

Tiago Clemente Machado

**Novo papel da galectina-1 como
molécula efetora de células
citotóxicas**

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

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

Versão original

RESUMO

MACHADO, T. C. **Novo papel da galectina-1 como molécula efetora de células citotóxicas.** 2014. 122 f. Tese (Doutorado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

A exocitose de grânulos secretórios é o principal mecanismo efetor de células T CD8⁺ (também conhecidas como linfócitos T citotóxicos - CTLs) e constitui uma importante arma contra o câncer e as células infectadas por patógenos. Apesar da intensa pesquisa sobre o desenvolvimento, ativação e função efetora destas células, o entendimento sobre mecanismos moleculares envolvidos na degranulação direcionada à célula alvo, morte desta e sobrevivência da célula efetora durante o ataque citotóxico continua limitado. Em particular, pouco se sabe sobre a composição/estrutura dos grânulos líticos das CTLs. A literatura mostra que perforina e certas granzimas são fundamentais para a indução da morte nas células alvo *in vitro* e que *in vivo* ainda há controversa quanto as principais indutoras desse processo. Resultados prévios do nosso grupo identificaram, através de uma análise proteômica, algumas dezenas de novas proteínas desses grânulos, além de alguns constituintes já conhecidos. Dentre elas foi identificada a galectina-1, uma lectina que reconhece beta-galactosídeos e participa de vários processos biológicos, incluindo a resposta imune adaptativa. Galectinas podem interagir com glicanas nas superfícies celulares das células do sistema imune e, dessa forma, promover a modulação da produção de citocinas e mediadores, a adesão celular, apoptose, quimiotaxia e endocitose. A literatura atual relata a ação de Gal-1 por via exógena apenas através de sua secreção por uma via não convencional que depende da manutenção da sua região de ligação a carboidratos. Dados iniciais do nosso grupo apontam um novo cenário para esta proteína, no contexto da resposta efetora das células citotóxicas, no qual Gal-1 está presente em grânulos citotóxicos. Através das técnicas de microscopia eletrônica de transmissão e microscopia confocal de varredura a laser e dos ensaios de citotoxicidade *in vitro* e *in vivo*, nossos resultados sugerem que a Gal-1 participa do papel citotóxico das CTLs modulando a via dos receptores de morte FAS-FASL. Nós também mostramos que Gal-1 interfere com o tempo de contato entre APCs e linfócitos TCD8⁺, com a ativação dessas células e com o controle da proliferação dos linfócitos. Em conjunto, nossos resultados apontam um novo cenário para esta proteína, no qual Gal-1 está presente nos grânulos citotóxicos das CTLs e está relacionada a resposta efetora de células citotóxicas.

Palavras-chave: Células citotóxicas. Galectina-1. Citotoxicidade Celular. Lisossomos secretórios. Linfócito TCD8⁺. Célula NK. FAS-FASL. Proliferação celular.

ABSTRACT

MACHADO, T. C. **New role for galectin-1 as effector molecule of cytotoxic cells.** 2014. 122 p. Ph. D thesis (Immunology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Exocytosis of secretory granules is the main effector mechanism of CD8⁺ T cells (also known as cytotoxic T lymphocytes - CTLs) and is an important weapon against cancer and pathogen-infected cells. Despite intense research on the development, activation and effector function of these cells, the understanding of the molecular mechanisms involved in the cytotoxic cell degranulation, death of target cells and survival of effector cells from the cytotoxic attack, remains limited. In particular, little is known about CTL's lytic granules composition and structure. Literature shows that perforin and certain granzymes are essential to induce death in target cells *in vitro* and *in vivo* but the major inducers of this process are still controversial. Previous results from our group identified, by proteomic analysis, most of the known components as well as a few dozens of new proteins associated with these granules. Among them, we identified galectin-1, a lectin that recognizes beta-galactosides and participates in many biological processes, including the adaptive immune response. Galectins can interact with cell surfaces glucans of the immune system, thereby modulating cytokine production, cell adhesion, apoptosis, chemotaxis and endocytosis. Literature reports the extracellular action of Gal-1 by means of its secretion via an unconventional pathway that depends on their carbohydrate binding region. Initial data from our group suggested a new scenario for this protein in the context of cytotoxic cell response, since Gal-1 was found inside cytotoxic granules. Here, we show by transmission electron and confocal laser scanning microscopy and *in vitro* and *in vivo* cytotoxicity assays that Gal-1 has a role on CTL killing probably mediating the FAS-FASL pathway. We also show that Gal-1 regulates the time of contact between APCs and TCD8⁺ lymphocytes, the activation of APCs and the proliferation of CD8 T cells. Taken together, our findings suggest a new scenario, in which Gal-1 is present in CTL granules and participates in cytotoxic effector response.

Keywords: Cytotoxic cells. Galectin-1. Cellular cytotoxicity. Secretory lysosomes. CD8⁺ T lymphocytes. NK cell. FAS-FASL. Cell proliferation.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Células citotóxicas

O sistema imunológico é constituído por moléculas, células, tecidos e órgãos que trabalham em conjunto, em uma rede dinâmica de interações, para manter a homeostase do organismo. Linfócitos T citotóxicos (CTLs; linfócitos TCD8⁺) e células natural killer (NK) são células do sistema imune adaptativo e inato, respectivamente, que apresentam papel crucial na resposta imune antitumoral, antiviral e contra outros patógenos intracelulares, em um processo conhecido como vigilância imunológica (1).

Células NK são as primeiras células na defesa do hospedeiro contra infecções virais e outros patógenos. Estas não requerem pré-ativação por células apresentadoras de antígeno (APC) e, dessa forma, são importantes nos estágios iniciais da infecção, antes que a resposta por células T esteja formada. Seus grânulos citotóxicos são formados durante o desenvolvimento, o que torna as células NK equipadas para responder rapidamente a ameaça de tumorigenicidade e infecção (2). Além do ataque citotóxico, células NK podem rapidamente produzir citocinas e quimiocinas, as quais têm efeito imunoestimulatório e quimiotático (3).

Células NK expressam uma série de receptores de ativação e inibição, os quais agem permitindo a elas discriminar entre células alvo e não-alvo (4). O repertório de receptores das células NK é complementado por outros sensores inatos, tais como receptores *scavenger*, receptores do tipo Toll (*TOLL-like receptors*, TLRs) ou receptores do tipo NOD (*nucleotide-binding oligomerization domain*)-like receptors, NLR) (5). Dessa forma, as estratégias de reconhecimento das células NK ampliam a detecção de situações patológicas nas quais sinais de perigo de micróbios patogênicos estão ausentes *in vivo*, tais como no caso de tumores com baixa imunogenicidade.

Para formar uma interface entre uma célula NK e a célula alvo susceptível, há a interação entre receptores de superfície celular, os quais iniciam a formação de uma estrutura chamada de sinapse imunológica de célula NK (NKIS; *NK immunological synapse*). Um número de moléculas tem sido encontradas acumuladas nas NKIS ativadas (6) e, embora a maioria seja estritamente intracelular, elas incluem CD2 (7) e CD11a (8) na superfície das células (9).

Consistente com seu papel na vigilância imune, células NK são largamente distribuídas no corpo. Não está claro, no entanto, se esta ampla distribuição é devido a sua recirculação, devido a existência de subconjuntos de NK com diferentes capacidades de *homing*, ou devido ao seu desenvolvimento em múltiplos locais (5). Entretanto, células NK são preferencialmente encontradas dentro dos vasos ou sinusóides do sangue ou linfa (5).

Células NK compartilham muitos caminhos de transdução de sinais e mecanismos citolíticos com CTLs. A interação de células NK com células alvo, como também em CTLs, é acompanhada pelo remodelamento do citoesqueleto das células NK, marcadas pela polarização de talina (8), actina (8), balsas lipídicas (*membrane rafts*) (10), do centro organizador de microtúbulo (MTOC) (11) e de lisossomos para o ponto de contato intercelular. Além disto, a distribuição espacial de moléculas dentro da sinapse de células NK ativadas, comparada à sinapse de CTL (com LFA-1 (*lymphocyte function-associated antigen-1*) e talina localizados no anel periférico), é ao redor de um núcleo central de moléculas de sinalização tais como PKC- θ , PLC γ 1, Ick e SLP-76 (8). Uma diferença importante entre CTLs e células NK é que a função efetora das NKs é negativamente regulada pela presença de proteínas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I nas células alvo. Receptores KIRs (*Killer cell immunoglobulin-like receptors*) nas células NK se ligam a estas moléculas e transduzem um sinal negativo que desativa a maquinaria lítica destas células (12).

Em células NK, a polimerização de actina e microtúbulos são exigidas para função citotóxica (13) e filamentos de actina (F-actina) (14), assim como MTOC (15), acumulam-se nas NKIS ativadas. Importantes moléculas associadas a actina são também encontradas no centro de ativação supramolecular (SMAC), incluindo a proteína da síndrome de Wiskott-Aldrich (WASp) e talina (8, 16). A função de WASp em células NK, em particular, é um importante fator contribuidor para polarização de F-actina, e ambas as funções de polimerização de actina e função de WASp são solicitadas para efetiva localização dos grânulos citotóxicos em NKIS ativada (16).

Há uma variedade de receptores de adesão com potencial participação na adesão célula alvo/célula NK, incluindo as β 2-integrinas, CD11a e CD11b, assim como os membros da superfamília das Igs e CD2, todos acumulados na pSMAC das NKIS ativadas. Este agrupamento exige ambos polimerização de actina e função de WASp. Dessa forma, o papel destes receptores na sinalização celular e formação de

NKIS deve ser precedida por eventos de sinalização promovendo a ativação de WASp e rearranjo de citoesqueleto (9).

Diferente das células NKs que fomentam seu papel como constituintes das respostas imunes inata, os linfócitos TCD8⁺ são constituinte da resposta mais específica no sistema imunológico, que não se encontra montada no primeiro contato com o agente patogênico estranho ao organismo, e participam também em infecções por patógenos intracelulares e tumores. No entanto, essas células necessitam ser inicialmente ativadas nos órgãos linfóides periféricos pelo reconhecimento dos peptídeos de antígenos estranhos, presentes na superfície de uma APC, usualmente uma célula dendrítica. Este reconhecimento depende da presença, em uma APC, de MHC classe I, nos quais se ligam peptídeos antigênicos intracelulares que são então carregados para a superfície celular e apresentados junto a moléculas estimulatórias, para o CTL.

A população de células T naíve (células T ainda ativadas) expressa uma vasta gama de TCR com especificidade única e afinidade por um complexo formado entre o antígeno (peptídeo – p) e o complexo principal de histocompatibilidade (pMHC). Essas células constantemente recirculam entre sangue, linfa e baço e examinam APCs nos tecidos linfóides secundários a procura do raro complexo pMHC para o qual tem afinidade (17). Devido à diversidade de repertório de TCR, uma em um milhão de células expressam um TCR com uma afinidade para dado antígeno capaz de transmitir um estímulo de ativação (18, 19).

