRF7) constituem outros fatores de transcrição que podem ser ativados pela via de TLR. Essa família controla a expressão de IFN do tipo I, incluindo IFN- α e IFN- β . A ativação de determinado IRF parece depender do tipo celular envolvido. Células dendríticas plasmocitóides (pDC) expressam altas quantidades de TLR7 e TLR9. Quando são estimuladas com produtos virais como ssRNA e CpG, respondem a esses estímulos com a produção de grandes quantidades de IFN do tipo I. Esse dado levantou uma questão intrigante para os pesquisadores, pois, até o momento, a produção de IFN do tipo I havia sido detectada somente frente à estimulação de TLRs que utilizavam a molécula TRIF como adaptadora, por exemplo, os TLR3 e TLR4. Interessantemente, os TLR7 e TLR9, que sinalizam de forma inteiramente dependente de MyD88, podem ter como produto final a ativação de IRFs e conseqüentemente a produção de IFN do tipo I. A produção dessa citocina via a estimulação com agonistas de TLR7 em pDC parece ser dependente de IRF7 [10].

IRF7 foi identificado formando um complexo de sinalização com IRAK1 e TRAF6. Nesse complexo, o IRF7 é fosforilado, dissocia-se do complexo e migra para o núcleo onde irá ativar genes envolvidos na produção de IFN do tipo I [11].

A produção de IFN do tipo I também pode ser observada em células dendríticas convencionais (cDCs) em resposta a estimulação com produtos virais. Entretanto, o mecanismo regulatório de indução dessa citocina parece ser diferente em pDCs e cDCs. Ao contrário das pDCs, a produção de IFN do tipo I pelas cDCs é dependente de IRF1. Em cDCs deficientes em IRF1 a indução de IFN β em resposta a agonistas de TLR9 está comprometida, enquanto que em pDCs a produção de IFN- β e IFN- α apresenta-se em quantidades normais [12, 13].

Já ativação de IRF5 parece ser crucial na produção de IFN do tipo I via TLR7 em seres humanos e a ativação desse fator de transcrição é regulada de maneira dependente de MyD88, IRAK1 e TRAF6 [14].

Em suma, a estimulação dos TLR com seus respectivos agonistas pode resultar na ativação rápida de NF- κ B e MAPK e mais tardiamente na ativação de IRFs, naqueles receptores cuja MyD88 é utilizada como molécula adaptadora. Por outro lado, nos TLRs que utilizam a molécula TRIF como adaptadora a ativação de NF- κ B e MAPK ocorre mais tardiamente.

1.3 TLR EM LINFÓCITOS T

Embora os TLRs tenham sido identificados primeiramente em componentes celulares da imunidade inata, sabe-se hoje que os receptores do tipo Toll estão presentes também em células da imunidade adaptativa incluindo linfócitos B e linfócitos T (Tabela 1). Linfócitos B de memória (humano) expressam constitutivamente os TLR2, TLR3, TLR4, TLR7, TLR9 e TLR10. A mesma expressão, com exceção de TLR10, foi observada em linfócitos B murinos. A estimulação de linfócitos B via TLR parece promover a proliferação dessas células e aumentar a expressão de múltiplos marcadores de ativação (CD80, CD86, CD25, CD69, MHC II), aumentando a atividade dessas células em co-estimular e apresentar antígenos para linfócitos T. Além do mais, a estimulação de linfócitos B naive via TLR induz a expressão de CD138 (marcador de plasmócitos) e a produção de imunoglobulinas por essas células [15].

Tabela 1: Expressão de TLRs em subtipos de linfócitos T.

TLR	Hu-CD4	Hu-CD8	Hu-Treg	Mu-CD4	Mu-Treg
1	++	+	N/d	+	+
2	++	+	N/d	+	+
3	+	+	N/d	+/-	-
4	+/-	-	+	-	+
5	+	+	++	-	+
6	+/-	+/-	N/d	+	+
7	+/-	-	-	+/-	+
8	+/-	-	++	-	+
9	+	+	N/d	+/-	-
10	-	+/-	N/d	N/d	N/d

Abreviações: Hu-CD4: Linfócitos T CD4⁺ humanos; Hu-CD8: Linfócitos T CD8⁺ humanos; Hu-Treg: Linfócitos Treg humanos; Mu-CD4: Linfócitos T CD4⁺ murinos; Mu Treg: Linfócitos Treg murinos; N/d: não determinado; ++: expressão forte; +: expressão normal; +/-: expressão fraca; -: sem expressão. FONTE: Tabela adaptada de [16]

A expressão de TLR em linfócitos T está descrita na literatura de maneira bastante controversa. Parece que a expressão desses receptores nessas células varia de acordo com cada sub-população celular. Por exemplo, em seres humanos, linfócitos T reguladores, mas não linfócitos T CD4⁺ naive expressam TLR8 e TLR5 [17]. Já a expressão dos TLR1, TLR2, TLR3, TLR5, TLR9 e TLR10 parece variar entre linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ humanos residentes de tonsilas [18]. Em camundongos, além da variação na expressão desses receptores com relação a sub-população de células T, a linhagem do animal parece ser outro fator interferente. Linfócitos T CD4⁺ naive de camundongos BALB/c expressam TLR4, TLR3, TLR5 e TLR9 [19]. Porém, em camundongos C57/BL6, as mesmas células não expressaram TLR4, TLR5 e TLR9 enquanto que os TLR1, TLR2, TLR3, TLR6 e TLR7 foram detectados nesses animais [20].

A expressão de TLR na superfície dos linfócitos T pode ser modulada pela ativação dessas células via o complexo TCR, sendo que, a estimulação por anticorpos anti-CD3 induz a expressão de TLR2 na superfície celular de linfócitos T CD4⁺ virgens (humano/murino) [21, 22] e de linfócitos T CD8⁺ (murino) [23]. Essa estimulação induz também a expressão de TLR4 em linfócitos T CD4⁺ humano,

porém não em linfócitos T CD4⁺ murinos [23]. Não está clara a base molecular da regulação da expressão de TLR dependente do estímulo via TCR. Não se sabe se a sinalização via TCR contribui para a translocação de proteínas de TLR pré-formadas localizadas intracelularmente para a membrana celular ou se isso estimula nova síntese de TLR [24].

