

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA**

**CESAR AUGUSTO SPECK HERNANDEZ**

**Importância da proteína quinase ativada por AMP (AMPK) na regulação da  
sinalização do TGF- $\beta$  e diferenciação das células T reguladoras**

**Ribeirão Preto**

**2021**

**CESAR AUGUSTO SPECK HERNANDEZ**

**Importância da proteína quinase ativada por AMP (AMPK) na regulação da  
sinalização do TGF- $\beta$  e diferenciação das células T reguladoras**

Teses apresentada ao Programa de Pós-graduação em  
Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de  
Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, para  
obtenção do título de Doutor em filosofia.

Área de Concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Orientador: Prof. Dr. José Carlos Farias Alves Filho

**Ribeirão Preto**

**2021**

**AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.**

### **Catlogação da Publicação**

Speck-Hernandez, Cesar

Importância da proteína quinase ativada por AMP (AMPK) na regulação da sinalização do TGF- $\beta$  e diferenciação das células T reguladoras 120f.: il.

Teses de doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

1. Células T reguladoras (Tregs).
2. Foxp3.
3. Ampk $\alpha$
4. Fosforilação.
5. Glicosilção
6. Tumor

## **APOIO E SUPORTE FINANCEIRO**

---

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Inflamação e Dor associado ao Centro de Pesquisa de Doenças Inflamatórias (CRID), localizado no Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), da Universidade de São Paulo (USP), com o apoio ou suporte financeiro das seguintes instituições:

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do São Paulo (FAPESP) por meio do Projeto Individual Processo 2018/23168-8;
  - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do São Paulo (FAPESP) por meio do Projeto CEPID 2013/08216-2;
  - CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil
  - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001
  - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP – USP.
-

Nome: SPECK-HERNANDEZ, Cesar

Título: Importância da proteína quinase ativada por AMP (AMPK) na regulação da sinalização do TGF- $\beta$  e diferenciação das células T reguladoras

Teses apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências;

Aprovada em: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

*Dedico este trabalho a minha  
família, porque sem eles me  
apoiando desde a distância seria  
impossível conseguir isto.*

## **AGRADECIMENTOS**

Meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas que conheci ao longo destes seis anos no Brasil e que direta o indiretamente participaram da realização deste trabalho.

Agradeço a minha família por todo o apoio que desde a Colômbia deram para mim, sempre dispostos a escutar e aconselhar. Todos meus sucessos são graças a eles.

Agradeço ao Professor Jose Carlos Alves Farias Filho por ter me orientado ao longo desses 4 anos, através das longas discussões me ensino o importante do pensamento crítico e experimental.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) por proporcionar todas as condições necessárias para a realização deste trabalho.

Meu agradecimento as agencias financiadoras: O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, e com o apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil. Agradeço também à FAPESP (Projeto CEPID 2013/08216-2) e projeto individual (Processo 2018/23168-8) pelo fomento que possibilitou a realização desse projeto.

Agradeço à secretária do Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada, a Sra. Ana Cristine, por toda sua disposição para ajudar. Agradeço também aos docentes e funcionários do Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada da FMRP pelos conhecimentos a mim repassados e contribuição para minha formação.

Agradeço a todos os membros do Laboratório do Imunometabolismo e Imunoregulação que ao longo desses anos me ensinaram, ajudaram e me apoiaram em todos os experimentos e discussões. Agradeço também a todo os colegas do laboratório de Inflamação e Dor pelas convivências diárias, conversas e experiencias. Agradeço aos técnicos de laboratório de Inflamação e Dor pelo apoio logístico ao longo desses anos.



A vida é uma sucessão contínua de oportunidades.

Gabriel García Márquez

## RESUMO

SPECK-HERNANDEZ, Cesar. (2021). ***Importância da proteína quinase ativada por AMP (AMPK) na regulação da sinalização do TGF- $\beta$  e diferenciação das células T reguladoras.*** Teses de Doutorado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

As células T reguladoras (Tregs) são componentes cruciais da manutenção da imunotolerância periférica e modulação da resposta inflamatória crônica. O fator de transformação do crescimento beta (TGF- $\beta$ ) é uma das citocinas responsáveis pela diferenciação das Tregs induzindo a expressão do fator de transcrição FOXP3, o qual é considerado o principal regulador dos genes associados a diferenciação e função destas células. A proteína quinase ativada por AMP (AMPK) é um sensor do estado metabólico celular que é ativada quando ocorre um aumento da razão de AMP/ATP intracelular. Através da fosforilação de proteínas alvo, a AMPK promove a inibição de vias anabólicas, como sínteses de proteínas, e estimulação de vias catabólicas, como a glicólise, restaurando o equilíbrio metabólico. Interessantemente, a AMPK também regula vias de sinalização que não estão diretamente associadas com o metabolismo energético. Neste contexto, foi demonstrado em fibroblastos que a AMPK inibe a via de sinalização do TGF- $\beta$  por fosforilar proteínas do complexo de Smads bloqueando a sua translocação para o núcleo. Por esse motivo, nós investigamos qual é o papel de AMPK $\alpha$  na diferenciação de células Tregs. Após o tratamento com o TGF- $\beta$  a atividade de AMPK $\alpha$  é reduzida significativamente, promovendo assim uma maior expressão de Foxp3 e posterior diferenciação de Tregs. A deleção específica de AMPK $\alpha$  nas células T potencia a via de sinalização do TGF- $\beta$  aumentando a fosforilação dos Smad2/3 e, portanto, a expressão de Foxp3. As células Tregs deficientes para AMPK $\alpha$  não somente diferenciam mais, senão a sua vez produzem mais moléculas de supressão. Essas células estão acompanhadas de alterações metabólicas caracterizadas pela diminuição do metabolismo glicolítico, aumento da respiração e atividade mitocondrial, aumento da glicosilação de proteínas, e uma menor proliferação. As células Tregs deficientes para AMPK $\alpha$  são estáveis e funcionais, e num modelo de desenvolvimento tumoral demonstraram gerar um ambiente de imunossupressão que favorece o crescimento tumoral. Esses resultados em conjunto mostram que a diferenciação das células Tregs depende de um balanço energético que vai controlar as necessidades das células a partir dos sinais moléculas que as ativam.

**Palavras-Chave:** Células T reguladoras (Tregs), Foxp3, Ampk $\alpha$ , Fosforilação, Glicosilação, Crescimento Tumoral

## ABSTRACT

SPECK-HERNANDEZ, Cesar. (2021). *Importance of AMP-activated protein kinase (AMPK) in the regulation of TGF- $\beta$  pathway and T regulatory cells differentiation*. Teses de Doutorado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Regulatory T cells (Tregs) are crucial components in maintaining peripheral immunotolerance and modulating the chronic inflammatory response. The transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) is one of the cytokines responsible for the differentiation of Tregs, inducing the expression of the transcription factor FOXP3, which is considered the main regulator of genes associated with the differentiation and function of these cells. The AMP-activated protein kinase (AMPK) is a sensor of the cellular metabolic state that is activated when there is an increase in the intracellular AMP/ATP ratio. Through phosphorylation of target proteins, AMPK promotes the inhibition of anabolic pathways, such as protein synthesis, and stimulation of catabolic pathways, such as glycolysis, restoring metabolic balance. Interestingly, AMPK also regulates signaling pathways that are not directly associated with energy metabolism. In this context, it was demonstrated in fibroblasts that AMPK inhibits the TGF- $\beta$  signaling pathway by phosphorylating Smads complex proteins, blocking their translocation to the nucleus. For this reason, we investigated the role of AMPK $\alpha$  in Treg cell differentiation. After treatment with TGF- $\beta$ , AMPK $\alpha$  activity was reduced, promoting Foxp3 expression and subsequent Treg differentiation. The specific deletion of AMPK $\alpha$  in T cells potentiates the TGF- $\beta$  signaling pathway by increasing Smad2/3 phosphorylation and further increasing Foxp3 expression. AMPK $\alpha$ -deficient Treg cells not only differentiate more, but in turn produce more suppressor molecules. These cells are accompanied by metabolic changes that are characterized by decreased glycolytic metabolism, increased respiration and mitochondrial activity, increased protein glycosylation, and less proliferation. AMPK $\alpha$ -deficient Treg cells are stable and functional, and in a tumor development model, they have been shown to generate an immunosuppressive environment that favors tumor growth. These results together show that the differentiation of Treg cells depends on an energy balance that will control the needs of the cells based on the molecule signals that activate them.

**Keywords:** T regulatory cells (Tregs), Foxp3, AMPK $\alpha$ , Phosphorylation, Glycosylation, Tumor Growth

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Fatores necessários para a diferenciação de células tTreg .....	<b>22</b>
<b>Figura 2.</b> Mecanismos moleculares que iniciam a transcrição do gene Foxp3.....	<b>24</b>
<b>Figura 3.</b> Mecanismos de supressão usados pelas células Tregs .....	<b>27</b>
<b>Figura 4.</b> Características estruturais do trimero AMPK com seus respectivos ativadores .....	<b>30</b>
<b>Figura 5.</b> Principais alvos de fosforilação e processos metabólicos regulados por parte de AMPK .....	<b>32</b>
<b>Figura 6.</b> Estrutura funcional do complexo mTOR .....	<b>35</b>
<b>Figura 7.</b> Fluxo de nutrientes através da via das hexosaminas que culmina com a O- Glcnaçiação de proteínas .....	<b>37</b>
<b>Figura 8.</b> Papel supressor das Tregs no microambiente tumoral .....	<b>39</b>
<b>Figura 9.</b> Efeito do tratamento com TGF- $\beta$ sobre a fosforilação de AMPK $\alpha$ em células T naive .....	<b>53</b>
<b>Figura 10.</b> Geração de camundongos knockout condicionais para AMPK nas células CD4 .....	<b>54</b>
<b>Figura 11.</b> A deleção gênica de AMPK nas células T CD4 não altera a frequência de linfócitos T CD4, CD8 e populações de Treg natural em condições de homeostasia .....	<b>55</b>
<b>Figura 12.</b> A deleção gênica de AMPK aumenta a diferenciação de linfócitos para um perfil T regulador .....	<b>56</b>
<b>Figura 13.</b> Células TREG deficientes de AMPK apresentam uma maior produção de moléculas de supressão CTLA4 e PDL1.....	<b>57</b>
<b>Figura 14.</b> A deficiência de AMPK nas células Treg não afeta a produção de IFN $\gamma$ .....	<b>58</b>
<b>Figura 15.</b> A ativação alostérica de AMPK $\alpha$ pelo composto A769662 inibe a diferenciação de células Tregs .....	<b>60</b>
<b>Figura 16.</b> A deficiência de AMPK nas células Treg aumenta a atividade de vias de sinalização de importância nas células Tregs .....	<b>61</b>
<b>Figura 17.</b> Células Treg deficientes para AMPK $\alpha$ proliferam menos em resposta ao TGF- $\beta$ .....	<b>63</b>
<b>Figura 18.</b> Células Treg deficientes para AMPK $\alpha$ tem uma reprogramação metabólica da glicólises para fosforilação oxidativa .....	<b>65</b>
<b>Figura 19.</b> Proporção de células Foxp3 em diferentes órgãos linfoides .....	<b>66</b>