Estudos recentes têm mostrado que a ativação das células T ocorre em três fases distintas. A fase inicial dura cerca de 8 horas e é caracterizada por curtas interações entre as DCs pulsadas com antígeno e as células T. A dose total de antígeno determina a duração desta fase, o que sugere a existência de mecanismos integrados que estabelecem um limite para a ativação com base na dose de antígeno encontrado por uma célula T. Esta fase é imunologicamente produtiva porque as células T começam a aumentar a expressão de marcadores de ativação. Células T que encontram uma dose de antígeno abaixo do limiar não fazem contatos prolongados e continuam a migrar até saírem do linfonodo sem serem ativadas (20).

No início da segunda fase, o tempo de interação célula T-DC torna-se muito maior, e pode ser de aproximadamente 12 horas, sendo acompanhado por aumento adicional na expressão de marcadores de ativação e início da produção de IL-2 e IFN- γ . Finalmente, a fase três, que começa cerca de 24 horas após a entrada das

células T no linfonodo é caracterizada por curtas interações entre DC e células T e é induzida a proliferação das células (21-23).

Uma vez ativadas, os linfócitos TCD8⁺ podem reconhecer o mesmo complexo peptídeo-MHC classe I na superfície de uma célula infectada por vírus, por exemplo. A literatura relata que não há necessidade de abundância de complexos peptídeo/MHC para que a CTL induza apoptose de seu alvo. Estudos *in vitro* com células T efetoras mostraram que o simples contato TCR-MHC desencadeia o influxo de cálcio, e que cerca de 10 complexos MHC são necessários para a formação da sinapse imunológica (24, 25). Além disso, a presença de três complexo MHC para o qual os linfócitos T citotóxicos são específicos já é suficientes para induzir a lise das células alvo (26). No encontro de antígenos específicos pela primeira vez, células T são induzidas a expansão clonal em comando para combater a infecção, sendo que esta demora de 5 a 7 dias. Este primeiro encontro também leva a produção de células T de memória as quais, quando o antígeno for encontrado pela segunda vez, garantirão uma resposta mais rápida e efetiva.

CTLs podem matar seus alvos por duas vias. A primeira é através da expressão de ligantes da superfamília do Fator de Necrose Tumoral (TNF, *tumor necrosis factor*), tais como o próprio TNF- α , TRAIL e FASL, desde que células alvos possuam receptores correspondentes em sua superfície. A segunda via de morte celular envolve a transferência de lisossomos secretórios, também chamados grânulos citotóxicos, dentro da sinapse imunológica estabelecida entre a célula efetora e a célula alvo, e prevalece como o maior mecanismo de morte mediada por CTL e por células NK (27). A morte da célula alvo é decorrente da indução de apoptose pela ação de proteínas pertencentes a uma família especial de proteases e da presença de uma proteína formadora de poros.

Os linfócitos TCD8⁺ se tornam competentes matadores (células efetoras) somente após ativação pelas APCs (12), que estimulam o receptor de célula T (TCR) induzindo a expressão gênica (expressam RNAm, por exemplo, para as proteínas perforina e granzima), formação de lisossomos secretórios - o aparecimento de lisossomos secretórios maduros é correlacionado com a habilidade citotóxica de uma CTL (28) - e proliferação celular (CTL antígeno-específico passa por uma série de duplicações celulares) (28). A literatura mostra que CTLs possuem um período de ausência de responsividade induzida por ativação (AINR; *activation-induced non-responsiveness*) nos dias 2-4 após a ligação inicial do TCR em que as

células T CD8⁺ se tornam incapazes de produzir IL-2 – citocina que atua como fator de crescimento autócrino - ou proliferar em resposta a uma ligação secundária do TCR (29, 30).

A interação entre linfócitos T citotóxicos e células alvo começa com a ligação de forma aleatória entre moléculas de adesão localizadas na superfície de ambas as células. O subsequente reconhecimento de antígenos específicos resulta na ativação de sinais bioquímicos que integram vias iniciadas pelos receptores de antígenos das células T e pelas moléculas acessórias (31). É importante destacar que a especificidade do reconhecimento depende justamente da detecção de peptídeos associados ao MHC classe I nas células alvo pelo TCR, sendo que o engajamento do TCR é necessário para que a célula efetora passe a expressar granzimas, perforina e FASL (12).

Quando CTLs encontram um alvo específico, o complexo TCR transfere uma rápida cascata de sinais ativadores através de tirosina-quinases e um rápido influxo de cálcio. Essa cascata causa uma rápida segregação dos receptores de superfície celular dentro de três compartimentos concêntricos, chamados de SMAC central (cSMAC), periférico (pSMAC) e distal (dSMAC) (32). Desta forma, sinalização e adesão celular se redistribuem na área de contato. A cSMAC é rica em proteínas de sinalização associadas ao TCR incluindo o TCR ζ , Lck e ZAP-70, assumindo o local da sinalização do TCR e é cercada pela outra área, composta pelo anel de proteínas de adesão como o LFA-1 (p-SMAC). Grânulos líticos são secretados em uma zona definida dentro da p-SMAC e próxima ao c-SMAC conhecida como domínio secretório (33). Demonstrou-se em células T que a formação da SMAC depende em parte da polimerização do citoesqueleto de actina (34, 35). Esta zona intercelular altamente organizada assemelha-se a uma sinapse neuronal razão pela qual ela tem sido chamada de “sinapse imunológica”.

Em relação à diferenciação de CTLs em células efetoras e de memória, o T-box dos fatores de transcrição Eomesodermina (Eomes) e T-bet parecem ser essenciais (36). T-bet é induzido rapidamente mediante estimulação do complexo TCR e é requerido no programa inicial de produção de citocinas (37), enquanto Eomes é induzido mais tarde durante a diferenciação e manutenção da expressão de IFN- γ . Camundongos deficientes para ambos T-bet e Eomes, em células T, têm expressão debilitada de mediadores citolíticos.

Proteínas Runx, uma família de 3 fatores de transcrição que se ligam ao DNA, controlam a diferenciação de timócitos e a diferenciação de linhagem CD4/CD8 (38, 39). Todas as três proteínas Runx são expressas em células CTL maduras (38), e CTLs deficientes em Runx3 apresentam redução de atividade citolítica (40).

1.2 Lisossomos secretórios – degranulação

CTLs e as células NK apresentam a citotoxicidade como mecanismo principal da sua função efetora no sistema imune. A principal organela dessa função é justamente o lisossomo secretório. Exocitose de lisossomos secretórios, como outros eventos de secreção regulados, envolvem vias distintas. A ligação estável ao receptor de superfície celular de um linfócito citotóxico com uma célula alvo resulta em mobilização de Ca^{2+} dentro da célula, os quais atuam como um sinal para o grânulo se mobilizar para degranulação (41). Esta mobilização ocorre ao longo dos microtúbulos em direção ao centro organizador de microtúbulos (MTOC/centrossomo) e é dirigido por uma proteína motora da família Kinesina (42). Uma vez que a sinalização tenha ocorrido, o citoesqueleto de actina e os microtúbulos polarizam rapidamente para a sinapse, uma via crucial na citotoxicidade (revisado na referência (43)). Microtúbulos que tem uma polaridade definida, se irradiam da MTOC (final negativo) para a periferia da célula (final positivo) e os grânulos migram na direção negativa para a MTOC através da ação das proteínas motoras dineína-dinactina. Os grânulos secretórios são transportados junto aos microtúbulos e agrupados ao redor do MTOC. Uma vez próximo à periferia da célula, o lisossomo utiliza-se de filamentos de actina para viajar a curta distância final para o atracamento local à membrana plasmática (42). Depois dos grânulos citotóxicos terem sido polarizados na membrana plasmática, eles são secretados dentro da sinapse imunológica em uma seqüência de eventos ordenados (44). Isto permite a liberação polarizada de seus conteúdos: perforina, granzimas e outros agentes de rompimento de membrana (45).

A fusão de lisossomos secretórios com a membrana plasmática é mediada por um conjunto de proteínas específicas (42). A fusão ocorre quando uma proteína R-SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*) na membrana da célula efetora interage fortemente com duas ou três Q-SNARE

levando à formação de um complexo trans-SNARE que cataliza a fusão das duas membranas (46). Contudo, a identidade das SNAREs associadas com os lisossomos secretórios em células NK e CTLs é desconhecida.

Muitas proteínas SNARE têm sido encontradas associadas com lisossomos secretórios em vários tipos de células, tais como a proteína 23 associada à sinaptossomo (SNAP-23), proteína 2 de membrana associada a vesículas (VAMP2) e VAMP7 em mastócitos (47-49) em neutrófilos (50). Contudo, a significância funcional destas associações não é ainda plenamente entendida.

O processo de fusão entre a vesícula e a membrana é adicionalmente regulado pela GTPases da família *Rab* (51), as quais fornecem um segundo nível de especificidade para o evento de fusão. Cada *Rab* associa-se a uma diferente membrana celular (52). Rab27a é necessária para o movimento nos microtúbulos dos grânulos do MTOC para a sinapse através da região rica em actina (12, 42). Rabs, tais como, Rab7 e/ou Rab34, podem ter um papel chave na ligação e transporte dos grânulos ao longo dos microtúbulos. Rab7 atua controlando a proteína efetora RILP (*Rab7-Interacting Lysosomal Protein*), a qual recruta o motor dineína-dinactina para Rab7 contida nos endossomos finais e lisossomos. Conseqüentemente, o motor transporta endossomos e lisossomos em direção ao final negativo dos microtúbulos (53). Rab34 parece ter um papel similar a Rab7 (54). Outra proteína que é requerida para uma adequada morte mediada por CTL é a proteína efetora *Rab geranylgeranyltransferase* (RGGT) – uma enzima que prenha certos Rabs, isto é, realiza modificação pós-traducional pela adição enzimática de motivos prenyl, os quais permitem ligação das Rabs às membranas e, desse modo, regula a associação entre elas (55). RGGT é exigida, por exemplo, para modificação lipídica de Rab27a (12).