Apesar de serem expressos nessas células, o papel dos TLRs na maturação, proliferação, ativação e sobrevivência de linfócitos T é ainda pouco estudado. O que está bem estabelecido na literatura é a capacidade desses receptores em estimular a imunidade adaptativa através da sua ação sobre as APCs. Mas será que os TLRs poderiam ativar diretamente os linfócitos T e qual seria o papel desses receptores nessas células? As respostas para essas perguntas têm sido alvo de grande estudo entre os pesquisadores da área. Uma possibilidade é que ao interagir com seus respectivos ligantes durante a ativação dos linfócitos T via TCR, os TLRs poderiam modular diretamente a função efetora dessas células.

Dados na literatura mostram que TLR2, TLR3, TLR5 e TLR9 atuam como receptores co-estimuladores que estão envolvidos no aumento da proliferação e/ou produção de citocinas pelos linfócitos T. A interação de TLR2 com seu ligante, Pam₃CysSK₄, promove a produção de citocinas co-estimuladoras pelos linfócitos T CD4⁺ (murino/humano) e também a proliferação dessas células, podendo dar início a uma resposta imune [21-23, 25]. Efeitos co-estimuladores têm sido também observados na interação de TLR com outros ligantes como, por exemplo, a flagelina (TLR5) e o R-848 (TLR7/TLR8) que aumentam a proliferação e produção de IFN- γ preferencialmente em linfócitos T CD4⁺ CD45RO⁺ (humano). Isso poderia ser atribuído ao fato de que os linfócitos T de memória já foram estimulados por antígenos e diferentemente dos linfócitos T naive, requerem uma baixa quantidade de sinais estimulatórios para serem ativados [26].

A relação entre TLR e linfócitos T também tem sido importante no desenvolvimento patológico de algumas infecções como, por exemplo, na filariose. Uma bactéria endossimbionte das filarias denominada *Wolbachia*, é conhecida por induzir respostas inflamatórias através da estimulação de TLR2 e TLR4 em monócitos. Porém, dados da literatura sugerem que a estimulação de linfócitos T via TLR por produtos microbianos dessa bactéria podem ter um papel significativo na resposta inflamatória contra a filária. Subash Babu e colaboradores propuseram que a expressão de TLR2 em linfócitos T antígeno-específicos ativados e/ou de memória

pode facilitar a interação de antígenos da filária com o sistema imune do hospedeiro. Mostraram também que, em pacientes com filariose há uma modulação negativa na expressão de TLR2 em linfócitos T e também nas respostas Th1, indicando um possível mecanismo de evasão do parasita às respostas pró-inflamatórias do hospedeiro estabelecendo assim, uma infecção crônica [27].

Há evidências de que a atividade de células T reguladoras também pode ser diretamente regulada por TLR2, TLR4, TLR5 e TLR8. Ligantes de TLR8 (humano) e TLR2 (murino) reduzem o potencial supressor de Treg, com conseqüente aumento na proliferação de linfócitos T CD4⁺. Já os ligantes de TLR5 (humano) e TLR4 (murino) parecem aumentar a capacidade supressora dessas células [17].

Um estudo feito por Imanishi *et al.*, demonstrou recentemente que linfócitos Th1 murinos, mas não Th2, respondem ao estímulo com o agonista de TLR2 mas não a outros agonistas de TLR. Os autores demonstraram que Pam₃CSK₄ e MALP2, ambos agonistas de TLR2, estimularam a produção de IFN- γ por essas células além de induzirem a proliferação e sobrevivência das mesmas na ausência de estímulo via TCR. Mostraram também que esse efeito é aumentado quando se adiciona à cultura IL-2 ou IL-12, indicando que a estimulação de linfócitos Th1 pode ser induzida por dois métodos, sendo um através da interação direta entre os linfócitos T e as APCs e o outro, através da estimulação direta dessas células com produtos microbianos na ausência das APCs [28], sugerindo um novo papel para os TLRs na ativação da resposta imune adaptativa.

1.4 TLR E SOBREVIVÊNCIA DE LINFÓCITOS

Durante um processo infeccioso, a presença de patógenos (PAMPs) no organismo promove a ativação de células do sistema imune que em resposta a esse estímulo começam a produzir uma variedade de citocinas. Estas estimulam a proliferação e diferenciação de células imunes que são responsáveis pela eliminação do patógeno. O número de linfócitos T que estão envolvidos nessa reação imune aumenta drasticamente no período da infecção. Após a eliminação do antígeno, o número de linfócitos T que foram expandidos durante a resposta volta rapidamente ao seu nível basal (homeostasia). Sabe-se que a apoptose é o mecanismo responsável por essa retração clonal, mostrando que a resposta imune

não é regulada somente pela proliferação e diferenciação celular, mas também por um processo de morte celular programada. Embora a ativação dos linfócitos T seja indispensável para a defesa do hospedeiro, é necessário que haja um equilíbrio imunológico, onde as células auto-reativas sejam eliminadas e onde linfócitos T expandidos durante uma resposta imune e que são recorrentemente ativados sigam para o mesmo caminho. A esse último mecanismo de manutenção do equilíbrio imunológico, dá-se o nome de *activation-induced cell death* (AICD).