<b>Figura 20.</b> Expressão de marcadores de supressão por parte de células Foxp3 deficientes para AMPK $\alpha$ .....	<b>67</b>
<b>Figura 21.</b> Células nTreg deficientes para AMPK $\alpha$ apresentam uma redução na atividade do mTOR acompanhado de um incremento na glicosilação de proteínas	<b>68</b>
<b>Figura 22.</b> Células nTreg deficientes para AMPK $\alpha$ apresentam uma redução em seu metabolismo glicolítico .....	<b>69</b>

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1.</b> Principais moléculas de superfície com função supressora das células Treg.....	<b>28</b>
---	-----------

## LISTA DE ABREVIATURAS

Kb: kilobases

Pb: pares de bases

kDa: kilodaltons

G: guanina

A: adenina

C: citosina

T: timina

N: qualquer base nitrogenada

°C: graus Celsius

cm<sup>2</sup>: centímetros quadrados

mL: mililitro

μl: microlitro

g: gravidade

μg: micrograma

V: volts

Ms: milissegundo

~: aproximadamente

ng: nanograma

5': extremidade cinco linha em ácidos nucleicos

3': extremidade três linha em ácidos nucleicos

X: vezes

mM: milimolar

μM: micromolar

U: unidade

aa: aminoácido

G: glicina

P: prolina

K: lisina

A: alanina

>: maior

<: menor

## LISTA DE SIGLAS

**Tregs:** células T reguladoras

**APECED** (*Autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy*):

**tTreg:** células T reguladoras timicas

**TCR:** Receptor de células T

**cTEC:** células timicas corticais

**MHC:** Complexo de maior de histocompatibilidade

**mTEC:** células timicas medulares

**VAT:** Tregs residentes do tecido adiposo visceral,

**MHC-II:** complexo principal de histocompatibilidade classe II

**TGF- $\beta$**  Fator de crescimento transformante beta

**ATP** Adenosina trifosfato

**ADP** Adenosina difosfato

**AMP** Adenosina Monofosfato

**DN:** Duplo negativo

**DP:** Duplo positivo

**SP:** Simples Positivo

**APC:** Células apresentadoras de Antígenos

**AMPK:** Proteína quinase ativada por AMP

**mTOR:** mammalian target of rapamycin

**HIF1A:** Hypoxia Inducible Factor 1 Subunit Alpha

**GlcNac:** N-acetilglucosamina

**TME:** Microambiente Tumoral

**ECAR:** Extracellular acidification rate

**OCR:** Oxygen consumption rate

**qRT-PCR:** Reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa

**CT:** Controle

**WT:** Wildtype

**KO:** Knockout

**IFN- $\gamma$ :** Interferon Gamma

**CTV:** Cell Trace Violet



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>19</b>
1.1. AS CELULAS T REGULADORAS (Tregs) .....	<b>20</b>
1.1.1. Diferentes subclasses de células T reguladoras .....	<b>21</b>
1.1.1.2. Células Treg naturais tímicas (tTreg).....	<b>21</b>
1.1.1.3. Células Tregs Periféricas (pTreg) .....	<b>22</b>
1.1.1.4. Células Tregs Induzidas (iTregs) .....	<b>24</b>
1.1.1.5. Células Tregs Teciduais	
1.1.2. Mecanismos de supressão das células T reguladoras .....	<b>26</b>
1.2. IMPORTANCIA DO METABOLISMO NA FUNÇÃO DAS TREGs.....	<b>29</b>
1.2.1. A Proteína quinase ativada por AMP (AMPK) .....	<b>29</b>
1.2.2. AMPK e metabolismo celular .....	<b>31</b>
1.2.3. AMPK e células T.....	<b>33</b>
1.2.4. mTOR e células Tregs .....	<b>34</b>
1.2.5. A via das Hexosaminas e as Tregs.....	<b>36</b>
1.3. CÉLULAS TREGS E DESENVOLVIMENTO TUMORAL.....	<b>38</b>
<b>2. HIPÓTESE</b> .....	<b>40</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>42</b>
3.1. OBJETIVO GERAL .....	<b>43</b>
3.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS .....	<b>43</b>
<b>4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL</b> .....	<b>44</b>
<b>5. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>46</b>
5.1. ANIMAIS .....	<b>47</b>
5.2. FERRAMENTA FARMACOLÓGICA.....	<b>47</b>
5.3. SEPARAÇÃO DE CÉLULAS T NAIVE E iTREGS .....	<b>47</b>
5.4. DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS T EFETORAS E CÉLULAS T REGULADORAS IN VITRO.....	<b>48</b>
5.5. ENSAIO DE ATIVIDADE METABÓLICA: SEAHORSE.....	<b>49</b>
5.6. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA .....	<b>49</b>
5.7. AVALIAÇÃO PROTEICA POR IMUNOBLOTTING .....	<b>50</b>
5.8. ELISA.....	<b>50</b>
5.9. CITOMETRIA DE FLUXO .....	<b>51</b>
5.10. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	<b>51</b>
<b>6. RESULTADOS</b> .....	<b>52</b>
6.1. O TRATAMENTO COM TGF- $\beta$ REDUZ A ATIVIDADE DE AMPK $\alpha$ NAS CÉLULAS T AO MESMO TEMPO QUE AUMENTA A ATIVIDADE DE SMAD 2/3. ....	<b>53</b>
6.2. GERAÇÃO DOS ANIMAIS AMPK <sup>fl/fl</sup> CD4 <sup>Cre/0</sup> .....	<b>54</b>
6.3. AUSENCIA DE AMPK $\alpha$ NÃO ALTERA A FREQUÊNCIA DE CELULAS CD4, CD8 OU TREG EM CONDIÇÕES DE HOMEOSTASIA.....	<b>55</b>

6.4.	A DELEÇÃO GÊNICA DE AMPK $\alpha$ EM CELULAS T CD4 NAIVES TRATADAS COM TGF- $\beta$ INDUZ UMA MAIOR PRODUÇÃO DE FOXP3 .....	56
6.5.	CÉLULAS TREG DIFERENCIADAS NA AUSÊNCIA DE AMPK $\alpha$ PRODUZEM MAIS CTLA4 E PDL1 QUE AS CÉLULAS CONTROLE .....	57
6.6.	CÉLULAS TREG DIFERENCIADAS NA AUSÊNCIA DE AMPK $\alpha$ NÃO APRESENTAM DIFERENÇAS NA PRODUÇÃO DE INTERFERON GAMMA (IFN $\gamma$ ) .....	58
6.7.	A ATIVAÇÃO ALOSTÉRICA DE AMPK $\alpha$ INIBE A DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS TREGS .....	59
6.8.	CÉLULAS TREG DIFERENCIADAS NA AUSÊNCIA DE AMPK $\alpha$ APRESENTAM MAIOR ATIVIDADE EM ALGUMAS VIAS DE IMPORTÂNCIA PARA AS TREGS .....	60
6.9.	CELULAS TREG DIFERENCIADAS NA AUSENCIA DE AMPK $\alpha$ PROLIFERAM MENOS .....	62
6.10.	CÉLULAS TREG DEFICIENTES PARA AMPK $\alpha$ APRESENTAM UMA REPROGRAMAÇÃO METABÓLICA DE GLICOLISE PARA FOSFORILAÇÃO OXIDATIVA .....	63
6.11.	A DELEÇÃO ESPECÍFICA DE AMPK $\alpha$ NAS CÉLULAS NTREG NÃO AFETA A PROPORÇÃO DE CÉLULAS TREGS NOS DIFERENTES ORGÃOS LINFÓIDES .....	65
6.12.	CÉLULAS NTREG DEFICIENTES PARA AMPK $\alpha$ EXPRESSAM MAIS MARCADORES DE SUPRESSÃO E ATIVAÇÃO .....	66
6.13.	CÉLULAS NTREG DEFICIENTES PARA AMPK $\alpha$ APRESENTAM UMA MENOR ATIVAÇÃO DA VIA DO MTOR E UMA MAIOR GLICOSILAÇÃO DE PROTEÍNAS .....	68
6.14.	CÉLULAS NTREG DEFICIENTES PARA AMPK $\alpha$ APRESENTAM UMA REDUÇÃO DA VÁRIAS ENZIMAS ASSOCIADAS A VIA GLICOLÍTICA .....	69
7.	<b>DISCUSSÃO</b> .....	71
8.	<b>CONCLUSÃO</b> .....	85
9.	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</b> .....	87

## *1. INTRODUÇÃO*

---

### **1.1. AS CELULAS T REGULADORAS (Tregs)**

O sistema imune tem evoluído com o objetivo de se defender de modo mais eficaz contra as diferentes ameaças externas como vírus, bactérias ou parasitas. Ao mesmo tempo que o sistema imune precisa gerar uma resposta efetiva e específica contra essas ameaças, ele precisa evitar que ocorra uma exacerbação das respostas inflamatórias que possam ser muito prejudiciais para o hospedeiro (Schwartz, 2012). Nesse contexto, o sistema imune conta com sistemas de regulação adicionais que mantêm a homeostase e evitam que a inflamação possa sair de controle e leve a efeitos adversos onde o próprio sistema imune ataque suas próprias células, como acontece nas doenças autoimunes (Rosenblum et al., 2015).