O camundongo *gunmetal* – modelo murino da Síndrome de Hermansky-Pudlak (HPS) - tem mutações que inativam RGGT. Neles, há redução da secreção direcionada de vesículas, como das CTLs para células alvo e também secreção de grânulos de plaquetas (56) e a maioria dos lisossomos está espalhada em volta da periferia das células. A HPS é uma doença caracterizada por albinismo parcial, resultantes de defeitos na secreção de melanócitos, e distúrbios hemorrágicos resultantes da disfunção das plaquetas (57). Dessa forma, sabendo que tráfico vesicular é um processo crítico para a fisiologia normal de eucariotos e que as Rab GTPases são os maiores reguladores deste processo, defeitos nessas moléculas ou

na sua ativação estão cada vez mais implicados com doenças hereditárias e adquiridas. Já se sabe também que na Síndrome de Griscelli 2, existe um defeito na função de Rab27a que compromete a exocitose de grânulos líticos em linfócitos T citotóxicos. Essa doença apresenta como fenótipo episódios de ativação e infiltração descontrolada de linfócitos T e macrófagos para dentro de vários órgãos, incluindo o cérebro, o que causa convulsões e comprometimento neurológico com sérios riscos para a vida do paciente (58, 59).

Além da Rab27a, outra proteína identificada com papel na secreção de vesículas é a Lyst – também nomeada de proteína da Síndrome de Chediak-Higashi -, que tem papel único na regulação da fusão de membranas. Esta proteína citoplasmática é expressa em baixos níveis em todos os tipos de células e sua ausência leva a grandes anormalidades. Pacientes e camundongos com o gene defeituoso para a proteína Lyst desenvolvem a Síndrome de Chediak-Higashi, a qual apresenta uma marcada hipopigmentação e presença de lisossomos gigantes em todos os tipos de células (60).

Recentemente, uma quinase associada com a exocitose de grânulos líticos que contém granzima B foi identificada, a PKC δ . Ela se torna ativada após ligação ao TCR e está envolvida no seletivo movimento de grânulos citotóxicos para a sinapse imunológica (61, 62).

1.3 Constituintes dos grânulos

Lisossomos secretórios contêm a maquinaria – tal como as formas maduras das hidrolases ácidas lisossomais – que é requerida para sua função degradativa, e receptores – tais como Lgp96, um membro da família de proteína de membrana associada a lisossomo (LAMP) (63) e membros da família ‘heat shock 70’ (Hsc70) (64) – que são usados para reconhecimento e transferência de material (ambos citosólicos e ligados a membrana) para o lisossomo. As funções de outras proteínas residentes de membrana, tal como LAMP-1(CD107a), LAMP-2, LAMP-3 (CD63), são desconhecidas.

As proteínas de membrana são direcionadas por sinais em suas caudas citoplasmáticas que são reconhecidas por componentes específicos. Algumas proteínas de membrana lisossomal tais como LAMP-1, LAMP-2 e LAMP-3 tem um motivo contendo tirosinas, o qual pode ser reconhecido pelo complexo adaptador

AP1, AP2 e AP3, os quais são encontrados no TGN (*trans-Golgi network*), membrana plasmática e o sistema TGN-endossomal, respectivamente (42). Cada molécula AP liga um motivo específico (um sinal de tirosina ou um sinal de dileucina) na cauda citoplasmática e transfere proteínas para o endossomo primário e, então, para o lisossomo no caso de AP-1 e AP-2 ou diretamente para o lisossomo no caso de AP-3. LAMP-3 se liga a AP-3 e é especificado diretamente para lisossomos enquanto LAMP-1 e 2 são os primeiros transferidos para endossomo pela AP-1 e AP-2 (65, 66). Quando a molécula adaptadora AP-3 é defeituosa, os lisossomos secretórios de CTL são incapazes de mover-se junto aos microtúbulos na direção final negativa. A mutação afeta somente lisossomos secretórios, uma vez que os MTOC ou o Golgi são transportados normalmente para a área de contato. Assim, outras proteínas de membrana ainda não identificadas devem ser erroneamente arranjadas afetando o complexo motor dineína-dinactina para um transporte efetivo de grânulos para o MTOC durante a estimulação (28).

As proteínas lisossomais solúveis, tais como as hidrolases lisossomais, não têm sinais específicos em sua seqüência peptídica. Em vez disso, elas são modificadas durante a biossíntese pela adição de uma porção de manose 6- fosfato (M6P), a qual é reconhecida pelo receptor de manose 6-fosfato (MPR) (42). As serino-proteases granzimas A e B também são direcionadas pela manose-6-fosfato (67, 68). Estudos *in vitro* mostraram que a morte da célula alvo é decorrente da indução de apoptose pela ação dessas proteínas pertencentes a uma família especial de proteases (granzimas) e da presença de uma proteína formadora de poros (perforina) (69). Enquanto granzima B cliva caspase 3 e a molécula pró-apoptótica BID e ativa o processo de apoptose, a granzima A induz quebras em fita simples de DNA e impede o reparo celular forçando as células a entrarem neste programa de morte celular (70, 71). Estudos *in vivo* tem colocado em questão o papel das granzimas A e B na eliminação de células alvo e aberto o campo para identificação de novas moléculas que contribuiriam nesse cenário. Trabalho elegante de Regner e colaboradores mostrou que células T de animais deficientes em granzimas A e B são capazes de eliminar células alvo tão rápido e de maneira similar aos indivíduos selvagens, sem o uso de mecanismos compensatórios como aumento da expressão de granzimas órfãs ou interações FasL-Fas (72).

Perforina, uma das proteínas do grânulo conhecida por lisar membranas, é crucial para a função de constituintes do grânulo que estão envolvidos na morte da

célula-alvo (73). Quando perforina é secretada, ela polimeriza formando um poro de 16 nm na membrana através do qual granzimas e outras moléculas dos grânulos entram no citosol (74). Granulisina também requer perforina na sua transferência para dentro da célula-alvo, na qual atua diretamente em patógenos microbianos pela alteração da integridade de membrana (75).

Enquanto granzimas induzem morte celular pela entrada no citosol através de perforinas, a proteína de membrana FAS ligante (CD95L ou FasL) atua se ligando a FAS na superfície da célula alvo (28). FASL é um dos principais mediadores de apoptose que pode ser usado pela célula natural killer e a célula T ativada para matar células alvo e, portanto, são cuidadosamente controlados (76). A expressão de FASL é fortemente regulada pela CTL e estocada em grânulos líticos (77) e embora esteja armazenada em grânulos líticos, ainda está em debate se esta proteína está armazenada ou não junto com perforina e granzima B (78)

Apesar do papel central da exocitose de lisossomos secretórios na resposta imune a vírus, tumores e patógenos intracelulares e de haver intensa pesquisa nos eventos de morte por CTLs e NKs, pouco se sabe sobre a composição/estrutura dos grânulos líticos destas células e há contradição em quais são seus principais agentes citotóxicos. Não está claro a real composição de tais organelas bem como a identidade dos potenciais componentes de sua maquinaria exocítica.

Uma metodologia comumente utilizada na identificação de novas proteínas é o estudo do proteoma (proteômica). Em 2007, Casey e colaboradores publicaram um estudo no qual utilizou proteômica da membrana de lisossomos secretórios de células NK para definir sua composição (79). Foram identificadas proteínas como as GTPases Rab27a, Rab11a e Rab11b; de tráfego e vesiculares, entre elas Sintaxina 7 e VAMP7; estrutura de membrana e *membrane rafts*, tais como, CD63, LAMP1, LAMP2; identificou diversas outras proteínas como a hidrolase granzima B e receptores *scavenger* e também algumas que ainda não foram caracterizadas e que se apresentaram com 12% de abrangência do total de proteínas caracterizadas. Nesse mesmo contexto, a análise das proteínas dos grânulos de CTLs (resultado prévio do nosso grupo - Amarante-Mendes *et al.*, dados não publicados e **Figura 1, Tabela 1, Tabela 2**) identificou dezenas de novas proteínas, além de alguns constituintes já conhecidos. Entre os já conhecidos estavam granzima A e B, LAMP-1 e perforina. No entanto, dentre os novos candidatos, a molécula que se destacou e será alvo deste trabalho foi uma lectina, denominada galectina-1 (Gal-1), que tem

ganhado destaque por seu papel como um dos importantes reguladores das respostas imunes.

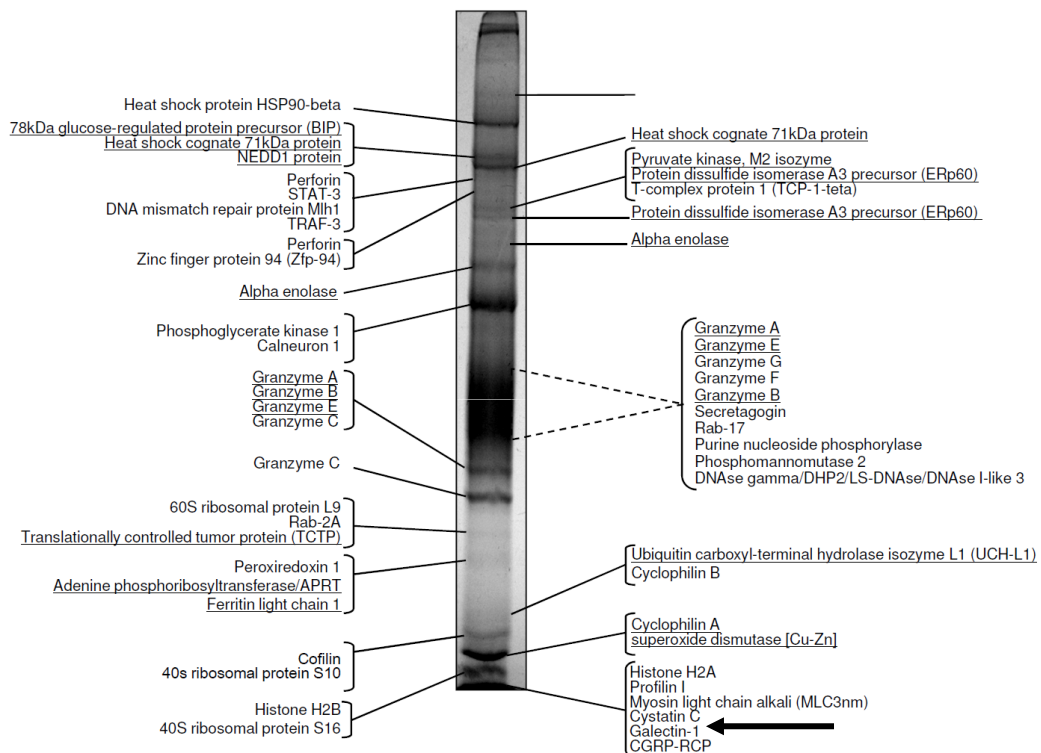


Figura 1. Marcação com SDS-PAGE seguido de 'Coomassie Blue' de grânulos purificados de células citotóxicas. A marcação revelou a banda mais proeminente presente em níveis similares em duas amostras representativas. Essas frações foram enriquecidas por atividade da esterase BLT. Análise por western-blot revelou que as frações dos grânulos purificados estavam fortemente enriquecidas com perforina, granzima A e granzima B.