Está muito bem estabelecido na literatura que o reconhecimento de PAMPs pelas APCs é, sem dúvida, o mecanismo iniciador de uma resposta imune. Sabe-se da importância de agonistas de TLR na ativação dessas células e no conseqüente direcionamento para a resposta imune adaptativa. Porém, a influência direta dos ligantes de TLR em linfócitos T em mecanismos de sobrevivência dessas células, como a AICD, permanece pouco estudada. Gelman e colaboradores mostraram que linfócitos T CD4⁺ expressam mRNA de TLR3 e TLR9 e que o tratamento dessas células com seus respectivos agonistas, poly (I:C) e CpG, aumentou a sobrevivência dessas células sem aumentar sua proliferação. Acredita-se que este efeito pode estar associado com a ativação de NF-κB e com um aumento na expressão de Bcl-X_L por essas células [19]. Outros dados referentes à participação de TLR na sobrevivência de linfócitos T foram publicados pelo grupo do Dr. Esteban Celis. Em um dos trabalhos eles mostraram que a administração repetida de CpG, um agonista de TLR9, em camundongos C57BL/6 induziu a expansão de linfócitos T naive e de memória de maneira antígeno-independente em todos os compartimento de células T, provocando uma linfadenopatia e esplenomegalia nesses animais. A expansão de linfócitos T não se reteve a uma população somente, tanto linfócitos T CD4⁺ quanto linfócitos T CD8⁺ tiveram seus números aumentados e esse aumento não foi devido à proliferação celular e sim à resistência dessas células a dois mecanismos de homeostasia do sistema imune, um deles é a AICD [29].

AICD (*Activation-induced cell death*) foi o nome dado para o processo de apoptose de linfócitos T desencadeado pela re-estimulação via TCR/CD3, sendo inicialmente descrito em hibridomas de linfócitos T [30]. Posteriormente, o mesmo mecanismo foi encontrado em linfócitos T maduros pré-ativados e em todas as sub-populações de linfócitos T CD4⁺ [31, 32]. A principal via de AICD é desencadeada pela interação de FasL (CD95L, CD154) ao receptor cognato Fas (CD95). CD95 é o mais estudado membro da família dos receptores de morte (*Death receptors*), os

quais pertencem à grande família dos receptores de TNF (TNFRs) [33]. O CD95 é expresso em uma variedade muito grande de células como timócitos, linfócitos T ativados, hepatócitos, em células do coração e do rim. CD95 apresenta-se inserido na membrana citoplasmática, possui um domínio extracelular de interação com seu ligante (CD95L), e um domínio intracelular denominado DD (*death domain*) [33]. CD95L por sua vez é uma proteína trimérica que pertence à família de TNF (*tumor necrosis factor*) [34], e pode estar na membrana celular ou na forma solúvel, secretada para o meio extracelular [35]. Bossi e colaboradores sugerem que em linfócitos T e células NK o FasL é sintetizado e armazenado em lisossomos secretórios especializados, e a ativação dessas células pode liberar o FasL para a superfície celular [36].

Linfócitos T maduros, como dito anteriormente, expressam Fas constitutivamente, porém aqueles que são repetidamente estimulados por antígenos, passam a expressar altas quantidades de CD95L. O CD95L liga-se ao CD95 na mesma célula ou nas células adjacentes, agregando três moléculas CD95. Com a trimerização de CD95, as porções intracitoplasmáticas do receptor se aproximam e ocorre o recrutamento de moléculas adaptadoras FADD (*Fas-associated death domain protein*) que interagem com CD95 através de seus respectivos DD (*death domain*) [37]. FADD, então interage com a caspase-8 (*FLICE -FADD-like IL-1 β -converting enzyme*) e/ou caspase-10, através de seus domínios DED (*death effector domain*). Com essa interação há formação de um complexo multimolecular denominado DISC (*death inducing signalling complex*). A caspase-8 sofre ativação autocatalítica, desliga-se de DISC e como resultado tem-se a ativação das caspases efetoras (caspase-3 e -7) com conseqüente iniciação da apoptose [38-42]. Alternativamente, a caspase-8 pode clivar Bid, gerando uma forma truncada dessa molécula (tBid), que migra para a mitocôndria onde iniciará uma via intrínseca de morte, dependente da liberação de proteínas mitocondriais, tais como o citocromo c. O citocromo c citoplasmático liga-se à APAF-1, que por sua vez, recruta a pro-caspase-9. Este complexo, na presença de ATP, permite a auto-ativação de caspase-9, iniciando uma cascata de clivagem de caspases, culminando na ativação de caspase-3, principal proteína responsável pela indução dos principais fenótipos apoptóticos [43].

A expressão de CD95L é regulada predominantemente em nível transcripcional, e parece ser este o principal ponto de controle da AICD. Alguns dos

fatores de transcrição envolvidos nesse processo incluem: NFAT (*nuclear factor of activated T cell*), NF- κ B (*nuclear factor kappa B*), Egr (*early growth response genes*), e IRFs (*interferon regulatory factors*).

NFAT é ativado pela estimulação do complexo TCR/CD3 e é o regulador chave da expressão de CD95L. Após a estimulação do TCR/CD3 há um aumento de cálcio intracelular, que se liga a calmodulina, ativando a calcineurina. A calcineurina é uma fosfatase que desfosforila o NFAT promovendo sua ativação e migração para o núcleo [37]. A Ciclosporina A (CsA) inibe a desfosforilação de NFAT dependente de calcineurina, impedindo a translocação de NFAT para o núcleo e inibindo, conseqüentemente, a transcrição de CD95L [44]. Seqüências consenso para NFAT foram identificadas na região promotora de CD95L de humanos e camundongos [45-47]. Todavia, a indução de CD95L mediada por NFAT requer a participação de AP-1 (*activator protein-1*) (Fos/Jun) e/ou pode também trabalhar em conjunto com SP-1 (*secretory protein-1*) [48, 49].

NF- κ B é outro fator de transcrição envolvido na expressão de CD95L. NF- κ B está presente no citoplasma da célula em associação com seu inibidor – I κ B. A fosforilação de I κ B resulta na degradação proteassomal de I κ B com conseqüente liberação de NF- κ B e sua migração para o núcleo da célula, onde se liga à seqüência promotora de CD95L, promovendo sua transcrição [48].