Entre os principais mecanismos de regulação, encontra-se a ação de um subtipo especial de células T CD4 conhecidas como células T regulatórias (Tregs). As Tregs são as principais células encarregadas da manutenção da tolerância periférica, controlando as respostas inflamatórias e prevenindo o desenvolvimento de doenças autoimunes como Artrite Reumatoide ou Lúpus Eritematoso Sistêmico (Vignali et al., 2008). As Treg se diferenciam das células T naïve a partir da expressão do fator de transcrição Foxp3, o qual é necessário para seu adequado desenvolvimento, manutenção e função (M. O. Li & Rudensky, 2016).

O descobrimento da importância das células Tregs começou quando se identificou que mutações no gene de Foxp3 em humanos trazem como consequência o desenvolvimento de uma doença autoimune poliglandular conhecida como APECED (Laakso et al., 2010). Do mesmo modo que tem sido observado que em modelos animais a deficiência na produção de Foxp3 ou qualquer dos fatores de transcrição que participam na sua expressão transcricional desencadeiam uma síndrome imunoproliferativa letal, conhecida como fenótipo scurfy (Ramsdell & Ziegler, 2014).

Portanto, a diferenciação e função das células Tregs é dependente da expressão do gene Foxp3, o qual é derivado da ativação de vários sinais celulares que envolvem coordenadas cascatas de fosforilação e indução de várias proteínas e fatores de transcrição (Colamatteo et al., 2020; Cortez et al., 2020).

### **1.1.1. Diferentes subclasses de células T reguladoras**

Dependendo do local, tecido ou citocina presente no meio, as células Tregs podem se diferenciar em subclasses que apresentam características fenotípicas particulares que afetam sua função.

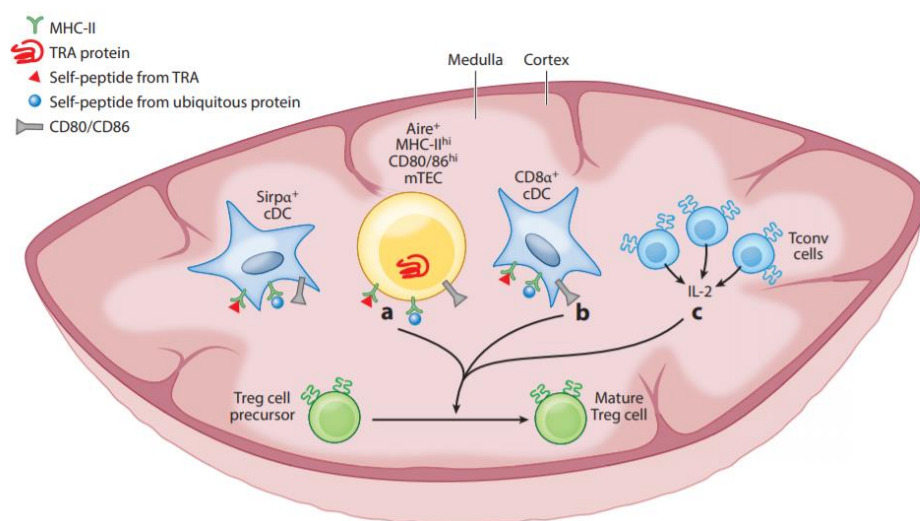
#### **1.1.1.2. Células Treg naturais tímicas (tTreg)**

Um dos principais órgãos imunes primários é o Timo. É nele onde acontece um dos processos mais importantes da imunidade adaptativa, a seleção tanto positiva como negativa das células T (Zdrojewicz et al., 2016). As células T Duplo Positivas (CD4+CD8+) geradas na medula óssea migram até o timo onde passam por dois tipos de seleção a partir da afinidade que seu TCR específico tenha com o antígeno. Em primeiro lugar, acontece a seleção positiva de células T. Está se encontra sob o comando das células tímicas corticais ou cTECs, as quais expressam tanto MHC de classe I como II e apresentam antígenos para as células T duplo positivas. Desse modo, se uma célula apresenta maior afinidade por MHC de classe I, vai se diferenciar numa célula T CD8 ou citotóxica, ou se sua afinidade é pelo MHC II, a mesma vai se diferenciar numa célula T CD4 ou helper (Klein et al., 2014).

Em segundo lugar, acontece a seleção negativa das células T, que é responsável da tolerância central. As células medulares tímicas ou mTEC são as protagonistas dessa etapa e sua função é expressar uma diversa quantidade de antígenos próprios e apresentar para as células T CD4. Se uma célula T interage com muita afinidade com esses antígenos próprios, ela é catalogada como auto reativa e é eliminada por apoptoses (Laan & Peterson, 2013; L. Sun et al., 2013). As células que não reagem contra antígenos próprios podem migrar para periferia para exercer suas funções efetoras, enquanto que aquelas células que reagem com uma afinidade intermediária são consideradas como as precursoras das células Treg tímicas ou tTreg (Y. Shi & Zhu, 2013).

As células Tregs no timo são diferenciadas a partir de células progenitoras (CD25+Foxp3lo) que respondem a 3 sinais específicos (Figura 1): 1) Ativação via TCR entre a célula e o MHC da célula mTEC; 2) Um sinal de ativação via CD28 mediada pelo CD80 ou CD86; 3) Suprarregulação de CD25 via ativação por IL-2 (Owen et al., 2019; Savage et al., 2020).

Análises de transcriptoma de células Treg progenitoras e células Treg diferenciadas demonstram que após a ativação pela IL-2 se inicia um complexo sistema transcricional que inclui a ativação de vários fatores de transcrição, tais como Eos, IRF4, Satb1, Lef1 and GATA-1, os quais atuam em conjunto para a indução da expressão de Foxp3 (Cortez et al., 2020; W. Fu et al., 2012; Schumann et al., 2020). O timo produz a maioria de células Treg presentes na periferia e essas células apresentam como característica principal a expressão de vários marcadores de superfície tais como CD25, CD62L, CD103 e CTLA4 (Maggi et al., 2005).



**Figura 1. Fatores necessários para a diferenciação de células tTreg.** (Fonte: Savage et al., 2020).

### 1.1.1.3. Células Tregs Periféricas (pTreg)

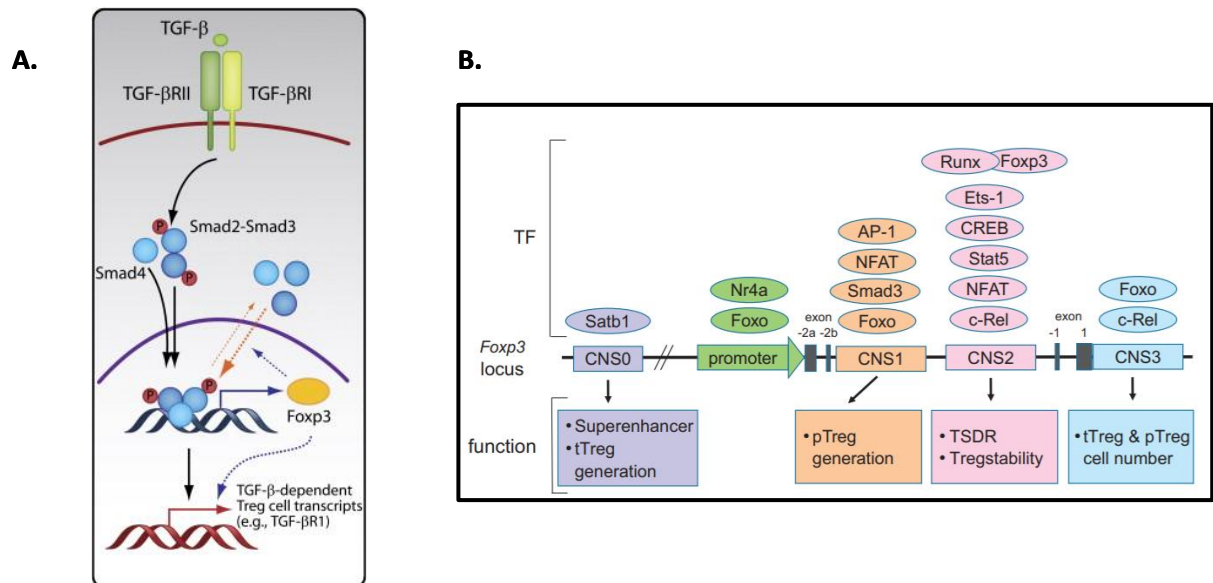
As células tTregs que migram do timo são importantes no controle das respostas inflamatórias contra antígenos próprios, porém na periferia o organismo se encontra altamente exposto também a outros tipos de antígenos não patogênicos como, por exemplo, aqueles derivados da comida que ingerimos, das bactérias comensais que habitam nosso intestino, ou ampla variedade de antígenos que inalamos da natureza, muitos dos quais podem causar as alergias. Além disso, o sistema imune também conta com uma população de células Tregs que podem ser induzidos na periferia e que, de igual maneira, são capazes de controlar respostas exacerbadas contra esses antígenos (H.-M. Lee et al., 2011). Existem diversos fatores que podem levar a indução de Tregs na periferia, mas o principal responsável dessa indução e

estabilidade de Foxp3 é o Fator de Crescimento Transformante ou TGF- $\beta$  (Kanamori et al., 2016).

A importância do TGF- $\beta$  para a diferenciação das células Tregs na periferia foi demonstrado no momento em que células T naive tratadas com essa citocina começam expressar Foxp3 e diferenciam para um perfil regulador (W. Chen et al., 2003). Essas células Tregs geradas a partir do estímulo com o TGF- $\beta$  possuem semelhança fenotípica e funcional às células tTregs (S. Fu et al., 2004). É importante ressaltar que camundongos que são deficientes para o receptor do TGF- $\beta$ RII apresentam uma redução significativa das células Treg periféricas, mas não das tímicas (Marie et al., 2005). Esses resultados em conjunto demonstram a importância que tem o TGF- $\beta$  na geração de células Tregs na periferia.