1.4 Galectina-1

Galectinas são uma família de lectinas animais que reconhecem β -galactosídeos que contêm preferencialmente sequências de N-acetilactosaminas, sendo os resíduos terminais β -galactose e o tamanho da cadeia de polilactosamina requerimentos críticos para a capacidade de reconhecimento de carboidratos dessas lectinas (80).

Essas proteínas são importantes reguladoras da tolerância imune e homeostasia, podem desempenhar um papel relevante no desenvolvimento da resposta inflamatória, doenças autoimunes, aterosclerose, processos infecciosos e câncer (81). Isso faz delas alvos terapêuticos atraentes para limitar tais inflamações e doenças, além de prevenir rejeição de aloenxertos e potencializar a resposta antitumoral.

Até o momento, quinze galectinas foram identificadas em mamíferos, a maioria com grande distribuição tecidual e essa família de proteínas é subdividida em 3 categorias com base na homologia de suas sequências de aminoácidos: I) *prototípicas*, são aquelas que contêm um único CRD (*carbohydrate-recognition-binding domain*) e formam homodímeros não-covalentes (na qual se encontra a galectina-1); II) *quiméricas*, apresentam um CRD e um domínio aminoterminal rico em resíduos de prolina, glicina e tirosina, o qual é sensível a metaloproteinases e contribui para a oligomerização dessas lectinas; III) do tipo repetições em sequência (*tandem-repeat*), polipeptídeos únicos compostos por dois CRDs distintos conectados por um peptídeo ligador de 5 a 50 resíduos de aminoácidos (Cummings & Liu, 2009).

A primeira proteína descoberta na família das galectinas foi Gal-1. A galectina-1 é uma proteína ácida, possui a porção N-terminal acetilada, não possui peptídeo sinal e apresenta resíduos de cisteína livres. Gal-1 ocorre tanto como monômero quanto homodímero (82, 83). Os monômeros de galectina-1 possuem massa molecular aparente de aproximadamente 15 kDa sendo que esta pode também existir em uma forma oxidada, isto é, uma forma que não possui atividade de lectina (84).

A galectina-1 humana é codificada pelo gene LSGALS1, de 4397 pares de bases, localizado no cromossomo 22q12. O transcrito de 0,6 kb resulta do *splicing* de 4 éxons e codifica uma proteína de 135 aminoácidos (85). A galectina-1 de camundongo é codificada pelo gene *lsgals1*, de 3451 pares de base localizados no cromossomo 15 na região 44.9cM na citobanda E, dando origem a um transcrito de 817 pares de base, traduzido a uma proteína de 135 aminoácidos (86).

Essa lectina está presente tanto no meio extracelular como no intracelular. Gal-1 tem característica de proteínas citoplasmáticas típicas com uma região N-terminal acetilada e ausência de glicosilação (87). Ela tem sido descrita no núcleo celular e citosol. Contudo, embora Gal-1 não apresente a sequência sinal de secreção e não passe pela via padrão retículo endoplasmático/complexo de golgi (88), é bem sabido que ela é secretada e pode ser encontrada no lado extracelular de todas as membranas extracelulares tanto quanto em matriz extracelular de vários tecidos normais e neoplásicos (89, 90). Há evidências que esta proteína é secretada de uma maneira similar ao fator de crescimento de fibroblastos-2 (FGF-2), numa via de transporte de dentro para fora que envolve a translocação direta na membrana de

células de mamíferos e requer proteínas de membrana integras e fatores citosólicos que ainda não foram identificados (91).

Embora galectinas em geral, e em particular Gal-1, foram inicialmente descritas como lectinas que se ligam a β -galactosídeos, está claro na literatura que Gal-1 também é capaz de interagir através de ligações proteína-proteína. Na maioria dos casos a atividade de lectina de Gal-1 é observada quando ela está no meio extracelular, enquanto as interações proteína-proteína afetam suas funções intracelulares.

As proteínas já identificadas que interagem de maneira independente de carboidratos com Gal-1 não estão estruturalmente relacionadas umas com as outras e não parecem compartilhar motivos ou domínios comuns. Além disso, a porção da molécula da Gal-1 que está envolvida nestas interações ainda permanece desconhecida.

A atividade de lectina de Gal-1 está relacionada ao seu CRD. Embora Gal-1 dimérica (dGal-1) se ligue preferencialmente a glicoconjugados que contenham dissacarídeos ubíquos de N-acetilactosamina (Gal- β 1-3/4 GlcNAc também conhecido como LacNAcII ou sacarídeo tipo 2), sua ligação a unidades individuais de lactosamina é caracterizada por níveis de afinidade relativamente baixos (92, 93). É o arranjo dos dissacarídeos de lactosamina em cadeias de repetição multiramificadas (até três ramificações) que aumenta a avidéz de ligação (92, 93). Em contraste, não há aumento na avidéz quando as unidades de reconhecimento estão repetidas em corda (poli-N-lactosamina) (92).

Gal-1 é expressa diferentemente por diversos tecidos, tanto normais quanto patológicos, e participa de vários processos biológicos. Dentre estes processos podemos citar controle de sinalização celular, proliferação e ciclos celulares, apoptose, gênese de tumores, interações patógeno-hospedeiro e homeostase de célula T (81, 94-98).

Rubinstein e colaboradores mostraram que o bloqueio da atividade biológica de Gal-1 em tecido de melanoma resulta em uma massa tumoral reduzida e estimula a geração de resposta de célula T específica para o tumor *in vivo* (99).

Diversos trabalhos também têm mostrado a participação de galectina-1 na resposta imune inata e no processo inflamatório. Nesse contexto, foi visto que essa lectina inibe o edema, o extravasamento de neutrófilos e a degranulação de mastócitos (100). Mostrou-se também que a galectina-1 inibe a liberação de ácido

araquidônico (100), a produção de NO e a expressão de NO sintase induzida (iNOS) em macrófagos estimulados com LPS (101). Gal-1 é também capaz de induzir o *burst* oxidativo em neutrófilos que extravasaram para o tecido, mas não no caso de neutrófilos do sangue periférico (102).

Ainda nessa linha, mostrou-se que galectina-1 reduz a produção de IFN- γ , do TNF- α e aumenta os níveis de IL-10 tanto nas células mononucleares do sangue periférico (PBMC) como em linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺, ambas estimuladas com anti-CD3 ou na ausência deste estímulo. Portanto, essa lectina tem um papel imunorregulador (103, 104) e isto, provavelmente estaria correlacionado com o efeito benéfico do tratamento com galectina-1 em modelos de doenças autoimunes experimentais (105). Estudos *in vivo* em modelo de autoimunidade experimental têm revelado a habilidade de Gal-1 em polarizar a resposta de citocinas para o tipo T_{helper}2 (Th2), por reduzir os níveis de IFN- γ , TNF- α , IL-2 e IL-12 e aumentar os níveis da secreção de IL-5 (106, 107). A administração *in vivo* de Gal-1 previne o desenvolvimento de inflamação crônica e prejudica o andamento da doença em modelos de encefalomielite experimental autoimune (EAE) (108), artrite (98), colite (106), hepatite (107), e pancreatite crônica (109).

Dentro desse contexto de resposta imunológica, já se sabe que galectina-1 modula as etapas iniciais de ativação de célula T por limitar a coalescência de *membrane rafts* e por promover fosforilação incompleta da cadeia ζ do TCR, então permitindo somente a resposta de células T que requerem sinais parciais do TCR (110).

A ligação de galectina-1 a células T inicia uma variedade de eventos de transdução de sinal, tais como ERK-2, fosforilação, influxo de cálcio, ativação de fatores de transcrição como AP-1 e redução da proteína anti-apoptótica BCL-2, importante para a fisiologia e sobrevivência de célula T (111, 112).

Embora Gal-1 tenha uma especificidade mínima para N-acetilactosamina (113), ela se liga preferencialmente a O- e N- glicanos que trazem unidades repetidas de N-acetilactosamina (113, 114). Apesar da abundância de tais estruturas, galectina-1 se liga a uma discreta subclasse de glicoproteínas da superfície das células T, presumivelmente porque elas decoram suas principais proteínas de suporte com unidades repetidas de lactosamina espaçadas, o que favorece o empacotamento e a ligação de alta avidade de Gal-1 multivalente e bivalente.

Como dímero bivalente, Gal-1 se liga a glicoproteínas na superfície das células T de uma maneira dependente de carboidratos (115). Um número de glicoproteínas encontradas nas linhagens de células T humanas Jurkat e MOLT-4 são candidados a receptores específicos para a ligação de Gal-1 de mamíferos e estão envolvidas na morte de célula T mediada por Gal-1: CD45, CD43, CD7 (115, 116). A expressão regulada de glicosiltransferases, levando à criação de ligantes de N-acetilactosamina, durante diferentes estágios de desenvolvimento e ativação nas células T, pode determinar a susceptibilidade para a morte celular induzida por Gal-1 (117, 118).

As cadeias α e β do TCR e GM1 tem sido propostas como receptores adicionais (119, 120). Gal-1 é um dos maiores receptores para a porção de carboidrato do gangliosídeo GM-1 exposto na superfície de células de neuroblastoma humano (121). A confluência das células aumenta a apresentação de dGal-1 na superfície. Sobre essas condições Gal-1 atua como um regulador negativo de crescimento das células de neuroblastoma, sem ser pró-apoptótico (122).

Trabalhos mostraram que rGal-1 (Gal-1 recombinante) dirige a montagem de glicolattices que segregam seletivamente ligantes de Gal-1 dentro de microdomínios distintos de CD45/CD3 e CD43/CD7 na superfície de algumas células T (115).

Clustering e segregação de CD45 com CD3 e CD43 (também conhecida como leucosialina) com CD7 parecem ser cruciais para a sinalização e subsequente morte celular por galectina-1. Contudo, aquelas glicoproteínas podem regular positivamente ou negativamente a susceptibilidade celular para a apoptose induzida por galectina-1, dependendo do seu estado de glicosilação, o que deixa o possível envolvimento destas na indução de apoptose por galectina-1 ainda controverso. Dados da literatura mostram ainda que galectina-1 pode induzir apoptose em leucócitos (96), dentre os quais estão os timócitos imaturos (123) e células T ativadas *in vitro* (96). Entretanto, existem relatos na literatura contrários ao potencial apoptótico da galectina-1. Nessa linha, foi mostrado que apesar de galectina-1 induzir a exposição de fosfatidilserina na superfície de células MOLT-4, estas não entram em apoptose, pois não foi detectada a fragmentação do DNA e a perda da capacidade proliferativa dessas células após tratamento com galectina-1 (124). Dessa forma, apesar do papel de galectina-1 na indução de apoptose não estar claro, demonstrou-se que essa lectina está envolvida na homeostase leucocitária por induzir a fagocitose dessas células (95, 124). Além disso, a galectina-1 pode

promover a apoptose de células T produtoras de citocina pró-inflamatória IL-17 (Th17) e não de células Th2 produtoras de IL-10 e TGF- β (citocinas de caráter anti-inflamatório), por meio de reconhecimento diferencial de glicanas na superfície dessas células. Ou seja, essa susceptibilidade está associada ao padrão de glicosilação (125). Camundongos deficientes de galectina-1 (Lgals1^{-/-}) têm aumento na frequência de células Th1 e Th17 e aumentam a susceptibilidade a neuroinflamação autoimune.