Outros fatores de transcrição que parecem ser importantes na expressão de CD95L em linfócitos T são os membros da família Egr. Esta família é composta por quatro membros: Egr-1, Egr-2, Egr-3, e Egr-4 [50, 51]. Tanto o Egr-2 (expresso em timócitos) como o Egr-3 (expresso em linfócitos T ativados), são capazes de interagir com a região promotora do gene CD95L, induzindo sua expressão [37]. Além disso, c-Myc, um fator de transcrição envolvido na progressão do ciclo celular, parece regular diretamente a expressão de FasL pelo mesmo mecanismo [52]. A regulação de FasL por c-Myc sugere que somente células T que estiverem proliferando são capazes de expressar FasL eficientemente após a estimulação.

A expressão de CD95L também é influenciada por membros da família IRF. Tanto deleções e mutações em um sítio de ligação previsto para IRF1 no promotor de CD95L, como a supressão da expressão desse fator de transcrição, resulta em expressão deficiente desse gene. Uma expressão forçada tanto de IRF1 ou IRF2 leva a ativação do promotor de CD95L nos linfócitos T [53].

Por fim, existem também fatores de transcrição que tem capacidade repressora. Um deles é o GILZ (*Glucocorticoid-induced leucine-zipper*), um gene regulado por glicocorticóides, capaz de bloquear o aumento de CD95L em hibridomas, interferindo com o processo de apoptose por AICD [54].

Além da modulação do CD95L, existe outro mecanismo de controle da AICD, que é mediado pela interação da molécula c-FLIP com o receptor CD95, dependente do auxílio da proteína adaptadora FADD. c-FLIP é uma molécula que apresenta alta homologia com a caspase-8, possui um domínio de morte, porém carece de um domínio caspase, não apresentando atividade catalítica [55]. Posteriormente c-FLIP inibe competitivamente a ligação da caspase-8 ao complexo protéico associado ao CD95 (DISC) bloqueando o sinal apoptótico.

A importância da via da AICD nos mecanismos de homeostasia do sistema imune pode ser provada analisando camundongos *lpr* e *gld*, que possuem uma deficiência na expressão de CD95 e CD95L, respectivamente. Esses animais apresentam linfadenopatia e esplenomegalia causada pelo acúmulo de linfócitos T ativados [56-58]. Além de alta incidência de doenças auto-imunes com o passar da idade [59]. O mesmo fenótipo pode ser observado em seres humanos portadores de ALPS (*autoimmune lymphoproliferative syndrome*), uma doença linfoproliferativa que é acompanhada de hepatoesplenomegalia, linfadenopatia e alta incidência de linfomas. Essa síndrome pode ser causada principalmente pela deficiência na expressão de CD95 e/ou CD95L ou caspase-8 e FADD [60, 61].

Estas características fenotípicas encontradas nos animais deficientes em CD95 e/ou CD95L e nos pacientes com ALPS suportam fortemente a idéia que o mecanismo de AICD é fundamental para a manutenção da homeostasia dos linfócitos T e da auto-tolerância.

Hildeman e colaboradores mostraram com o desenvolvimento de um camundongo nocaute para Bim, uma molécula da família Bcl-2, que a deleção de linfócitos T periféricos é mais dependente de Bim do que da via do CD95 [62]. Acredita-se que isso aconteça porque ao final da resposta imune, os linfócitos T encontram uma deficiência de estímulos ativadores, tais como fatores de crescimento e a própria eliminação do antígeno [62]. Esse déficit funciona como estímulo apoptótico, ativando a molécula Bim, por liberá-la dos microtúbulos, onde se encontrava em estado inativo. [62]. Por ser da família Bcl-2, Bim pode ser contrabalançado pelos membros anti-apoptóticos desta mesma família, tais como o

Bcl-2 e Bcl-X_L [62]. Porém, quando não há este antagonismo, Bim acaba por ativar Bax e Bak (proteínas pró-apoptóticas), que formam poros na membrana mitocondrial, liberando o citocromo c e iniciando a cascata apoptótica de caspases.

Dados recentes da literatura utilizando camundongos duplo nocautes para CD95 e Bim mostraram que essas duas vias atuam de forma complementar e sinérgica, tanto para conter o aparecimento de síndromes auto-imunes, como na manutenção da homeostasia do sistema após uma resposta imune [63]. Hoje, o que é mais aceito na literatura sobre a participação de CD95 e Bim na contração de populações de linfócitos T expandidas, leva em consideração a forma e a duração da apresentação dos antígenos patogênicos. Em uma infecção aguda, por exemplo, onde o patógeno é rapidamente eliminado e a apresentação de antígenos pelas APCs e a concentração de estímulos ativadores fica rapidamente limitada e nesse caso, a via preferencial de morte é a via mediada por Bim. Porém, frente a uma infecção crônica onde há persistência do antígeno, os linfócitos T que forem recorrentemente ativados, começarão a expressar CD95L, que matará esses linfócitos por AICD. Neste caso, a expressão de CD95L por essas células pode matar também as APCs, limitando a apresentação de antígenos, diminuindo os fatores de sobrevivência e levando a morte dos linfócitos T pela via dependente de Bim [64].

Sendo assim, o presente projeto tem como principal objetivo estudar os mecanismos que controlam a sobrevivência dos linfócitos T dentre eles a AICD, bem como verificar a influência direta dos ligantes de TLRs nesse ponto de controle do sistema imune. Para tanto, utilizamos como modelo hibridomas de linfócitos T estimulados com anticorpos anti-CD3 (AICD), na presença dos diferentes agonistas de TLR.