A sinalização da via do TGF- $\beta$ 1 (principal isoforma presente no sistema imune) inicia com a ligação da citocina a seu receptor específico TGF- $\beta$ RII (Figura 2A), o qual subsequentemente fosforila e ativa um segundo receptor TGF- $\beta$ RI (Tran, 2012). A ativação do complexo leva a fosforilação das proteínas Smad2 e Smad3, as quais são parte central e indispensável da sinalização (Tomohito Takimoto et al., 2010). Posteriormente, as proteínas Smad2 e Smad3 formam um complexo heterodimérico com Smad4, que migra para o núcleo e regula a transcrição de diversos alvos (Lu et al., 2009).

Adicionalmente, a ativação de Foxp3 via TGF- $\beta$  precisa da ação conjunta de outras proteínas como c-Rel, p65, NFAT e CREB que, junto aos Smad, vão formar um complexo chamado “enhanceosoma” (Figura 2B), que migram para o núcleo, ligam-se a CNS-1 do gene de Foxp3 e induzem sua expressão (Ruan et al., 2009). Apesar da importância do TGF- $\beta$  na indução de Foxp3, ele não é responsável pela transcrição total dos genes associados às respostas das células Tregs (Hill et al., 2007).



**Figura 2. Mecanismos moleculares que iniciam a transcrição do gene Foxp3.** A. Cascata de sinalização iniciada pelo TGF- $\beta$ . B. Fatores de transcrição que são necessários para transcrição do Foxp3. (Fonte: Lee & Lee, 2018)

#### 1.1.1.4. Células Tregs Induzidas (iTregs)

O fato de que as células T naive tratadas com TGF- $\beta$  expressarem tanto Foxp3 como outros marcadores fenotípicos das células Tregs permitiu o estudo das células Tregs *in vitro* (S. Fu et al., 2004). Essas células geradas *in vitro* recebem o nome de células Treg induzidas ou iTregs e seu estudo permitiu avançar no conhecimento dos mecanismos regulatórios que comandam as funções das células Tregs (Shevach & Thornton, 2014). Para a indução de Foxp3 em células T naive, é necessário a ativação via TCR por parte do CD3, um sinal de co-estimulação via CD28, e a presença da citocina IL-2 (Davidson et al., 2007). Essas células tem mostrado a capacidade de suprimir a proliferação de células T efetoras tanto *in vivo*, como *in vitro* (Huter et al., 2008).

Atualmente, existem alguns marcadores que permitem diferenciar as células tTreg geradas no timo daquelas geradas na periferia ou induzidas *in vitro* (Schmitt & Williams, 2013). Por um lado, está o fator de transcrição Helios, que tem sido mostrado como fator importante para estabilidade e função das células Tregs e que é expresso preferencialmente em células Tregs tímicas (Chougnet & Hildeman, 2016; Thornton et al., 2019). Por outro lado, o marcador de superfície Neuropilin 1 está altamente expresso nas células tímicas em comparação com as induzidas (M. Yadav et al.,



2012). Em conjunto, esses dois marcadores têm sido avaliados como os principais marcadores que diferenciam as células tímicas das periféricas ou induzidas (Singh et al., 2015).

#### **1.1.1.5. Células Tregs Teciduais**

A maior parte das células Tregs se encontra em circulação através dos principais órgãos linfoides, porém existem células Tregs especializadas que podem residir em tecidos específicos como o adiposo, musculo, pele ou intestino, e essas células apresentam características fenotípicas particulares (Lui et al., 2020). Entre os principais tipos de células Tregs teciduais, encontram-se as Tregs residentes do tecido adiposo visceral, conhecidas com VAT, as quais representa aproximadamente 40 % do total de células CD4 presentes nesse tecido. Essas células apresentam um perfil transcricional diferente das células nTreg presentes na periferia, com um significativo aumento de genes associados ao metabolismo lipídico entre eles o fator de transcrição PPAR $\gamma$  (Cipolletta et al., 2015). Essas células parecem ter um papel de relevância na regulação da homeostases do tecido adiposo, controle do metabolismo celular e supressão de respostas inflamatórias (C. Li et al., 2020).

Existe outro tipo de Tregs teciduais que se localizam no tecido musculoesquelético. Esse subtipo especial de Treg se acumula rapidamente em tecido musculoesquelético que apresenta algum dano ou lesão crônica e estimula a conversão de macrófagos pró-inflamatórios para um perfil anti-inflamatório, estimulando o reparo tecidual através da produção de anfiregulina (Burzyn et al., 2013). Essas células apresentam um perfil transcricional e repertório de TCR diferentes de suas outras contrapartes, e isso correlaciona também com uma maior produção de IL-33 e de seu receptor ST2 (Kuswanto et al., 2016).

A pele como o maior órgão do corpo também apresenta um enriquecimento de um tipo especial de Treg residente, a qual representa aproximadamente 90 % das células T CD4 presentes na pele, e sua função é vital para promover a tolerância contra ampla diversidade de antígenos próprios (Dudda et al., 2008) e microbiota (Scharschmidt et al., 2015) presentes nesse tecido. De maneira similar às outras subclasses de Tregs, essas células apresentam um perfil transcricional único, com uma maior expressão de receptores de quimiocinas específica da pele, assim como a expressão de anfiregulina

e IL-10, o que está relacionado a suas ações no reparo tecidual da pele lesionada (Boothby et al., 2020).

Por último é importante mencionar as células Tregs residentes no intestino. Elas representam de 15 a 40 % do total de células T CD4 no intestino e suas proporções estão diretamente relacionados a sua constante exposição contra microbiota ou antígenos derivados da dieta (Geuking et al., 2011). As Tregs presentes no intestino, lâmina própria ou colon podem derivar das nTregs tímicas e expressar preferencialmente o fator de transcrição GATA-3 e Helios ou se diferenciar diretamente na periferia, deixando de expressar Helios e começando a expressar ROR $\gamma$ t (Hegazy & Powrie, 2015). As tregs que residem no intestino são as principais responsáveis pela tolerância oral, pela tolerância a microbia mutualista e por controlar as respostas inflamatórias contra patógenos entéricos (Panduro et al., 2016).

Cada tipo de célula Treg apresenta características transcricionais, fenotípicas e funcionais diferentes e ainda são necessários mais estudos para entender quais são os mecanismos que controlam que uma célula Treg tenha preferência maior por um tecido particular que pelo outro (Panduro et al., 2016).

### **1.1.2. Mecanismos de supressão das células T reguladoras**

As células Tregs podem suprimir uma variedade de células imunes como as células B, as células NK, células NKT, células dendríticas e mieloides, assim como células T CD4 e CD8 (Schmidt et al., 2012). Existem vários mecanismos pelos quais as células Tregs podem suprimir as funções efetoras das células imunes (Figura 4). A maioria deles precisa do contato celular direto entre a célula Treg e a célula efetora (Thornton & Shevach, 1998).

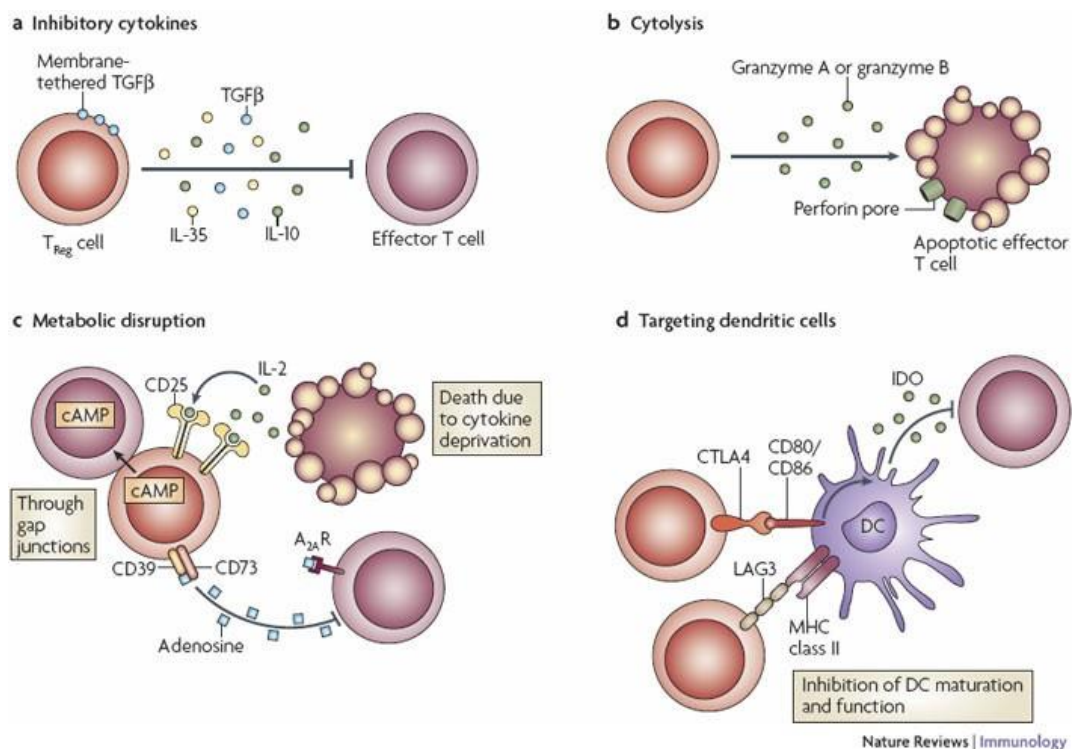
As células Treg podem suprimir as respostas imunes mediadas pelas células T através da secreção de citocinas imunossupressoras, tais como o TGF- $\beta$ , IL-10 ou IL-35, as quais podem transformar as células T efetoras em células Treg, como acontece no caso da citocina TGF- $\beta$ . De igual maneira, podem secretar algumas proteínas como a Galectina-1, a qual pode induzir apoptoses das células efetoras.