Sabe-se, também, que Gal-1 é secretada por células TCD8⁺ efetoras ativadas. M. Carrie Miceli e colaboradores sugerem que Gal-1 regula a resposta primária de linfócitos TCD8⁺ *in vivo* por limitar o *burst size* promovendo apoptose. Seu grupo mostrou que na deficiência de Gal-1 as células hiperproliferaram em resposta à ligação do TCR, possivelmente pelo aumento da produção de IL-2 induzida pelo TCR e prevenção da AINR das células TCD8⁺ nos dias 2-4 após a ligação inicial do TCR (29, 30, 126, 127).

M. Carrie Miceli e colaboradores também mostraram, através de ensaios *in vitro* e *in vivo* de citometria de fluxo verificando a intensidade de fluorescência média da marcação com tetrâmero específico, que Gal-1 antagoniza a ligação persistente de agonistas do TCR em células TCD8⁺ periféricas ativadas (127). Além disso, demonstraram que a expressão induzida de Gal-1 por células TCD8⁺ ativadas regula a proliferação via apoptose da célula T por oposição da ligação contínua de agonistas do TCR e transdução do sinal.

Contudo, acreditava-se até o momento que as galectinas tinham ação exógena apenas através de sua secreção por uma via não-convencional que depende da manutenção da sua região de ligação a carboidratos. No entanto, como destacamos acima, resultados prévios do nosso grupo (Amarante-Mendes, dados não publicados) sugerem que a galectina 1 está presente nos lisossomos secretórios de células citotóxicas. Estes achados apontam um novo cenário dessa molécula no contexto de resposta efetora das células T CD8⁺, no qual ela seria secretada junto às outras proteínas dos grânulos citotóxicos.

Baseado neste fato, em dados da literatura que correlacionam Gal-1 e células TCD8⁺ e nas evidências de ação desta lectina sobre receptores de superfície celular regulando a fisiologia das células e homeostasia do sistema imunológico, a hipótese deste trabalho é que Gal-1 está localizada no compartimento lisossomal de células citotóxicas e possa ser secretada junto

às outras proteínas dos grânulos citotóxicos, contribuindo, desta forma, com a resposta efetora de células NK e CTL.

6 CONCLUSÃO

- Galectina-1 é um dos constituintes dos lisossomos das células citotóxicas.
- Galectina-1 contribui para a total eficácia da função efetora de células TCD8⁺ no modelo de citotoxicidade *in vitro* utilizando o clone de células L1210 e no modelo de imunização com adenovírus 5 humano adenoβgal.
- Galectina-1 regula a via de FASL nas células TCD8⁺ no modelo de imunização com adenovírus 5 humano adenoβgal mas não no modelo de citotoxicidade *in vitro* utilizando o clone de células L1210 e L1210Fas como células alvo.
- A expressão de galectina-1 nos linfócitos T CD8⁺ é importante para o estabelecimento de contato duradouro entre essas células e células dendríticas durante o processo de apresentação de antígenos.

REFERÊNCIAS*

1. Wu J, Lanier LL. Natural killer cells and cancer. *Adv Cancer Res.* 2003;90:127-56.
2. Rothstein TL, Mage M, Jones G, McHugh LL. Cytotoxic T lymphocyte sequential killing of immobilized allogeneic tumor target cells measured by time-lapse microcinematography. *J Immunol.* 1978;121(5):1652-6.
3. Moretta A, Marcenaro E, Parolini S, Ferlazzo G, Moretta L. NK cells at the interface between innate and adaptive immunity. *Cell Death Differ.* 2008;15(2):226-33.
4. Vivier E, Nunes JA, Vely F. Natural killer cell signaling pathways. *Science.* 2004;306(5701):1517-9.
5. Gregoire C, Chasson L, Luci C, Tomasello E, Geissmann F, Vivier E, et al. The trafficking of natural killer cells. *Immunol Rev.* 2007;220:169-82.
6. Vyas YM, Maniar H, Dupont B. Visualization of signaling pathways and cortical cytoskeleton in cytolytic and noncytolytic natural killer cell immune synapses. *Immunol Rev.* 2002;189:161-78.
7. Inoue H, Miyaji M, Kosugi A, Nagafuku M, Okazaki T, Mimori T, et al. Lipid rafts as the signaling scaffold for NK cell activation: tyrosine phosphorylation and association of LAT with phosphatidylinositol 3-kinase and phospholipase C-gamma following CD2 stimulation. *Eur J Immunol.* 2002;32(8):2188-98.
8. Vyas YM, Mehta KM, Morgan M, Maniar H, Butros L, Jung S, et al. Spatial organization of signal transduction molecules in the NK cell immune synapses during MHC class I-regulated noncytolytic and cytolytic interactions. *J Immunol.* 2001;167(8):4358-67.
9. Orange JS, Harris KE, Andzelm MM, Valter MM, Geha RS, Strominger JL. The mature activating natural killer cell immunologic synapse is formed in distinct stages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(24):14151-6.
10. Lou Z, Jevremovic D, Billadeau DD, Leibson PJ. A balance between positive and negative signals in cytotoxic lymphocytes regulates the polarization of lipid rafts during the development of cell-mediated killing. *J Exp Med.* 2000;191(2):347-54.
11. Sancho D, Nieto M, Llano M, Rodriguez-Fernandez JL, Tejedor R, Avraham S, et al. The tyrosine kinase PYK-2/RAFTK regulates natural killer (NK) cell cytotoxic response, and is translocated and activated upon specific target cell recognition and killing. *J Cell Biol.* 2000;149(6):1249-62.
12. Bossi G, Trambas C, Booth S, Clark R, Stinchcombe J, Griffiths GM. The secretory synapse: the secrets of a serial killer. *Immunol Rev.* 2002;189:152-60.

*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>

13. Katz P, Zaytoun AM, Lee JH, Jr. Mechanisms of human cell-mediated cytotoxicity. III. Dependence of natural killing on microtubule and microfilament integrity. *J Immunol.* 1982;129(6):2816-25.
14. Carpen O, Virtanen I, Lehto VP, Saksela E. Polarization of NK cell cytoskeleton upon conjugation with sensitive target cells. *J Immunol.* 1983;131(6):2695-8.
15. Kupfer A, Dennert G, Singer SJ. Polarization of the Golgi apparatus and the microtubule-organizing center within cloned natural killer cells bound to their targets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983;80(23):7224-8.
16. Orange JS, Ramesh N, Remold-O'Donnell E, Sasahara Y, Koopman L, Byrne M, et al. Wiskott-Aldrich syndrome protein is required for NK cell cytotoxicity and colocalizes with actin to NK cell-activating immunologic synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(17):11351-6.
17. von Andrian UH, Mempel TR. Homing and cellular traffic in lymph nodes. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(11):867-78.
18. Casrouge A, Beaudoin E, Dalle S, Pannetier C, Kanellopoulos J, Kourilsky P. Size estimate of the alpha beta TCR repertoire of naive mouse splenocytes. *J Immunol.* 2000;164(11):5782-7.
19. Blattman JN, Antia R, Sourdive DJ, Wang X, Kaech SM, Murali-Krishna K, et al. Estimating the precursor frequency of naive antigen-specific CD8 T cells. *J Exp Med.* 2002;195(5):657-64.
20. Henrickson SE, Mempel TR, Mazo IB, Liu B, Artyomov MN, Zheng H, et al. T cell sensing of antigen dose governs interactive behavior with dendritic cells and sets a threshold for T cell activation. *Nat Immunol.* 2008;9(3):282-91.
21. Miller MJ, Wei SH, Parker I, Cahalan MD. Two-photon imaging of lymphocyte motility and antigen response in intact lymph node. *Science.* 2002;296(5574):1869-73.
22. Stoll S, Delon J, Brotz TM, Germain RN. Dynamic imaging of T cell-dendritic cell interactions in lymph nodes. *Science.* 2002;296(5574):1873-6.
23. Mempel TR, Henrickson SE, Von Andrian UH. T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature.* 2004;427(6970):154-9.
24. Purbhoo MA, Irvine DJ, Huppa JB, Davis MM. T cell killing does not require the formation of a stable mature immunological synapse. *Nat Immunol.* 2004;5(5):524-30.
25. Irvine DJ, Purbhoo MA, Krogsgaard M, Davis MM. Direct observation of ligand recognition by T cells. *Nature.* 2002;419(6909):845-9.
26. Sykulev Y, Joo M, Vturina I, Tsomides TJ, Eisen HN. Evidence that a single peptide-MHC complex on a target cell can elicit a cytolytic T cell response. *Immunity.* 1996;4(6):565-71.

27. Griffiths GM. Endocytosing the death sentence. *J Cell Biol.* 2003;160(2):155-6.
28. Bossi G, Griffiths GM. CTL secretory lysosomes: biogenesis and secretion of a harmful organelle. *Semin Immunol.* 2005;17(1):87-94.
29. Tham EL, Mescher MF. Signaling alterations in activation-induced nonresponsive CD8 T cells. *J Immunol.* 2001;167(4):2040-8.
30. Tham EL, Shrikant P, Mescher MF. Activation-induced nonresponsiveness: a Th-dependent regulatory checkpoint in the CTL response. *J Immunol.* 2002;168(3):1190-7.
31. Faroudi M, Utzny C, Salio M, Cerundolo V, Guiraud M, Muller S, et al. Lytic versus stimulatory synapse in cytotoxic T lymphocyte/target cell interaction: manifestation of a dual activation threshold. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(24):14145-50.
32. Monks CR, Freiberg BA, Kupfer H, Sciaky N, Kupfer A. Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature.* 1998;395(6697):82-6.
33. Stinchcombe JC, Bossi G, Booth S, Griffiths GM. The immunological synapse of CTL contains a secretory domain and membrane bridges. *Immunity.* 2001;15(5):751-61.
34. Krummel MF, Sjaastad MD, Wulfiging C, Davis MM. Differential clustering of CD4 and CD3zeta during T cell recognition. *Science.* 2000;289(5483):1349-52.
35. Wulfiging C, Sumen C, Sjaastad MD, Wu LC, Dustin ML, Davis MM. Costimulation and endogenous MHC ligands contribute to T cell recognition. *Nature immunology.* 2002;3(1):42-7.
36. Pearce EL, Mullen AC, Martins GA, Krawczyk CM, Hutchins AS, Zediak VP, et al. Control of effector CD8+ T cell function by the transcription factor Eomesodermin. *Science.* 2003;302(5647):1041-3.
37. Szabo SJ, Sullivan BM, Stemmann C, Satoskar AR, Sleckman BP, Glimcher LH. Distinct effects of T-bet in TH1 lineage commitment and IFN-gamma production in CD4 and CD8 T cells. *Science.* 2002;295(5553):338-42.
38. Egawa T, Tillman RE, Naoe Y, Taniuchi I, Littman DR. The role of the Runx transcription factors in thymocyte differentiation and in homeostasis of naive T cells. *J Exp Med.* 2007;204(8):1945-57.
39. Setoguchi R, Tachibana M, Naoe Y, Muroi S, Akiyama K, Tezuka C, et al. Repression of the transcription factor Th-POK by Runx complexes in cytotoxic T cell development. *Science.* 2008;319(5864):822-5.
40. Woolf E, Xiao C, Fainaru O, Lotem J, Rosen D, Negreanu V, et al. Runx3 and Runx1 are required for CD8 T cell development during thymopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(13):7731-6.