2 CONCLUSÕES

- Os hibridomas de linfócitos T CD4⁺ A1.1, BY155.6 e DO11.10 expressam receptores do tipo Toll. Em particular as células DO11.10 expressam TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR9 e TLR11;
- O imiquimod, um agonista de TLR7, possui a capacidade de inibir a morte de hibridomas de linfócitos T DO11.10 induzida por anticorpos anti-CD3 (AICD);
- Esse mesmo agonista tem ação anti-proliferativa e tóxica em linfócitos T DO11.10 quando permanece na cultura celular por tempo maior que 16 horas. Porém, o sinal desse agonista fornecido às células nas oito primeiras horas de estímulo não induz esse efeito;
- O sinal do imiquimod dado às células nas oito primeiras horas de cultura é suficiente para garantir a proteção das células frente à AICD, mas insuficiente para inibir o sinal do anti-CD3 quando esse é dado constantemente às células;
- E por fim, o mecanismo pelo qual o imiquimod protege às células da AICD é mediado pela redução da transcrição do CD95L, que reflete na redução do seu nível protéico e parece ser independente da ativação de NF- κ B.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- [1] Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*. 1996 Sep 20;86(6):973-83.
- [2] Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. 1997 Jul 24;388(6640):394-7.
- [3] Werts C, Girardin SE, Philpott DJ. TIR, CARD and PYRIN: three domains for an antimicrobial triad. *Cell Death Differ*. 2006 May;13(5):798-815.
- [4] Takeda K, Akira S. Toll receptors and pathogen resistance. *Cell Microbiol*. 2003 Mar;5(3):143-53.
- [5] Creagh EM, O'Neill LA. TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity. *Trends Immunol*. 2006 Aug;27(8):352-7.
- [6] Krieg AM. The toll of too much TLR7. *Immunity*. 2007 Nov;27(5):695-7.
- [7] Liberati NT, Fitzgerald KA, Kim DH, Feinbaum R, Golenbock DT, Ausubel FM. Requirement for a conserved Toll/interleukin-1 resistance domain protein in the *Caenorhabditis elegans* immune response. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004 Apr 27;101(17):6593-8.
- [8] Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Sem Immunol*. 2007 Feb;19(1):24-32.
- [9] O'Neill LA, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev*. 2007 May;7(5):353-64.
- [10] Honda K, Yanai H, Negishi H, Asagiri M, Sato M, Mizutani T, et al. IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent *immune* responses. *Nature*. 2005 Apr 7;434(7034):772-7.
- [11] Kawai T, Sato S, Ishii KJ, Coban C, He mMi H, Yamamoto M, et al. Interferon-alpha induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6. *Nat Immunol*. 2004 Oct;5(10):1061-8.
- [12] Negishi H, Fujita Y, Yanai H, Sakaguchi S, Ouyang X, Shinohara M, et al. Evidence for licensing of IFN-gamma-induced IFN regulatory factor 1 transcription factor by MyD88 in Toll-like receptor-dependent gene induction program. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006 Oct 10;103(41):15136-41.

* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

- [13] Schmitz F, Heit A, Guggemoos S, Krug A, Mages J, Schiemann M, et al. Interferon-regulatory-factor 1 controls Toll-like receptor 9-mediated IFN-beta production in myeloid dendritic cells. *Eur J Immunol*. 2007 Feb;37(2):315-27.
- [14] Schoenemeyer A, Barnes BJ, Mancl ME, Latz E, Goutagny N, Pitha PM, et al. The interferon regulatory factor, IRF5, is a central mediator of toll-like receptor 7 signaling. *J Biol Chem*. 2005 Apr 29;280(17):17005-12.
- [15] Meyer-Bahlburg A, Rawlings DJ. B cell autonomous TLR signaling and autoimmunity. *Autoimm Rev*. 2008 Feb;7(4):313-6.
- [16] Suttmüller RP, Morgan ME, Netea MG, Grauer O, Adema GJ. Toll-like receptors on regulatory T cells: expanding immune regulation. *Trends Immunol*. 2006 Aug;27(8):387-93.
- [17] Caramalho I, Lopes-Carvalho T, Ostler D, Zelenay S, Haury M, Demengeot J. Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide. *J Exp Med*. 2003 Feb 17;197(4):403-11.
- [18] Mansson A, Adner M, Cardell LO. Toll-like receptors in cellular subsets of human tonsil T cells: altered expression during recurrent tonsillitis. *Respir Res*. 2006;7:36.
- [19] Gelman AE, Zhang J, Choi Y, Turka LA. Toll-like receptor ligands directly promote activated CD4⁺ T cell survival. *J Immunol*. 2004 May 15;172(10):6065-73.
- [20] Sobek V, Birkner N, Falk I, Wurch A, Kirschning CJ, Wagner H, et al. Direct Toll-like receptor 2 mediated co-stimulation of T cells in the mouse system as a basis for chronic inflammatory joint disease. *Arthritis Res Ther*. 2004;6(5):R433-46.
- [21] Komai-Koma M, Jones L, Ogg GS, Xu D, Liew FY. TLR2 is expressed on activated T cells as a costimulatory receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Mar 2;101(9):3029-34.
- [22] Liu H, Komai-Koma M, Xu D, Liew FY. Toll-like receptor 2 signaling modulates the functions of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 May 2;103(18):7048-53.
- [23] Cottalorda A, Vershelde C, Marcais A, Tomkowiak M, Musette P, Uematsu S, et al. TLR2 engagement on CD8 T cells lowers the threshold for optimal antigen-induced T cell activation. *Eur J Immunol*. 2006 Jul;36(7):1684-93.
- [24] Kabelitz D. Expression and function of Toll-like receptors in T lymphocytes. *Curr Opin Immunol*. 2007 Feb;19(1):39-45.
- [25] Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Semin Immunol*. 2007 Jan 31.
- [26] Caron G, Duluc D, Fremaux I, Jeannin P, David C, Gascan H, et al. Direct stimulation of human T cells via TLR5 and TLR7/8: flagellin and R-848 up-regulate proliferation and IFN-gamma production by memory CD4⁺ T cells. *J Immunol*. 2005 Aug 1;175(3):1551-7.