Outro mecanismo que as células Treg usam para suprimir a proliferação de células efetoras é a traves da super-expressão do receptor para IL-2 ou CD25, o qual compete

e sequestra a maior parte de IL-2 disponível e necessária para que as células T efetoras proliferem (Chinen et al., 2016; Thornton et al., 2004).

Adicionalmente, as Tregs expressam altos níveis das ectoenzimas de superfície CD39 e CD73. O CD39 medeia a degradação de ATP extracelular em AMP, enquanto o CD73 utiliza esse AMP para gerar adenosina. A degradação de ATP em AMP inibe a maturação de células dendríticas, enquanto que a adenosina enlaça ao receptor A<sub>2A</sub> das células efetoras inibindo sua proliferação (Antonioli et al., 2013).

Similar as células NK e células CD8, as Tregs podem secretar granzimas, as quais induzem apoptose de células T efetoras (Loebbermann et al., 2012). Finalmente, as células Tregs expressam várias moléculas de superfície que tem capacidade de inibir a maturação, ativação ou função de células específicas (Tabela 2). Entre as moléculas de supressão mais características, encontra-se, por exemplo, o CTLA4, o qual se liga diretamente ao receptor CD80 nas células DCs (Vandenborre et al., 1999). Outro exemplo é a molécula de superfície Lag3, que pode se ligar diretamente ao MHC de classe II, dessa forma evitando a ativação dessas células (Graydon et al., 2021).



**Figura 3. Mecanismos de supressão usados pelas células Tregs.** (Fonte: Vignali et al., 2008)

<b>Molécula de Superfície</b>	<b>Função</b>	<b>Referência</b>
<b>CD25</b>	Receptor para IL-2. Sequestra o IL-2 necessário para as células efectoras proliferarem. A alta expressão de CD25 correlaciona com uma maior atividade supressora.	(Chinen et al., 2016; Thornton et al., 2004)
<b>CTLA-4</b>	Se liga diretamente ao receptor CD80 nas células DCs inibindo sua ativação.	(Vandenborre et al., 1999)
<b>TIGIT</b>	Inibe as respostas das células T por se ligar ao ligando CD155 e, portanto, suprime a produção de IL-12 enquanto estimula a produção de IL-10	(Yu et al., 2009)
<b>PD1</b>	Os sinais inibitórios de PD-1 limitam a ativação das células Treg e sua capacidade supressora.	(Tan et al., 2021)
<b>PDL1</b>	A ligação de PD-L1 induz a expressão de IL-10 e promove a apoptose celular	(Diskin et al., 2020)
<b>LAP</b>	Tregs LAP + suprimem a proliferação de outras células T in vitro, mecanismo parcialmente mediado por TGF- $\beta$ e IL-10	(Gandhi et al., 2010)
<b>GITR</b>	Aumenta a proliferação de células T reguladoras CD4 + CD25 + Foxp3 + funcionalmente competentes	(Liao et al., 2010)
<b>GARP</b>	GARP é altamente expresso em Tregs ativadas e contribui para sua atividade supressora. GARP também promoveu a ativação e secreção do TGF- $\beta$	(Tran et al., 2009; Wang et al., 2008)
<b>ICOS</b>	A maioria das Tregs de camundongos expressa ICOS. Tregs ICOS+ possuem atividade supressiva superior do as negativas. Essas células têm forte capacidade supressora	(Burmeister et al., 2008)

**Tabela 1. Principais moléculas de superfície com função supressora das células Treg.**

A função e estabilidade das células Tregs são dependentes do microambiente no qual elas crescem, dado que elas são altamente susceptíveis a mudanças de estímulos, que podem afetar suas funções. Dessa forma, o metabolismo celular das células Treg sofre reprogramações metabólicas específicas beneficiam sua diferenciação, proliferação e ações supressoras.

## **1.2. IMPORTANCIA DO METABOLISMO NA FUNÇÃO DAS TREGs**

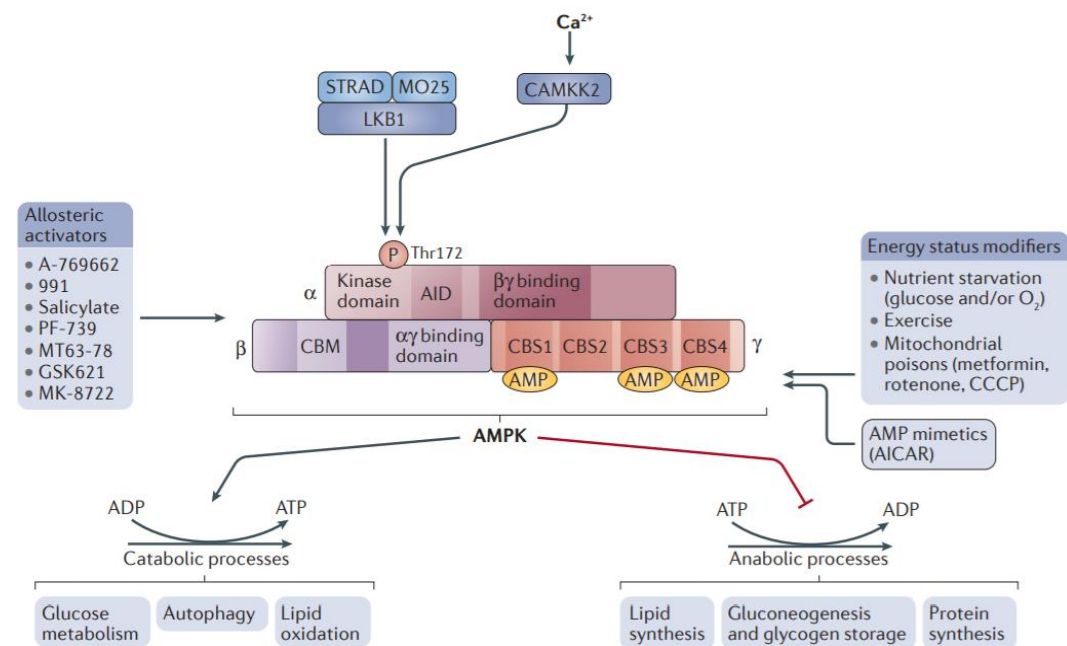
O Immunometabolismo tem como objetivo descrever quais são alterações nas diferentes vias metabólicas intracelulares que acontecem na célula após sua ativação (O'Neill et al., 2016). As células T passam por diferentes estados de ativação que requerem uma reprogramação metabólica que se ajuste a suas demandas funcionais (Shyer et al., 2020). Antes de se encontrar com algum antígeno, as células se mantem em estado quiescente e sem nenhuma função efetora ativa (Windt & Pearce, 2012). Nesse estado, as células captam pouca glicose e aminoácidos, ao mesmo tempo que dependem de um mínimo níveis de fosforilação oxidativa para manter os níveis de ATP estáveis (Salmond, 2018).

As células Treg, diferentemente das células T efetoras, precisam de uma reprogramação metabólica diferente. Enquanto que células T do tipo Th1, Th2 e Th17 são altamente glicolíticas, as células Tregs usam preferencialmente o metabolismo lipídico e a fosforilação oxidativa para suprir suas necessidades energéticas (Michalek et al., 2011). Novos achados têm demonstrado que as diferentes vias metabólicas podem ser importantes para a estabilidade e função das células Tregs.

### **1.2.1. A Proteína quinase ativada por AMP (AMPK)**

As células imunes respondem rapidamente a estímulos, passando de um estado quiescente a um estado ativo. Este processo envolve modificações em seu estado metabólico, de anabólico para um mais catabólico, com um maior consumo de nutrientes para produzir mais ATP e macromoléculas (Pearce & Pearce, 2013). Desse modo, todas as células precisam manter uma alta relação entre ATP e ADP para sobreviver (Santomauro Jún et al., 2008). Um regulador central desse balanço energético nas células é a proteína serina/treonina quinase ativada por AMP ou AMPK (Ma et al., 2017).

A AMPK é formada por um complexo heterodimérico que consiste de uma unidade catalítica alpha ( $\alpha$ ) e duas subunidades regulatórias beta e sigma ( $\beta$  e  $\gamma$ ) (Hardie et al., 2012). A ativação de AMPK se dá pela fosforilação do resíduo de treonina (Thr172) na subunidade catalítica  $\alpha$  por parte de várias quinases a montante como LKB1 (liver kinase B1) ou CaMKK $\beta$  (Stein et al., 2000; Willows et al., 2017). Essas quinases fosforilam AMPK como resposta a qualquer aumento intracelular de AMP, ADP ou Ca<sup>2+</sup>, ou quando existe produção de espécies reativas de oxigênio ou dano celular pela ação de agentes xenobióticos (Hardie et al., 2012).