41. Lyubchenko TA, Wurth GA, Zweifach A. Role of calcium influx in cytotoxic T lymphocyte lytic granule exocytosis during target cell killing. *Immunity*. 2001;15(5):847-59.
42. Blott EJ, Griffiths GM. Secretory lysosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002;3(2):122-31.
43. Stinchcombe JC, Griffiths GM. Secretory mechanisms in cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2007;23:495-517.
44. Cullen SP, Martin SJ. Mechanisms of granule-dependent killing. *Cell Death Differ*. 2008;15(2):251-62.
45. Voskoboinik I, Smyth MJ, Trapani JA. Perforin-mediated target-cell death and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(12):940-52.
46. Hong W. SNAREs and traffic. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1744(3):493-517.
47. Paumet F, Le Mao J, Martin S, Galli T, David B, Blank U, et al. Soluble NSF attachment protein receptors (SNAREs) in RBL-2H3 mast cells: functional role of syntaxin 4 in exocytosis and identification of a vesicle-associated membrane protein 8-containing secretory compartment. *J Immunol*. 2000;164(11):5850-7.
48. Hibi T, Hirashima N, Nakanishi M. Rat basophilic leukemia cells express syntaxin-3 and VAMP-7 in granule membranes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;271(1):36-41.
49. Guo Z, Turner C, Castle D. Relocation of the t-SNARE SNAP-23 from lamellipodia-like cell surface projections regulates compound exocytosis in mast cells. *Cell*. 1998;94(4):537-48.
50. Brumell JH, Volchuk A, Sengelov H, Borregaard N, Cieutat AM, Bainton DF, et al. Subcellular distribution of docking/fusion proteins in neutrophils, secretory cells with multiple exocytic compartments. *J Immunol*. 1995;155(12):5750-9.
51. Zerial M, McBride H. Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2(2):107-17.
52. Lutcke A, Olkkonen VM, Dupree P, Lutcke H, Simons K, Zerial M. Isolation of a murine cDNA clone encoding Rab19, a novel tissue-specific small GTPase. *Gene*. 1995;155(2):257-60.
53. Jordens I, Fernandez-Borja M, Marsman M, Dusseljee S, Janssen L, Calafat J, et al. The Rab7 effector protein RILP controls lysosomal transport by inducing the recruitment of dynein-dynactin motors. *Curr Biol*. 2001;11(21):1680-5.
54. Wang T, Hong W. Interorganellar regulation of lysosome positioning by the Golgi apparatus through Rab34 interaction with Rab-interacting lysosomal protein. *Mol Biol Cell*. 2002;13(12):4317-32.

55. Delter JC et al. Rab geranylgeranyl transferase ω -mutation in the gunmetal mouse reduces Rab prenylation and platelet synthesis. *Proc Natl Acad Sci*. 2000;97:4144-9.
56. Stinchcombe JC GG. Normal and abnormal secretion by haemopoietic cells. *Immunology*. 2001;103:10-6.
57. Swank RT, Novak EK, McGarry MP, Zhang Y, Li W, Zhang Q, et al. Abnormal vesicular trafficking in mouse models of Hermansky-Pudlak syndrome. *Pigment Cell Res*. 2000;13 Suppl 8:59-67.
58. Shirakawa R, Higashi T, Kondo H, Yoshioka A, Kita T, Horiuchi H. Purification and functional analysis of a Rab27 effector munc 13-4 using a semi-intact platelet dense-granule secretion assay. *Methods Enzymol*. 2005;403:778-88.
59. Tolmachova T, Abrink M, Futter CE, Authi KS, Seabra MC. Rab27b regulates number and secretion of platelet dense granules. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(14):5872-7.
60. Ward DM, Shiflett SL, Huynh D, Vaughn MB, Prestwich G, Kaplan J. Use of expression constructs to dissect the functional domains of the CHS/beige protein: identification of multiple phenotypes. *Traffic*. 2003;4(6):403-15.
61. Ma JS, Haydar TF, Radoja S. Protein kinase C delta localizes to secretory lysosomes in CD8+ CTL and directly mediates TCR signals leading to granule exocytosis-mediated cytotoxicity. *J Immunol*. 2008;181(7):4716-22.
62. Ma JS, Monu N, Shen DT, Mecklenbrauker I, Radoja N, Haydar TF, et al. Protein kinase Cdelta regulates antigen receptor-induced lytic granule polarization in mouse CD8+ CTL. *J Immunol*. 2007;178(12):7814-21.
63. Cuervo AM, Dice JF. A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science*. 1996;273(5274):501-3.
64. Agarraberes FA, Dice JF. A molecular chaperone complex at the lysosomal membrane is required for protein translocation. *J Cell Sci*. 2001;114(Pt 13):2491-9.
65. Rous BA, Reaves BJ, Ihrke G, Briggs JA, Gray SR, Stephens DJ, et al. Role of adaptor complex AP-3 in targeting wild-type and mutated CD63 to lysosomes. *Mol Biol Cell*. 2002;13(3):1071-82.
66. Robinson MS, Bonifacino JS. Adaptor-related proteins. *Curr Opin Cell Biol*. 2001;13(4):444-53.
67. Burkhardt JK, Hester S, Argon Y. Two proteins targeted to the same lytic granule compartment undergo very different posttranslational processing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(18):7128-32.
68. Griffiths GM, Isaacs S. Granzymes A and B are targeted to the lytic granules of lymphocytes by the mannose-6-phosphate receptor. *J Cell Biol*. 1993;120(4):885-96.

69. Nakajima H, Park HL, Henkart PA. Synergistic roles of granzymes A and B in mediating target cell death by rat basophilic leukemia mast cell tumors also expressing cytolysin/perforin. *J Exp Med*. 1998;181(3):1037-46.
70. Shresta S, Graubert TA, Thomas DA, Raptis SZ, Ley TJ. Granzyme A initiates an alternative pathway for granule-mediated apoptosis. *Immunity*. 1999;10(5):595-605.
71. Barry M, Heibein JA, Pinkoski MJ, Lee SF, Moyer RW, Green DR, et al. Granzyme B short-circuits the need for caspase 8 activity during granule-mediated cytotoxic T-lymphocyte killing by directly cleaving Bid. *Mol Cell Biol*. 2000;20(11):3781-94.
72. Regner M, Pavlinovic L, Koskinen A, Young N, Trapani JA, Mullbacher A. Cutting edge: rapid and efficient in vivo cytotoxicity by cytotoxic T cells is independent of granzymes A and B. *J Immunol*. 2009;183(1):37-40.
73. Trapani JA, Sutton VR. Granzyme B: pro-apoptotic, antiviral and antitumor functions. *Curr Opin Immunol*. 2003;15(5):533-43.
74. Podack ER, Hengartner H. Structure of perforin and its role in cytolysis. *Year Immunol*. 1989;6:245-61.
75. Stenger S, Hanson DA, Teitelbaum R, Dewan P, Niazi KR, Froelich CJ, et al. An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science*. 1998;282(5386):121-5.
76. Suda T, Okazaki T, Naito Y, Yokota T, Arai N, Ozaki S, et al. Expression of the Fas ligand in cells of T cell lineage. *J Immunol*. 1995;154(8):3806-13.
77. 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;5(1):90-6.
78. He JS, Ostergaard HL. CTLs contain and use intracellular stores of FasL distinct from cytolytic granules. *J Immunol*. 2007;179(4):2339-48.
79. Casey TM, Meade JL, Hewitt EW. Organelle proteomics: identification of the exocytic machinery associated with the natural killer cell secretory lysosome. *Mol Cell Proteomics*. 2007;6(5):767-80.
80. Stowell SR, Dias-Baruffi M, Penttila L, Renkonen O, Nyame AK, Cummings RD. Human galectin-1 recognition of poly-N-acetyllactosamine and chimeric polysaccharides. *Glycobiology*. 2004;14(2):157-67.
81. Liu FT, Rabinovich GA. Galectins: regulators of acute and chronic inflammation. *Ann N Y Acad Sci*. 1183:158-82.
82. Cho M, Cummings RD. Galectin-1, a beta-galactoside-binding lectin in Chinese hamster ovary cells. II. Localization and biosynthesis. *The Journal of biological chemistry*. 1995;270(10):5207-12.

83. Barondes SH, Castronovo V, Cooper DN, Cummings RD, Drickamer K, Feizi T, et al. Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. *Cell*. 1994;76(4):597-8.
84. Outenreath RL, Jones AL. Influence of an endogenous lectin substrate on cultured dorsal root ganglion cells. *J Neurocytol*. 1992;21(11):788-95.
85. Chiariotti L, Salvatore P, Frunzio R, Bruni CB. Galectin genes: regulation of expression. *Glycoconj J*. 2004;19(7-9):441-9.
86. Lohr M, Lensch M, Andre S, Kaltner H, Siebert HC, Smetana K, Jr., et al. Murine homodimeric adhesion/growth-regulatory galectins-1, -2 and -7: comparative profiling of gene/ promoter sequences by database mining, of expression by RT-PCR/immunohistochemistry and of contact sites for carbohydrate ligands by computational chemistry. *Folia Biol (Praha)*. 2007;53(4):109-28.
87. Clerch LB, Whitney P, Hass M, Brew K, Miller T, Werner R, et al. Sequence of a full-length cDNA for rat lung beta-galactoside-binding protein: primary and secondary structure of the lectin. *Biochemistry*. 1988;27(2):692-9.
88. Hughes RC. Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1473(1):172-85.
89. Camby I, Belot N, Lefranc F, Sadeghi N, de Launoit Y, Kaltner H, et al. Galectin-1 modulates human glioblastoma cell migration into the brain through modifications to the actin cytoskeleton and levels of expression of small GTPases. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2002;61(7):585-96.
90. Clause N, van den Brule F, Waltregny D, Garnier F, Castronovo V. Galectin-1 expression in prostate tumor-associated capillary endothelial cells is increased by prostate carcinoma cells and modulates heterotypic cell-cell adhesion. *Angiogenesis*. 1999;3(4):317-25.
91. Schafer T, Zentgraf H, Zehe C, Brugger B, Bernhagen J, Nickel W. Unconventional secretion of fibroblast growth factor 2 is mediated by direct translocation across the plasma membrane of mammalian cells. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(8):6244-51.
92. Ahmad N, Gabius HJ, Sabesan S, Oscarson S, Brewer CF. Thermodynamic binding studies of bivalent oligosaccharides to galectin-1, galectin-3, and the carbohydrate recognition domain of galectin-3. *Glycobiology*. 2004;14(9):817-25.
93. Schwarz FP, Ahmed H, Bianchet MA, Amzel LM, Vasta GR. Thermodynamics of bovine spleen galectin-1 binding to disaccharides: correlation with structure and its effect on oligomerization at the denaturation temperature. *Biochemistry*. 1998;37(17):5867-77.
94. Leffler H, Carlsson S, Hedlund M, Qian Y, Poirier F. Introduction to galectins. *Glycoconj J*. 2004;19(7-9):433-40.
95. Dias-Baruffi M, Zhu H, Cho M, Karmakar S, McEver RP, Cummings RD. Dimeric galectin-1 induces surface exposure of phosphatidylserine and phagocytic

recognition of leukocytes without inducing apoptosis. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(42):41282-93.