- [27] Babu S, Blauvelt CP, Kumaraswami V, Nutman TB. Cutting edge: diminished T cell TLR expression and function modulates the immune response in human filarial infection. *J Immunol*. 2006 Apr 1;176(7):3885-9.
- [28] Imanishi T, Hara H, Suzuki S, Suzuki N, Akira S, Saito T. Cutting edge: TLR2 directly triggers Th1 effector functions. *J Immunol*. 2007 Jun 1;178(11):6715-9.
- [29] Davila E, Velez MG, Heppelmann CJ, Celis E. Creating space: an antigen-independent, CpG-induced peripheral expansion of naive and memory T lymphocytes in a full T-cell compartment. *Blood*. 2002 Oct 1;100(7):2537-45.
- [30] Brunner T, Mogil RJ, LaFace D, Yoo NJ, Mahboubi A, Echeverri F, et al. Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas. *Nature*. 1995 Feb 2;373(6513):441-4.
- [31] Ashwell JD, Cunningham RE, Noguchi PD, Hernandez D. Cell growth cycle block of T cell hybridomas upon activation with antigen. *J Exp Med*. 1987 Jan 1;165(1):173-94.
- [32] Russell JH, White CL, Loh DY, Meleedy-Rey P. Receptor-stimulated death pathway is opened by antigen in mature T cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991 Mar 15;88(6):2151-5.
- [33] Itoh N, Yonehara S, Ishii A, Yonehara M, Mizushima S, Sameshima M, et al. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell*. 1991 Jul 26;66(2):233-43.
- [34] Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell*. 1993 Dec 17;75(6):1169-78.
- [35] Pinkoski MJ, Green DR. Fas ligand, death gene. *Cell Death Differ*. 1999 Dec;6(12):1174-81.
- [36] Bossi G, Griffiths GM. Degranulation plays an essential part in regulating cell surface expression of Fas ligand in T cells and natural killer cells. *Nat Med*. 1999 Jan;5(1):90-6.
- [37] Zhang J, Xu X, Liu Y. Activation-induced cell death in T cells and autoimmunity. *Cell Mol Immunol*. 2004 Jun;1(3):186-92.
- [38] Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science*. 1995 Mar 10;267(5203):1449-56.
- [39] Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science*. 1998 Aug 28;281(5381):1305-8.
- [40] Wolf BB, Green DR. Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. *J Biol Chem*. 1999 Jul 16;274(29):20049-52.
- [41] Ashkenazi A, Dixit VM. Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr Opin Cell Biol*. 1999 Apr;11(2):255-60.

- [42] Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell*. 1997 Feb 7;88(3):355-65.
- [43] Amarante-Mendes GP, Green DR. The regulation of apoptotic cell death. *Braz J Med Biol Res = Rev Bras Pesq Med Biol*. 1999 Sep;32(9):1053-61.
- [44] Hofstetter W, Wetterwald A, Cecchini MG, Mueller C, Felix R. Detection of transcripts and binding sites for colony-stimulating factor-1 during bone development. *Bone*. 1995 Aug;17(2):145-51.
- [45] Latinis KM, Norian LA, Eliason SL, Koretzky GA. Two NFAT transcription factor binding sites participate in the regulation of CD95 (Fas) ligand expression in activated human T cells. *J Biol Chem*. 1997 Dec 12;272(50):31427-34.
- [46] Holtz-Heppelmann CJ, Algeciras A, Badley AD, Paya CV. Transcriptional regulation of the human FasL promoter-enhancer region. *J Biol Chem*. 1998 Feb 20;273(8):4416-23.
- [47] Li-Weber M, Laur O, Hekele A, Coy J, Walczak H, Kra mMer PH. A regulatory element in the CD95 (APO-1/Fas) ligand promoter is essential for responsiveness to TCR-mediated activation. *Eur J Immunol*. 1998 Aug;28(8):2373-83.
- [48] Green DR, Droin N, Pinkoski M. Activation-induced cell death in T cells. *Immunol Rev*. 2003 Jun;193:70-81.
- [49] Baumann S, Hess J, Eichhorst ST, Krueger A, Angel P, Kra mMer PH, et al. An unexpected role for FosB in activation-induced cell death of T cells. *Oncogene*. 2003 Mar 6;22(9):1333-9.
- [50] Mittelstadt PR, Ashwell JD. Cyclosporin A-sensitive transcription factor Egr-3 regulates Fas ligand expression. *Mol Cell Biol*. 1998 Jul;18(7):3744-51.
- [51] Mittelstadt PR, Ashwell JD. Role of Egr-2 in up-regulation of Fas ligand in normal T cells and aberrant double-negative lpr and gld T cells. *J Biol Chem*. 1999 Jan 29;274(5):3222-7.
- [52] Brunner T, Kasibhatla S, Pinkoski MJ, Frutschi C, Yoo NJ, Echeverri F, et al. Expression of Fas ligand in activated T cells is regulated by c-Myc. *J Biol Chem*. 2000 Mar 31;275(13):9767-72.
- [53] Chow WA, Fang JJ, Yee JK. The IFN regulatory factor family participates in regulation of Fas ligand gene expression in T cells. *J Immunol*. 2000 Apr 1;164(7):3512-8.
- [54] D'Adamio F, Zollo O, Moraca R, Ayroldi E, Bruscoli S, Bartoli A, et al. A new dexamethasone-induced gene of the leucine zipper family protects T lymphocytes from TCR/CD3-activated cell death. *Immunity*. 1997 Dec;7(6):803-12.
- [55] Irmeler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, et al. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature*. 1997 Jul 10;388(6638):190-5.