**Figura 4. Características estruturais do trimero AMPK com seus respectivos ativadores.** (Fonte: Herzig & Shaw, 2018)

A importância de AMPK na regulação da homeostasia metabólica fez dessa enzima um alvo interessante no tratamento de doenças como diabetes ou câncer (J. Kim et al., 2016). Algumas drogas que induzem a ativação de AMPK já tem sido usada para o tratamento desses tipos de doenças. Por exemplo, a droga Metformina é umas das drogas antidiabéticas mais prescritas no mundo (Santomauro Jún et al., 2008). Metformina é um ativador clássico de AMPK, uma vez que bloqueia o complexo I da cadeia respiratória, levando a um aumento indireto da proporção AMP/ATP dentro da célula (Zhou et al., 2001). Por outro lado, AICAR (5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside) já foi descrita como um ativador direto de AMPK e tem sido usada como uma

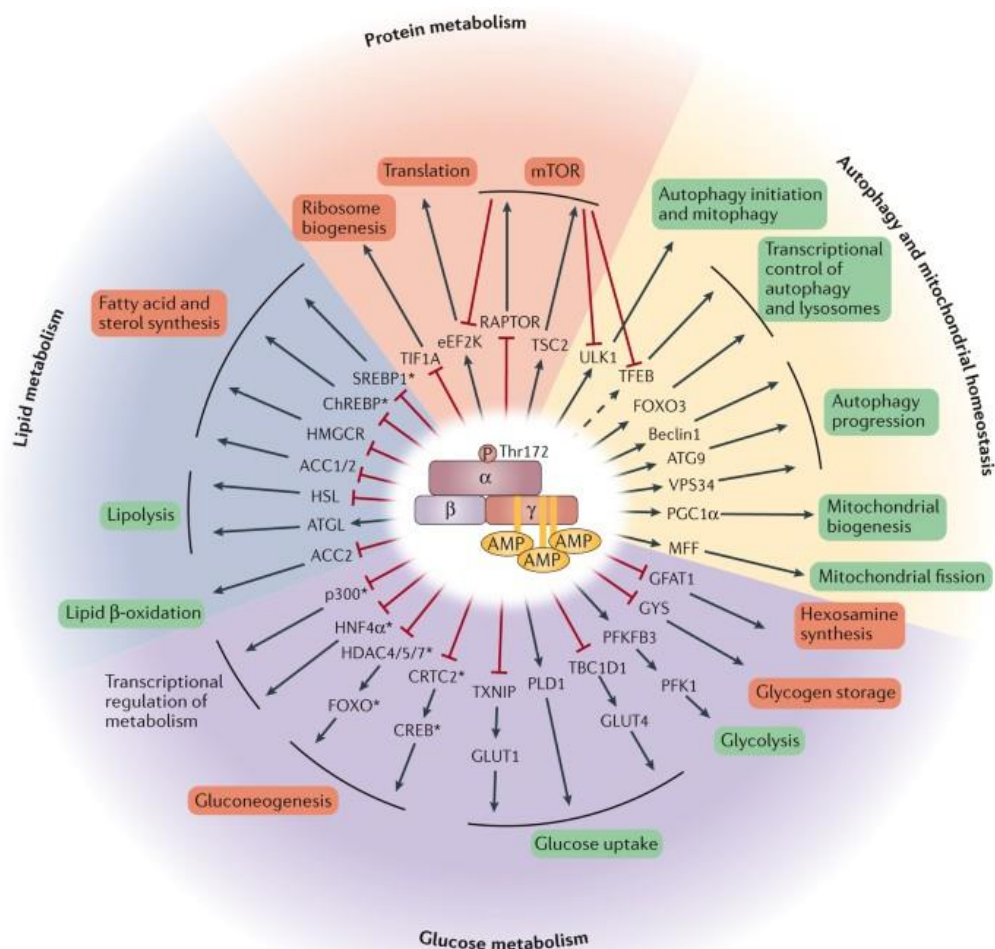
importante droga anti-inflamatória (Bai et al., 2010). AICAR é basicamente um análogo da adenosina, de tal modo que, quando ingressa na célula, leva a um incremento nos níveis de AMP intracelular (Sullivan et al., 1994).

### **1.2.2. AMPK e metabolismo celular**

AMPK é considerado um guardião da homeostase metabólica. Ele regula uma variedade de processos metabólicos (Figura 8). Por um lado, ele inibe vias anabólicas para minimizar o consumo de energia em forma de ATP, enquanto que ele estimula processos catabólicos para estimular a produção de energia (Herzig & Shaw, 2018). Por exemplo, ele inibe a síntese de lipídios através da fosforilação das acetil-coxilases ACC1 e ACC2 (Munday et al., 1988). Por outro lado, também inibe a síntese de glicogênio através da inibição das enzimas GYS1 e GYS2 (Bultot et al., 2012). Um importante alvo de fosforilação por parte de AMPK é a proteína SREBP-1 um regulador transcricional indispensável do metabolismo lipídico e glicolítico (Y. Li et al., 2011). Um dos mecanismos que AMPK preferencialmente usa para o controle do consumo excessivo de ATP é através da inibição do mTORC1 uma das subunidades do complexo mTOR (Gwinn et al., 2008). Sob condições ricas em nutrientes, AMPK é inativado, enquanto mTOR está ativo. Já em condições onde existe deficiência de energia, a atividade de AMPK leva a uma diminuição da atividade de mTOR (J. Kim et al., 2011).

AMPK promove o catabolismo de macromoléculas para produzir energia. Por um lado, ele estimula a utilização de glicose através da fosforilação de moléculas-chaves na captação e transporte de glicose. Por exemplo, AMPK fosforila as proteínas como TXNIP como a PLD1 o que leva a aumento na membrana dos transportadores de glicose GLUT1 e GLUT4 e, portanto, a uma maior captação de glicose (J. H. Kim et al., 2010; N. Wu et al., 2013). Adicionalmente, AMPK fosforila a enzima PFKFB3, a qual estimula significativamente a glicólise (Doménech et al., 2015). Por outro lado, AMPK também estimula o transporte e a beta-oxidação de lipídeos na mitocôndria através da fosforilação das enzimas ATGL e CPT1 (Ahmadian et al., 2011; John P Konhilas, 2015). Outros importantes alvos de fosforilação por parte de AMPK são as proteínas ACC1 e ACC2, cuja inibição reduz a síntese lipídica e aumenta a importação de lipídeos do citoplasma para mitocôndria (Fullerton et al., 2013)

AMPK também é importante para o metabolismo, estabilidade e função da mitocôndria. A biogênese mitocondrial acontece em resposta ao aumento do gasto energético e tem como objetivo aumentar a produção de ATP. O processo se caracteriza pelo crescimento e divisão da mitocôndria (Jornayvaz & Shulman, 2010). A ativação de AMPK tem sido correlacionada com um aumento da biogênese mitocondrial (Bergeron et al., 2001; Zong et al., 2002). O mecanismo pelo qual AMPK regula essa biogênese é a traves da fosforilação da proteína PGC1- $\alpha$ , a principal responsável pela biogênese mitocondrial (Jager et al., 2007; J. Lin et al., 2002). Em outro contexto, AMPK também pode promover a fissão ou fragmentação da mitocôndria sob estresse energético através da fosforilação das proteínas MFF (Toyama et al., 2016).



**Figura 5. Principais alvos de fosforilação e processos metabólicos regulados por parte de AMPK.** (Fonte: Herzig & Shaw, 2018)



### 1.2.3. AMPK e células T

As células imunes precisam mudar rapidamente seu metabolismo quando são ativadas. Por esse motivo, a disponibilidade de energia é um fator indispensável para a proliferação e para as funções efetoras das células T. Nesse sentido, AMPK é a enzima que controla o balanço energético das células T, se ativando rapidamente frente qualquer excesso ou falta de um intermediário metabólico (Blagih et al., 2015). Alguns trabalhos têm mostrado o papel dessa enzima nas funções efetoras das células T. Em primeiro lugar, foi demonstrado que a ausência de AMPK em células T CD8+ afeta suas capacidades antitumorais (Rao et al., 2015). Porém, em relação às células T reguladoras, os resultados são um pouco mais controversos. Por exemplo, foi visto que o uso de AICAR promove maior diferenciação de células T reguladoras, enquanto que bloqueia a diferenciação de células Th17 (Gualdoni et al., 2016). No entanto, recentemente foi observado que vários desses efeitos descritos até o momento com ativadores de AMPK, como AICAR ou outros agentes inibidores como o composto C sobre as células T, são consequências de efeitos independentes e indiretos do AMPK (Rao et al., 2016).

Vários trabalhos estabeleceram um papel importante da proteína LKB1 sobre a estabilidade, metabolismo e funções supressoras das células T reguladoras (Cully, 2017). LKB1 é uma das principais quinases a montante que fosforila AMPK (Lizcano et al., 2004). A ausência de LKB1 nas células FOXP3+ afeta seu fenótipo e suas capacidades supressoras, o que resulta no desenvolvimento de autoimunidade (He et al., 2017; D. Wu et al., 2017). A ausência de AMPK em células Foxp3 parece não ter efeito sobre o número de células T reguladoras *in vivo* e em condições homeostáticas (K. Yang et al., 2017). Porém, apesar da importância de AMPK no metabolismo de células T, ainda não existe um consenso claro na literatura sobre o papel de AMPK sobre a diferenciação das células T reguladoras (Barbi et al., 2013; Newton et al., 2016).

Adicionalmente, é interessante ressaltar que a AMPK tem sido descrito como um importante regulador negativo da via TGF- $\beta$ , uma vez que é capaz de inibir a formação do complexo smad2/3 (H. Lin et al., 2015). Anteriormente, foi falado sobre a importância da sinalização através da via do receptor para TGF- $\beta$  na diferenciação de

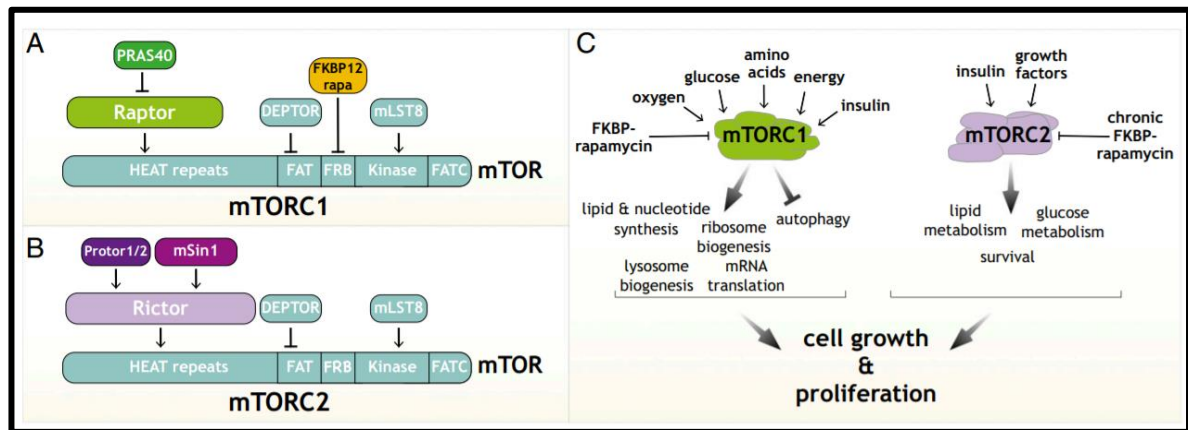
células T reguladoras na periferia (S. Fu et al., 2004). Nesse sentido, trabalhos em outros tipos celulares, como fibroblastos ou células musculares lisas, têm demonstrado que TGF- $\beta$  inativa AMPK durante a diferenciação dessas células (Pan et al., 2018; Thakur et al., 2015). Os potenciais mecanismos pelos quais AMPK inibe a sinalização de TGF- $\beta$  incluem a inibição da translocação de Smad4 ao núcleo (Zhao et al., 2015) ou a fosforilação e posterior inibição de algumas proteínas coativadoras do complexo, como p300 (J.-Y. Lim et al., 2012) ou Foxo1 (H. Yadav et al., 2017).