96. Perillo NL, Pace KE, Seilhamer JJ, Baum LG. Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. *Nature*. 1995;378(6558):736-9.

97. Stowell SR, Arthur CM, Dias-Baruffi M, Rodrigues LC, Gourdine JP, Heimburg-Molinaro J, et al. Innate immune lectins kill bacteria expressing blood group antigen. *Nat Med*.16(3):295-301.

98. Rabinovich GA, Daly G, Dreja H, Tailor H, Riera CM, Hirabayashi J, et al. Recombinant galectin-1 and its genetic delivery suppress collagen-induced arthritis via T cell apoptosis. *J Exp Med*. 1999;190(3):385-98.

99. Rubinstein N, Alvarez M, Zwirner NW, Toscano MA, Ilarregui JM, Bravo A, et al. Targeted inhibition of galectin-1 gene expression in tumor cells results in heightened T cell-mediated rejection; A potential mechanism of tumor-immune privilege. *Cancer Cell*. 2004;5(3):241-51.

100. Rabinovich GA, Sotomayor CE, Riera CM, Bianco I, Correa SG. Evidence of a role for galectin-1 in acute inflammation. *Eur J Immunol*. 2000;30(5):1331-9.

101. Correa SG, Sotomayor CE, Aoki MP, Maldonado CA, Rabinovich GA. Opposite effects of galectin-1 on alternative metabolic pathways of L-arginine in resident, inflammatory, and activated macrophages. *Glycobiology*. 2003;13(2):119-28.

102. Almkvist J, Dahlgren C, Leffler H, Karlsson A. Activation of the neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase by galectin-1. *J Immunol*. 2002;168(8):4034-41.

103. van der Leij J, van den Berg A, Blokzijl T, Harms G, van Goor H, Zwiars P, et al. Dimeric galectin-1 induces IL-10 production in T-lymphocytes: an important tool in the regulation of the immune response. *J Pathol*. 2004;204(5):511-8.

104. van der Leij J, van den Berg A, Harms G, Eschbach H, Vos H, Zwiars P, et al. Strongly enhanced IL-10 production using stable galectin-1 homodimers. *Mol Immunol*. 2007;44(4):506-13.

105. Toscano MA, Commodaro AG, Ilarregui JM, Bianco GA, Liberman A, Serra HM, et al. Galectin-1 suppresses autoimmune retinal disease by promoting concomitant Th2- and T regulatory-mediated anti-inflammatory responses. *J Immunol*. 2006;176(10):6323-32.

106. Santucci L, Fiorucci S, Rubinstein N, Mencarelli A, Palazzetti B, Federici B, et al. Galectin-1 suppresses experimental colitis in mice. *Gastroenterology*. 2003;124(5):1381-94.

107. Santucci L, Fiorucci S, Cammilleri F, Servillo G, Federici B, Morelli A. Galectin-1 exerts immunomodulatory and protective effects on concanavalin A-induced hepatitis in mice. *Hepatology*. 2000;31(2):399-406.

108. Offner H, Celnik B, Bringman TS, Casentini-Borocz D, Nedwin GE, Vandenberg AA. Recombinant human beta-galactoside binding lectin suppresses clinical and histological signs of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol.* 1990;28(2):177-84.
109. Wang L, Friess H, Zhu Z, Frigeri L, Zimmermann A, Korc M, et al. Galectin-1 and galectin-3 in chronic pancreatitis. *Lab Invest.* 2000;80(8):1233-41.
110. Chung CD, Patel VP, Moran M, Lewis LA, Miceli MC. Galectin-1 induces partial TCR zeta-chain phosphorylation and antagonizes processive TCR signal transduction. *J Immunol.* 2000;165(7):3722-9. Epub 2000/10/18.
111. Vespa GN, Lewis LA, Kozak KR, Moran M, Nguyen JT, Baum LG, et al. Galectin-1 specifically modulates TCR signals to enhance TCR apoptosis but inhibit IL-2 production and proliferation. *J Immunol.* 1999;162(2):799-806.
112. Rabinovich GA, Alonso CR, Sotomayor CE, Durand S, Bocco JL, Riera CM. Molecular mechanisms implicated in galectin-1-induced apoptosis: activation of the AP-1 transcription factor and downregulation of Bcl-2. *Cell Death Differ.* 2000;7(8):747-53.
113. Houzelstein D, Goncalves IR, Fadden AJ, Sidhu SS, Cooper DN, Drickamer K, et al. Phylogenetic analysis of the vertebrate galectin family. *Mol Biol Evol.* 2004;21(7):1177-87.
114. Cheung P, Pawling J, Partridge EA, Sukhu B, Grynopas M, Dennis JW. Metabolic homeostasis and tissue renewal are dependent on beta1,6GlcNAc-branched N-glycans. *Glycobiology.* 2007;17(8):828-37.
115. Pace KE, Lee C, Stewart PL, Baum LG. Restricted receptor segregation into membrane microdomains occurs on human T cells during apoptosis induced by galectin-1. *J Immunol.* 1999;163(7):3801-11.
116. Fajka-Boja R, Szemes M, Ion G, Legradi A, Caron M, Monostori E. Receptor tyrosine phosphatase, CD45 binds galectin-1 but does not mediate its apoptotic signal in T cell lines. *Immunol Lett.* 2002;82(1-2):149-54.
117. Carlow DA, Williams MJ, Ziltener HJ. Modulation of O-glycans and N-glycans on murine CD8 T cells fails to alter annexin V ligand induction by galectin 1. *J Immunol.* 2003;171(10):5100-6.
118. Galvan M, Tsuboi S, Fukuda M, Baum LG. Expression of a specific glycosyltransferase enzyme regulates T cell death mediated by galectin-1. *The Journal of biological chemistry.* 2000;275(22):16730-7.
119. Kopitz J, von Reitzenstein C, Burchert M, Cantz M, Gabius HJ. Galectin-1 is a major receptor for ganglioside GM1, a product of the growth-controlling activity of a cell surface ganglioside sialidase, on human neuroblastoma cells in culture. *The Journal of biological chemistry.* 1998;273(18):11205-11.
120. Jameson SC. Maintaining the norm: T-cell homeostasis. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(8):547-56.

121. Andre S, Kaltner H, Furuike T, Nishimura S, Gabius HJ. Persubstituted cyclodextrin-based glycoclusters as inhibitors of protein-carbohydrate recognition using purified plant and mammalian lectins and wild-type and lectin-gene-transfected tumor cells as targets. *Bioconjug Chem.* 2004;15(1):87-98.
122. Kopitz J, von Reitzenstein C, Andre S, Kaltner H, Uhl J, Ehemann V, et al. Negative regulation of neuroblastoma cell growth by carbohydrate-dependent surface binding of galectin-1 and functional divergence from galectin-3. *The Journal of biological chemistry.* 2001;276(38):35917-23.
123. Perillo NL, Uittenbogaart CH, Nguyen JT, Baum LG. Galectin-1, an endogenous lectin produced by thymic epithelial cells, induces apoptosis of human thymocytes. *J Exp Med.* 1997;185(10):1851-8.
124. Stowell SR, Karmakar S, Stowell CJ, Dias-Baruffi M, McEver RP, Cummings RD. Human galectin-1, -2, and -4 induce surface exposure of phosphatidylserine in activated human neutrophils but not in activated T cells. *Blood.* 2007;109(1):219-27.
125. Toscano MA, Bianco GA, Ilarregui JM, Croci DO, Correale J, Hernandez JD, et al. Differential glycosylation of TH1, TH2 and TH-17 effector cells selectively regulates susceptibility to cell death. *Nature immunology.* 2007;8(8):825-34.
126. Deeths MJ, Kedl RM, Mescher MF. CD8+ T cells become nonresponsive (anergic) following activation in the presence of costimulation. *J Immunol.* 1999;163(1):102-10.
127. Liu SD, Tomassian T, Bruhn KW, Miller JF, Poirier F, Miceli MC. Galectin-1 tunes TCR binding and signal transduction to regulate CD8 burst size. *J Immunol.* 2009;182(9):5283-95. Epub 2009/04/22.
128. Kessel D. Some determinants of camptothecin responsiveness in leukemia L1210 cells. *Cancer research.* 1971;31(12):1883-7. Epub 1971/12/01.
129. Kessel D. Transport and accumulation of triazenoimidazoles by L1210 cells. *Cancer research.* 1971;31(2):135-9. Epub 1971/02/01.
130. Winzler C, Rovere P, Rescigno M, Granucci F, Penna G, Adorini L, et al. Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures. *J Exp Med.* 1997;185(2):317-28. Epub 1997/01/20.
131. Machado AV, Cardoso JE, Claser C, Rodrigues MM, Gazzinelli RT, Bruna-Romero O. Long-term protective immunity induced against *Trypanosoma cruzi* infection after vaccination with recombinant adenoviruses encoding amastigote surface protein-2 and trans-sialidase. *Hum Gene Ther.* 2006;17(9):898-908. Epub 2006/09/16.
132. Tzelepis F, Persechini PM, Rodrigues MM. Modulation of CD4(+) T cell-dependent specific cytotoxic CD8(+) T cells differentiation and proliferation by the timing of increase in the pathogen load. *PLoS One.* 2007;2(4):e393. Epub 2007/04/27.