- [56] Andrews BS, Eisenberg RA, Theofilopoulos AN, Izui S, Wilson CB, McConahey PJ, et al. Spontaneous murine lupus-like syndromes. Clinical and immunopathological manifestations in several strains. *J Exp Med*. 1978 Nov 1;148(5):1198-215.
- [57] Roths JB, Murphy ED, Eicher EM. A new mutation, gld, that produces lymphoproliferation and autoimmunity in C3H/HeJ mice. *J Exp Med*. 1984 Jan 1;159(1):1-20.
- [58] Watson ML, D'Eustachio P, Mock BA, Steinberg AD, Morse HC, 3rd, Oakey RJ, et al. A linkage map of mouse chromosome 1 using an interspecific cross segregating for the gld autoimmunity mutation. *Mamm Genome*. 1992;2(3):158-71.
- [59] Nagata S, Suda T. Fas and Fas ligand: lpr and gld mutations. *Immunol Today*. 1995 Jan;16(1):39-43.
- [60] Poppema S, Maggio E, van den Berg A. Development of lymphoma in Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome (ALPS) and its relationship to Fas gene mutations. *Leuk Lymphoma*. 2004 Mar;45(3):423-31.
- [61] Rieux-Laucat F, Le Deist F, Hivroz C, Roberts IA, Debatin KM, Fischer A, et al. Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science (New York, NY)*. 1995 Jun 2;268(5215):1347-9.
- [62] Hildeman DA, Zhu Y, Mitchell TC, Kappler J, Marrack P. Molecular mechanisms of activated T cell death in vivo. *Curr Opin Immunol*. 2002 Jun;14(3):354-9.
- [63] Hutcheson J, Scatizzi JC, Siddiqui AM, Haines GK, 3rd, Wu T, Li QZ, et al. Combined deficiency of proapoptotic regulators Bim and Fas results in the early onset of systemic autoimmunity. *Immunity*. 2008 Feb;28(2):206-17.
- [64] Green DR. Fas Bim boom!. *Immunity*. 2008 Feb;28(2):141-3.
- [65] Haskins K, Kubo R, White J, Pigeon M, Kappler J, Marrack P. The major histocompatibility complex-restricted antigen receptor on T cells. I. Isolation with a monoclonal antibody. *J Exp Med*. 1983 Apr 1;157(4):1149-69.
- [66] Kappler JW, Skidmore B, White J, Marrack P. Antigen-inducible, H-2-restricted, interleukin-2-producing T cell hybridomas. Lack of independent antigen and H-2 recognition. *J Exp Med*. 1981 May 1;153(5):1198-214.
- [67] Leo O, Foo M, Sachs DH, Samelson LE, Bluestone JA. Identification of a monoclonal antibody specific for a murine T3 polypeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 Mar;84(5):1374-8.
- [68] Martin SJ, Finucane DM, Amarante-Mendes GP, O'Brien GA, Green DR. Phosphatidylserine externalization during CD95-induced apoptosis of cells and cytoplasts requires ICE/CED-3 protease activity. *J Biol Chem*. 1996 Nov 15;271(46):28753-6.

- [69] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8.
- [70] Shi YF, Sahai BM, Green DR. Cyclosporin A inhibits activation-induced cell death in T-cell hybridomas and thymocytes. *Nature*. 1989 Jun 22;339(6226):625-6.
- [71] Weinlich R, Bortoluci KR, Chehab CF, Serezani CH, Ulbrich AG, Peters-Golden M, et al. TLR4/MYD88-dependent, LPS-induced synthesis of PGE2 by macrophages or dendritic cells prevents anti-CD3-mediated CD95L upregulation in T cells. *Cell Death Differ*. 2008 Dec;15(12):1901-9.
- [72] Wesch D, Beetz S, Oberg HH, Marget M, Krenzel K, Kabelitz D. Direct costimulatory effect of TLR3 ligand poly(I:C) on human gamma delta T lymphocytes. *J Immunol*. 2006 Feb 1;176(3):1348-54.
- [73] Crellin NK, Garcia RV, Hadisfar O, Allan SE, Steiner TS, Levings MK. Human CD4+ T cells express TLR5 and its ligand flagellin enhances the suppressive capacity and expression of FOXP3 in CD4+CD25+ T regulatory cells. *J Immunol*. 2005 Dec 15;175(12):8051-9.
- [74] Moynagh PN. TLR signalling and activation of IRFs: revisiting old friends from the NF-kappaB pathway. *Trends Immunol*. 2005 Sep;26(9):469-76.
- [75] Pasare C, Medzhitov R. Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Adv Exp Med Biol*. 2005;560:11-8.
- [76] Doyle SL, O'Neill LA. Toll-like receptors: from the discovery of NFkappaB to new insights into transcriptional regulations in innate immunity. *Biochem Pharmacol*. 2006 Oct 30;72(9):1102-13.
- [77] Eldering E, Spek CA, Aberson HL, Grummels A, Derks IA, de Vos AF, et al. Expression profiling via novel multiplex assay allows rapid assessment of gene regulation in defined signalling pathways. *Nucleic Acids Res*. 2003 Dec 1;31(23):e153.
- [78] He mMi H, Kaisho T, Takeuchi O, Sato S, Sanjo H, Hoshino K, et al. Small anti-viral compounds activate *immune* cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol*. 2002 Feb;3(2):196-200.
- [79] Harrison CJ, Jenks L, Voychekovski T, Bernstein DI. Modification of Immunological responses and clinical disease during topical R-837 treatment of genital HSV-2 infection. *Antiviral Res*. 1988 Dec 1;10(4-5):209-23.
- [80] Jurk M, Heil F, Vollmer J, Schetter C, Krieg AM, Wagner H, et al. Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. *Nat Immunol*. 2002 Jun;3(6):499.
- [81] Kanneganti TD, Ozoren N, Body-Malapel M, Amer A, Park JH, Franchi L, et al. Bacterial RNA and small antiviral compounds activate caspase-1 through cryopyrin/Nalp3. *Nature*. 2006 Mar 9;440(7081):233-6.