#### **1.2.4. mTOR e células Tregs**

A glicólise é uma forma de catabolismo que tem como função a obtenção rápida de energia disponível em forma de ATP a partir da glicose (Almeida et al., 2016). Após ativação, as células T efetoras usam a glicólise como principal fonte de energia (Dumitru et al., 2018). Porém, no que se refere às células T reguladoras, alguns trabalhos mostram que a inibição farmacológica da glicólise potencializa a diferenciação de células Tregs (Tanimine et al., 2019). Por outro lado, tem-se visto que a deleção de HIF1 $\alpha$ , um fator de transcrição indispensável para ativação da glicólise em condições de hipoxia, induz a polarização de células Tregs (L. Z. Shi et al., 2011). Nesse contexto, entra em ação um complexo de proteínas indispensável para a regulação metabólica das células T, conhecido como mTOR (Mammalian Target of Rapamycin).

O complexo mTOR emerge como um componente central dos mecanismos que regulam a diferenciação de células, integrando o metabolismo das células a sinais moleculares que as ativam (Waickman & Powell, 2012). O complexo mTOR foi descoberto em 1994 como o principal alvo do fúngico rapamicina (Sabatini et al., 1994). Depois de seu isolamento e caracterização, foi demonstrado que mTOR é indispensável para regular o crescimento e proliferação das células a partir da disponibilidade de nutrientes (D.-H. Kim et al., 2002). mTOR atua como a subunidade catalítica de dois complexos diferentes de proteínas, mTORC1 e mTORC2 (Figura 4), os quais respondem a diferentes sinais (Sabatini, 2017).

Após a ativação das células T via TCR, ocorre a indução da via de mTOR e, com isso, dois eventos principais são notados: enquanto mTOR promove a diferenciação de células T para seu perfil efetor (Th1, Th2 e Th17), inibe a diferenciação de células T reguladoras (Chi, 2012; Delgoffe et al., 2009). Porém, durante os últimos anos, vários trabalhos tem demonstrado que mTORC1 e mTORC2 tem diferentes papeis na função e estabilidade das células Tregs.



**Figura 6. Estrutura funcional do complexo mTOR.** A. Estrutura do complexo mTORC1. B. Estrutura do complexo mTORC2. C. Principais sinais de ativação do complexo mTOR (Fonte: Sabatini, 2017)

Alguns trabalhos mostram que o uso do fúngico rapamicina, que seletivamente inibe mTOR, potencializa a diferenciação de células Tregs através da reprogramação metabólica da glicólise para fosforilação oxidativa (Battaglia et al., 2006; Xuelu Chen et al., 2021). Porém, quando foram isoladas Tregs não ativadas e em estado enérgico, observou-se que essas células apresentam a via de sinalização de mTORC1 ativada (Procaccini et al., 2010). Adicionalmente, quando mTORC1 foi deletado de maneira específica nas células Tregs, observou-se que elas apresentavam uma deficiência na sua estabilidade e funções supressoras devido a alterações no seu metabolismo mitocondrial e lipídico (Chapman et al., 2018; Zeng et al., 2013). Nesse mesmo sentido, foi observado que células Treg ativadas e em estado de proliferação apresentam uma maior ativação de mTORC1 e que isto correlaciona com um perfil de célula mais glicolítica (Gerriets et al., 2016). Esses resultados mostram que mTORC1 é importante na fase de transição de inercia para ativação, controlando aspectos importantes tanto metabólicos como transcricionais das células Tregs.

Em relação a importância de mTORC2 na função e estabilidade das células Tregs, existe menos evidências. Sabe-se que um dos principais alvos de fosforilação de mTORC2 é a proteína AKT (Baffi et al., 2021). AKT forma um complexo de sinalização com a proteína PI3K cuja atividade antagoniza com a expressão de Foxp3 durante a diferenciação das células Tregs (Sauer et al., 2008). Na mesma linha, tem sido observado que mTORC1 pode inibir mTORC2 (Jhanwar-Uniyal et al., 2019). Esses dados indicam uma atividade antagônica entre os dois complexos dependendo da sinal que as ative. Por último, um estudo recente mostrou que, na ausência de Foxp3 nas células Tregs, existe uma atividade incrementada de mTORC2, o que correlaciona com uma atividade metabólica alterada nessas células e a perda de função das células Tregs (Charbonnier et al., 2019).

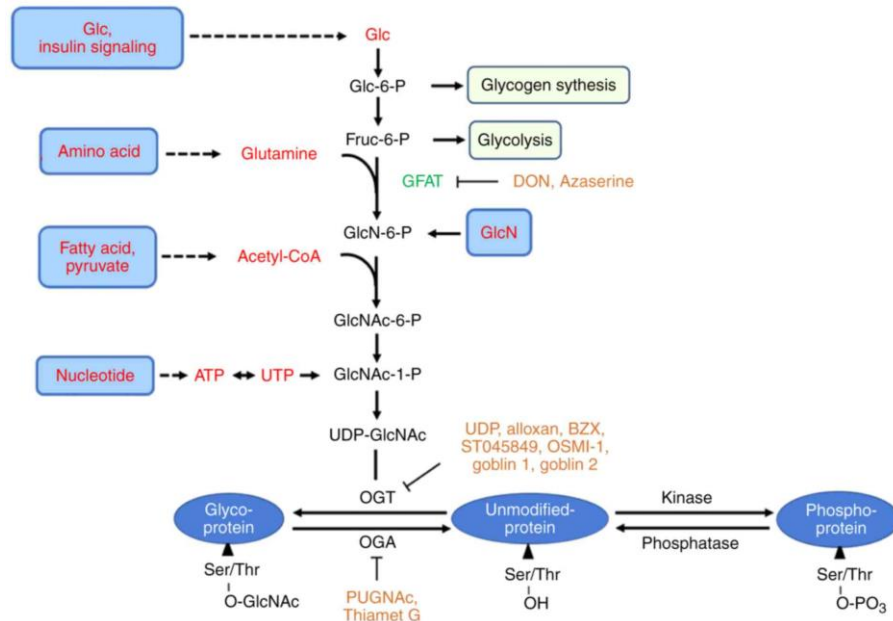
Então, as necessidades metabólicas das células Tregs dependem não somente da disponibilidade de nutrientes que existam no meio, quanto da ativação de diferentes complexos moleculares como mTOR. Nesse contexto, diferentes mecanismos de controle determinam qual é o balanço correto entre gasto e consumo (J. Xu et al., 2012).

#### **1.2.5. A via das Hexosaminas e as Tregs**

Dados ainda não publicados do nosso laboratório demonstram que o TGF- $\beta$ , em paralelo com a indução da fosforilação das proteínas Smad2/Smad3, também ativa uma via metabólica derivada da glicólise conhecida como a via das hexosaminas (HBP) (Melo, em revisão). Essa via metabólica culmina na síntese do metabólito UDP-N-acetil-D-Glucosamina (UDP-GlcNAc), o substrato da *O-Linked N-Acetylglucosamine (GlcNAc) Transferase* (OGT) (D. C. Love & Hanover, 2005). A O-GlcNAcilação é um tipo de glicosilação, na qual uma molécula de UDP-GlcNAc é inserida nas hidroxilas dos resíduos de serina (Ser) e treonina (Thr) de proteínas intracelulares pela enzima OGT, um mecanismo de modificação pós-traducional regulatório semelhante a fosforilação (Zachara & Hart, 2006).

A O-GlcNAcilação é dependente do fluxo e da disponibilidade de nutrientes, principalmente glicose, glutamina, acetyl-CoA e UTP, importantes intermediários para a sínteses de UDP-GlcNAc (Hanover et al., 2012). A enzima GFAT (Glutamine:fructose-6-phosphate amino transferase), encarregada de transformar a

frutose 6-fosfato em glucosamina 6-fosfato, é o principal limitante de substrato para OGT (Gélinas, Dontaine, et al., 2018). GFAT é altamente conservada e apresenta duas isoformas derivadas de dois diferentes genes e com relativa expressão em vários tecidos (Oki et al., 1999).