133. Rigato PO, de Alencar BC, de Vasconcelos JR, Dominguez MR, Araujo AF, Machado AV, et al. Heterologous plasmid DNA prime-recombinant human adenovirus 5 boost vaccination generates a stable pool of protective long-lived CD8(+) T effector memory cells specific for a human parasite, *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun.* 79(5):2120-30.
134. Park JW, Voss PG, Grabski S, Wang JL, Patterson RJ. Association of galectin-1 and galectin-3 with Gemin4 in complexes containing the SMN protein. *Nucleic acids research.* 2001;29(17):3595-602.
135. Cui W, Kaech SM. Generation of effector CD8+ T cells and their conversion to memory T cells. *Immunol Rev.* 236:151-66.
136. Oehen S, Brduscha-Riem K. Differentiation of naive CTL to effector and memory CTL: correlation of effector function with phenotype and cell division. *J Immunol.* 1998;161(10):5338-46.
137. Tzelepis F, de Alencar BC, Penido ML, Gazzinelli RT, Persechini PM, Rodrigues MM. Distinct kinetics of effector CD8+ cytotoxic T cells after infection with *Trypanosoma cruzi* in naive or vaccinated mice. *Infect Immun.* 2006;74(4):2477-81.
138. Tzelepis F, de Alencar BC, Penido ML, Claser C, Machado AV, Bruna-Romero O, et al. Infection with *Trypanosoma cruzi* restricts the repertoire of parasite-specific CD8+ T cells leading to immunodominance. *J Immunol.* 2008;180(3):1737-48.
139. Oukka M, Cohen-Tannoudji M, Tanaka Y, Babinet C, Kosmatopoulos K. Medullary thymic epithelial cells induce tolerance to intracellular proteins. *J Immunol.* 1996;156(3):968-75.
140. Barber DL, Wherry EJ, Ahmed R. Cutting edge: rapid in vivo killing by memory CD8 T cells. *J Immunol.* 2003;171(1):27-31.
141. Kennedy MK, Glaccum M, Brown SN, Butz EA, Viney JL, Embers M, et al. Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. *J Exp Med.* 2000;191(5):771-80.
142. Becker TC, Wherry EJ, Boone D, Murali-Krishna K, Antia R, Ma A, et al. Interleukin 15 is required for proliferative renewal of virus-specific memory CD8 T cells. *J Exp Med.* 2002;195(12):1541-8.
143. Tan JT, Ernst B, Kieper WC, LeRoy E, Sprent J, Surh CD. Interleukin (IL)-15 and IL-7 jointly regulate homeostatic proliferation of memory phenotype CD8+ cells but are not required for memory phenotype CD4+ cells. *J Exp Med.* 2002;195(12):1523-32.
144. Shedlock DJ, Shen H. Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science.* 2003;300(5617):337-9.
145. Sun JC, Bevan MJ. Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. *Science.* 2003;300(5617):339-42.

146. Kaech SM, Wherry EJ. Heterogeneity and cell-fate decisions in effector and memory CD8+ T cell differentiation during viral infection. *Immunity*. 2007;27(3):393-405.
147. Hernandez J, Aung S, Redmond WL, Sherman LA. Phenotypic and functional analysis of CD8(+) T cells undergoing peripheral deletion in response to cross-presentation of self-antigen. *J Exp Med*. 2001;194(6):707-17.
148. Mescher MF, Agarwal P, Casey KA, Hammerbeck CD, Xiao Z, Curtsinger JM. Molecular basis for checkpoints in the CD8 T cell response: tolerance versus activation. *Semin Immunol*. 2007;19(3):153-61.
149. Tham EL, Mescher MF. The poststimulation program of CD4 versus CD8 T cells (death versus activation-induced nonresponsiveness). *J Immunol*. 2002;169(4):1822-8.
150. Stambas J, Doherty PC, Turner SJ. An in vivo cytotoxicity threshold for influenza A virus-specific effector and memory CD8(+) T cells. *J Immunol*. 2007;178(3):1285-92.
151. Takai S, Sabzevari H, Farsaci B, Schlom J, Greiner JW. Distinct effects of saracatinib on memory CD8+ T cell differentiation. *J Immunol*. 188(9):4323-33.
152. Green DR. Fas Bim boom! *Immunity*. 2008;28(2):141-3.
153. Chesnutt MS, Finck BK, Killeen N, Connolly MK, Goodman H, Wofsy D. Enhanced lymphoproliferation and diminished autoimmunity in CD4-deficient MRL/lpr mice. *Clin Immunol Immunopathol*. 1998;87(1):23-32.
154. Rieux-Laucat F, Fischer A, Deist FL. Cell-death signaling and human disease. *Curr Opin Immunol*. 2003;15(3):325-31.
155. Bidere N, Su HC, Lenardo MJ. Genetic disorders of programmed cell death in the immune system. *Annu Rev Immunol*. 2006;24:321-52.
156. Huang JF, Yang Y, Sepulveda H, Shi W, Hwang I, Peterson PA, et al. TCR-Mediated internalization of peptide-MHC complexes acquired by T cells. *Science*. 1999;286(5441):952-4.
157. Hudrisier D, Riond J, Mazarguil H, Gairin JE, Joly E. Cutting edge: CTLs rapidly capture membrane fragments from target cells in a TCR signaling-dependent manner. *J Immunol*. 2001;166(6):3645-9.
158. Betts MR, Brenchley JM, Price DA, De Rosa SC, Douek DC, Roederer M, et al. Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *Journal of immunological methods*. 2003;281(1-2):65-78. Epub 2003/10/29.
159. Cruz-Guilloty F, Pipkin ME, Djuretic IM, Levanon D, Lotem J, Lichtenheld MG, et al. Runx3 and T-box proteins cooperate to establish the transcriptional program of effector CTLs. *J Exp Med*. 2009;206(1):51-9.

160. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature reviews*. 2008;9(3):231-41.
161. Adam-Klages S, Adam D, Janssen O, Kabelitz D. Death receptors and caspases: role in lymphocyte proliferation, cell death, and autoimmunity. *Immunologic research*. 2005;33(2):149-66.
162. Itoh N, Nagata S. A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *The Journal of biological chemistry*. 1993;268(15):10932-7.
163. Matarrese P, Tinari A, Mormone E, Bianco GA, Toscano MA, Ascione B, et al. Galectin-1 sensitizes resting human T lymphocytes to Fas (CD95)-mediated cell death via mitochondrial hyperpolarization, budding, and fission. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(8):6969-85. Epub 2004/11/24.
164. Moreau HD, Lemaitre F, Terriac E, Azar G, Piel M, Lennon-Dumenil AM, et al. Dynamic in situ cytometry uncovers T cell receptor signaling during immunological synapses and kinapses in vivo. *Immunity*. 2012;37(2):351-63. Epub 2012/06/12.
165. Hugues S, Fetler L, Bonifaz L, Helft J, Amblard F, Amigorena S. Distinct T cell dynamics in lymph nodes during the induction of tolerance and immunity. *Nat Immunol*. 2004;5(12):1235-42. Epub 2004/11/02.
166. Celli S, Day M, Muller AJ, Molina-Paris C, Lythe G, Bousso P. How many dendritic cells are required to initiate a T-cell response? *Blood*. 2012;120(19):3945-8. Epub 2012/09/22.
167. Wong P, Pamer EG. CD8 T cell responses to infectious pathogens. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:29-70.
168. Pardo J, Aguilo JI, Anel A, Martin P, Joeckel L, Borner C, et al. The biology of cytotoxic cell granule exocytosis pathway: granzymes have evolved to induce cell death and inflammation. *Microbes Infect*. 2009;11(4):452-9.
169. Lettau M, Schmidt H, Kabelitz D, Janssen O. Secretory lysosomes and their cargo in T and NK cells. *Immunol Lett*. 2007;108(1):10-9.
170. Brunner KT, Mauel J, Cerottini JC, Chapuis B. Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on 51-Cr-labelled allogeneic target cells in vitro; inhibition by isoantibody and by drugs. *Immunology*. 1968;14(2):181-96.
171. Barchet W, Oehen S, Klenerman P, Wodarz D, Bocharov G, Lloyd AL, et al. Direct quantitation of rapid elimination of viral antigen-positive lymphocytes by antiviral CD8(+) T cells in vivo. *Eur J Immunol*. 2000;30(5):1356-63.
172. Stowell SR, Karmakar S, Arthur CM, Ju T, Rodrigues LC, Riul TB, et al. Galectin-1 induces reversible phosphatidylserine exposure at the plasma membrane. *Mol Biol Cell*. 2009;20(5):1408-18.

173. Fischer K, Voelkl S, Berger J, Andreesen R, Pomorski T, Mackensen A. Antigen recognition induces phosphatidylserine exposure on the cell surface of human CD8+ T cells. *Blood*. 2006;108(13):4094-101.
174. He J, Baum LG. Presentation of galectin-1 by extracellular matrix triggers T cell death. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(6):4705-12.
175. Trambas CM, Griffiths GM. Delivering the kiss of death. *Nature immunology*. 2003;4(5):399-403.
176. Stinchcombe JC, Majorovits E, Bossi G, Fuller S, Griffiths GM. Centrosome polarization delivers secretory granules to the immunological synapse. *Nature*. 2006;443(7110):462-5.
177. Douek DC, Brenchley JM, Betts MR, Ambrozak DR, Hill BJ, Okamoto Y, et al. HIV preferentially infects HIV-specific CD4+ T cells. *Nature*. 2002;417(6884):95-8. Epub 2002/05/03.
178. Tenne-Brown J, Puche AC, Key B. Expression of galectin-1 in the mouse olfactory system. *Int J Dev Biol*. 1998;42(6):791-9.
179. McGraw J, Gaudet AD, Oschipok LW, Steeves JD, Poirier F, Tetzlaff W, et al. Altered primary afferent anatomy and reduced thermal sensitivity in mice lacking galectin-1. *Pain*. 2005;114(1-2):7-18.
180. Paushkin S, Gubitza AK, Massenet S, Dreyfuss G. The SMN complex, an assemblysome of ribonucleoproteins. *Curr Opin Cell Biol*. 2002;14(3):305-12.
181. Vyakarnam A, Dagher SF, Wang JL, Patterson RJ. Evidence for a role for galectin-1 in pre-mRNA splicing. *Mol Cell Biol*. 1997;17(8):4730-7.
182. Ilarregui JM, Croci DO, Bianco GA, Toscano MA, Salatino M, Vermeulen ME, et al. Tolerogenic signals delivered by dendritic cells to T cells through a galectin-1-driven immunoregulatory circuit involving interleukin 27 and interleukin 10. *Nature immunology*. 2009;10(9):981-91. Epub 2009/08/12.
183. Camby I, Le Mercier M, Lefranc F, Kiss R. Galectin-1: a small protein with major functions. *Glycobiology*. 2006;16(11):137R-57R. Epub 2006/07/15.