- [82] Inglefield JR, Dumitru CD, Alkan SS, Gibson SJ, Lipson KE, Tomai MA, et al. TLR7 agonist 852A inhibition of tumor cell proliferation is dependent on plasmacytoid dendritic cells and type I IFN. *J Interferon Cytokine Res.* 2008 Apr;28(4):253-63.
- [83] Hasan UA, Caux C, Perrot I, Doffin AC, Menetrier-Caux C, Trinchieri G, et al. Cell proliferation and survival induced by Toll-like receptors is antagonized by type I IFNs. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007 May 8;104(19):8047-52.
- [84] Bissonnette RP, Echeverri F, Mahboubi A, Green DR. Apoptotic cell death induced by c-myc is inhibited by bcl-2. *Nature.* 1992 Oct 8;359(6395):552-4.
- [85] Fotedar R, Flatt J, Gupta S, Margolis RL, Fitzgerald P, Messier H, et al. Activation-induced T-cell death is cell cycle dependent and regulated by cyclin B. *Mol Cell Biol.* 1995 Feb;15(2):932-42.
- [86] Torgler R, Jakob S, Ontsouka E, Nachbur U, Mueller C, Green DR, et al. Regulation of activation-induced Fas (CD95/Apo-1) ligand expression in T cells by the cyclin B1/Cdk1 complex. *J Biol Chem.* 2004 Sep 3;279(36):37334-42.
- [87] Jego G, Bataille R, Geffroy-Luseau A, Descamps G, Pellat-Deceunynck C. Pathogen-associated molecular patterns are growth and survival factors for human myeloma cells through Toll-like receptors. *Leukemia.* 2006 Jun;20(6):1130-7.
- [88] Salaun B, Coste I, Risoan MC, Lebecque SJ, Renno T. TLR3 can directly trigger apoptosis in human cancer cells. *J Immunol.* 2006 Apr 15;176(8):4894-901.
- [89] Zeng H, Wu H, Sloane V, Jones R, Yu Y, Lin P, et al. Flagellin/TLR5 responses in epithelia reveal intertwined activation of inflammatory and apoptotic pathways. *Am J Physiol.* 2006 Jan;290(1):G96-G108.
- [90] Aliprantis AO, Yang RB, Weiss DS, Godowski P, Zychlinsky A. The apoptotic signaling pathway activated by Toll-like receptor-2. *EMBO J.* 2000 Jul 3;19(13):3325-36.
- [91] Han KJ, Su X, Xu LG, Bin LH, Zhang J, Shu HB. Mechanisms of the TRIF-induced interferon-stimulated response element and NF-kappaB activation and apoptosis pathways. *J Biol Chem.* 2004 Apr 9;279(15):15652-61.
- [92] Kanzler H, Barrat FJ, Hessel EM, Coffman RL. Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists. *Nat Med.* 2007 May;13(5):552-9.
- [93] Schon M, Bong AB, Drewniok C, Herz J, Geilen CC, Reifenberger J, et al. Tumor-selective induction of apoptosis and the small-molecule *immune* response modifier imiquimod. *J Natl Cancer Inst.* 2003 Aug 6;95(15):1138-49.
- [94] Badley AD, Pilon AA, Landay A, Lynch DH. Mechanisms of HIV-associated lymphocyte apoptosis. *Blood.* 2000 Nov 1;96(9):2951-64.
- [95] Alderson MR, Armitage RJ, Maraskovsky E, Tough TW, Roux E, Schooley K, et al. Fas transduces activation signals in normal human T lymphocytes. *J Exp Med.* 1993 Dec 1;178(6):2231-5.

- [96] Gehri R, Hahn S, Rothen M, Steuerwald M, Nuesch R, Erb P. The Fas receptor in HIV infection: expression on peripheral blood lymphocytes and role in the depletion of T cells. *AIDS (London, England)*. 1996 Jan;10(1):9-16.
- [97] Gougeon ML, Lecoœur H, Dulioust A, Enouf MG, Crouvoiser M, Goujard C, et al. Programmed cell death in peripheral lymphocytes from HIV-infected persons: increased susceptibility to apoptosis of CD4 and CD8 T cells correlates with lymphocyte activation and with disease progression. *J Immunol*. 1996 May 1;156(9):3509-20.
- [98] Banda NK, Bernier J, Kurahara DK, Kurre R, Haigwood N, Sekaly RP, et al. Crosslinking CD4 by human immunodeficiency virus gp120 primes T cells for activation-induced apoptosis. *J Exp Med*. 1992 Oct 1;176(4):1099-106.
- [99] Aceituno E, Castanon S, Jimenez C, Subira D, De Gorgolas M, Fernandez-Guerrero M, et al. Circulating *immune* complexes from HIV-1+ patients induces apoptosis on normal lymphocytes. *Immunology*. 1997 Nov;92(3):317-20.
- [100] Yang Y, Bailey J, Vacchio MS, Yarchoan R, Ashwell JD. Retinoic acid inhibition of ex vivo human immunodeficiency virus-associated apoptosis of peripheral blood cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995 Mar 28;92(7):3051-5.
- [101] Yang Y, Mercep M, Ware CF, Ashwell JD. Fas and activation-induced Fas ligand mediate apoptosis of T cell hybridomas: inhibition of Fas ligand expression by retinoic acid and glucocorticoids. *J Exp Med*. 1995 May 1;181(5):1673-82.
- [102] Wille-Reece U, Flynn BJ, Lore K, Koup RA, Kedl RM, Mattapallil JJ, et al. HIV Gag protein conjugated to a Toll-like receptor 7/8 agonist improves the magnitude and quality of Th1 and CD8+ T cell responses in nonhuman primates. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005 Oct 18;102(42):15190-4.
- [103] Wille-Reece U, Flynn BJ, Lore K, Koup RA, Miles AP, Saul A, et al. Toll-like receptor agonists influence the magnitude and quality of memory T cell responses after prime-boost immunization in nonhuman primates. *J Exp Med*. 2006 May 15;203(5):1249-58.