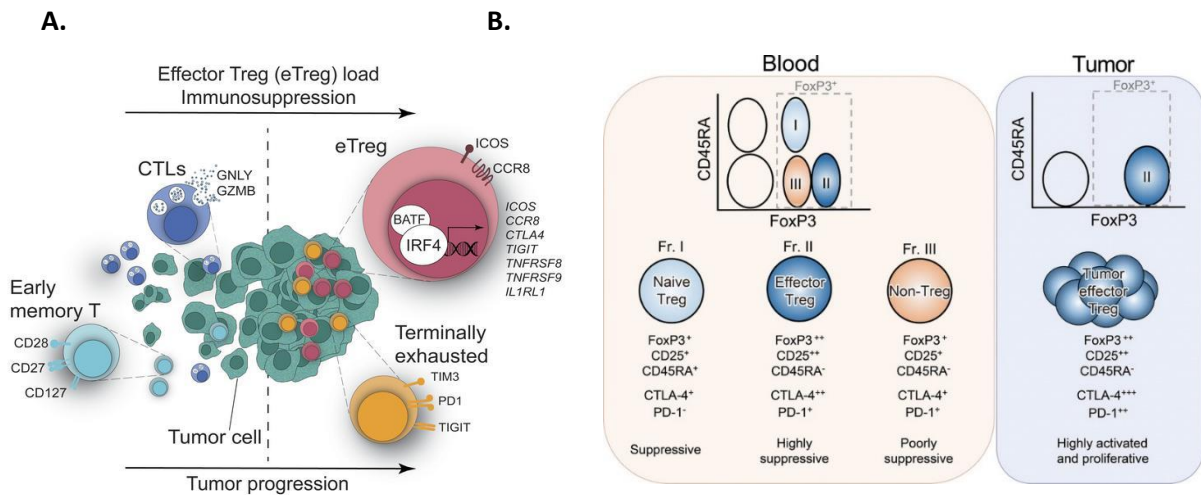
**Figura 7. Fluxo de nutrientes através da via das hexosaminas que culmina com a O-GlcNacilação de proteínas.** (Y. Li et al., 2019)

Tendo em consideração que tanto OGT como AMPK modificam de igual forma resíduos de treonina/serina nas proteínas, eles podem atuar conjunta ou opostamente sobre a regulação das mesmas proteínas. Isto estabelece um interessante *crosstalk* entre fosforilação e O-GlcNAcilação (Copeland et al., 2008). Atualmente, é conhecido que OGT pode O-GlcNAcilar AMPK regulando sua atividade quinase, assim como AMPK também pode fosforilar OGT, impedindo que ela ative seus alvos (Bullen et al., 2014; Q. Xu et al., 2014). Por outro lado, a ausência de OGT pode levar a um aumento da glicose disponível e a uma maior expressão de AMPK (Murata et al., 2018). Recentemente, foi demonstrado que AMPK inibe a via das hexosaminas através da fosforilação de GFAT1 (Zibrova et al., 2017). GFAT1 é a enzima limitante da via das hexosaminas (Broschat et al., 2002). Portanto, qualquer inibição farmacológica ou fisiológica dessa proteína diminui significativamente a glicosilação de proteínas (Zhang et al., 2013). Dessa forma, AMPK regula diretamente a O-glicosilação de

proteínas (Eguchi et al., 2009; Scott & Oakhill, 2017). Interessantemente, quando a via das hexosaminas é ativada, os efeitos mediados pelo AMPK também são revertidos (Gélinas, Mailleux, et al., 2018). Nesse contexto, AMPK e a via das hexosaminas tem um *crosstalk* real e que depende diretamente das necessidades metabólicas das células e que é capaz de regular os diferentes sinais de ativação dentro das células (Cork et al., 2018; Gélinas, Dontaine, et al., 2018).

### **1.3. CÉLULAS TREGS E DESENVOLVIMENTO TUMORAL**

Muitos trabalhos têm mostrado o papel das Tregs no controle das respostas inflamatórias, supressão das funções efetoras das células imunes e suas potenciais aplicações terapêuticas. Porém, na imunidade contra tumores, as células Tregs tem um papel antagônico. As Tregs podem promover o desenvolvimento e progressão de tumores ao prevenir uma efetiva resposta antitumoral por parte das células efetoras (J.-H. Kim et al., 2020). A quantidade de Tregs no microambiente tumoral (TME) muitas vezes tem sido associada como um biomarcador de severidade e prognóstico da doença (Saito et al., 2016). Por esse motivo, várias estratégias farmacológicas têm sido usadas com o objetivo de bloquear as respostas supressoras das Tregs, promover sua depleção ou inibir sua migração e diferenciação. Muitas drogas aprovadas e em fase clínica tem como alvo moléculas de superfície chaves na função supressora das células T, e entre elas estão incluídas o CD25, a molécula inibitória CTLA4, entre outras (Ohue & Nishikawa, 2019). Um das terapias mais promissoras no tratamento da progressão tumoral, é o uso dos conhecidos “*checkpoint inhibitor*”. Essa terapia usa anticorpos monoclonais específicos que tem como função bloquear a função supressora e inibitória de moléculas de superfície usadas pelas Treg (Sasidharan Nair & Elkord, 2018).



**Figura 8. Papel supressor das Tregs no microambiente tumoral.** A. Células Tregs migram ao tumor onde interagem com linfócitos T Citotóxicos induzido sua exaustão. B. Dentro do tumor encontrassem preferencialmente células Tregs efetoras que expressam uma maior quantidade de moléculas de supressão. (Fonte: Alvisi et al., 2020; Tanaka & Sakaguchi, 2019).

Dentro do TME, existe um ambiente propício para a sobrevivência tanto do tumor como de outras células como as Tregs. Esse ambiente se caracteriza por ser hipóxico, com muita acidificação, deficiência de nutrientes e com perfil de imunossupressão (R. Shi et al., 2020). As Tregs tem a capacidade de se adaptar a esses ambientes de indisponibilidade de nutrientes e alta acidificação (Angelin et al., 2017). Recentemente, foi mostrado que as Tregs que migram ao tumor são fenotipicamente e transcricionalmente diferentes das células que se encontram na periferia e que isto se correlaciona com uma maior capacidade de supressão (S. A. Lim et al., 2021). As Tregs intratumorais são capazes de usar o lactato presente no TME para ativar seu metabolismo (Watson et al., 2021), assim como apresentam uma reprogramação metabólica ativa para uma maior sínteses de lipídeos (S. A. Lim et al., 2021). A ativação de AMPK é um importante mecanismo de supressão tumoral ao regular os níveis energéticos, promover a ação de checkpoints metabólicos e inibir o crescimento celular (W. Li et al., 2015).

## **2. *HIPÓTESE***

---



AMPK regula negativamente a diferenciação das células T reguladoras controlando a sinalização por TGF- $\beta$ . A deleção da subunidade alfa de AMPK $\alpha$  promove uma maior transcrição do gene Foxp3, uma maior diferenciação de células Tregs e uma maior expressão de moléculas de supressão. As células Tregs deficientes para AMPK $\alpha$  tem maior capacidade supressora e promovem um maior crescimento tumoral.

### ***3. OBJETIVOS***

---

### **3.1. OBJETIVO GERAL**

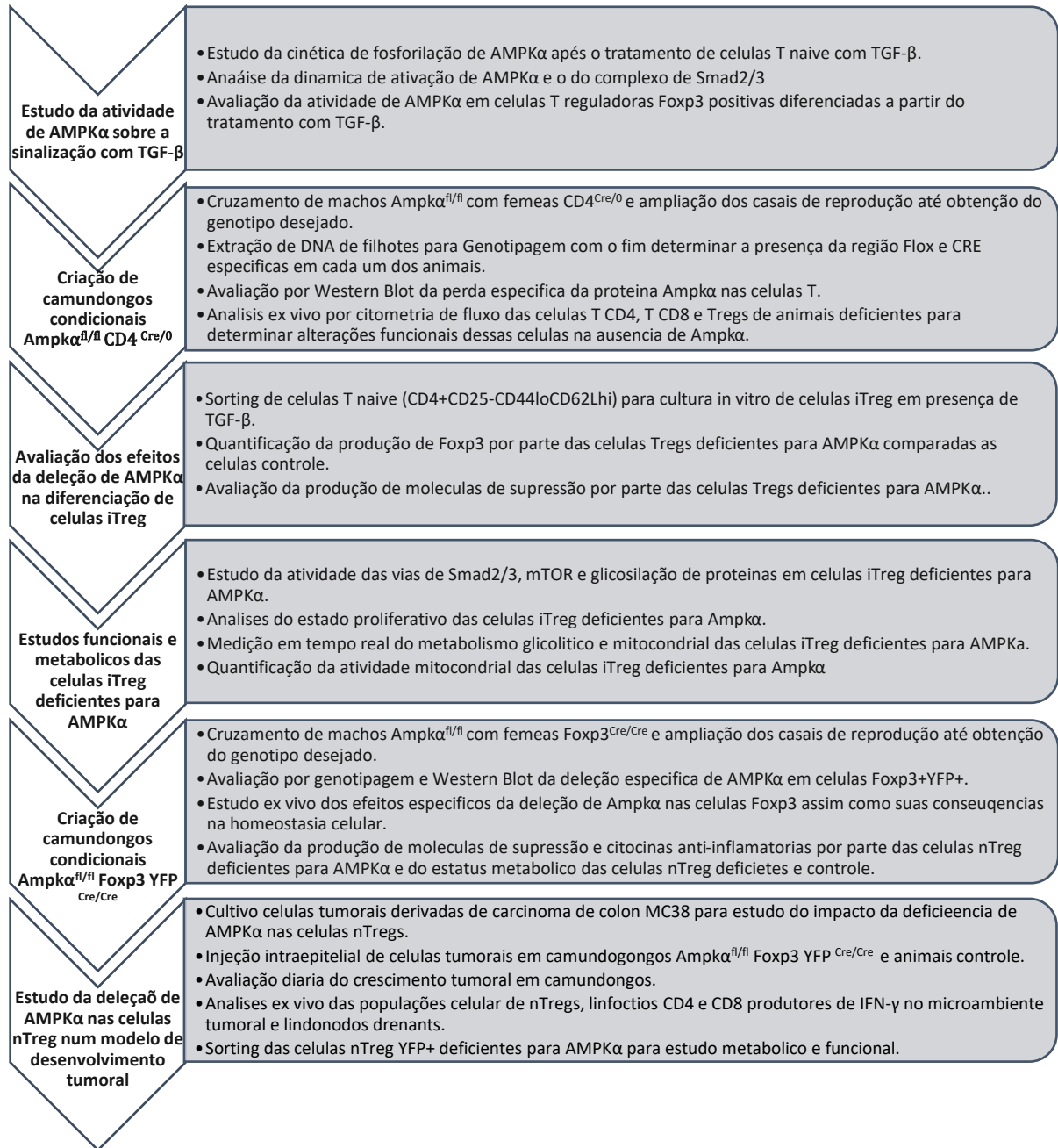
Investigar o papel da proteína quinase ativada por AMP (AMPK) na diferenciação de células T reguladoras.

### **3.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Analisar a atividade de AMPK durante a sinalização por TGF- $\beta$ .
- Estudar qual é o efeito da ativação alostérica de AMPK sobre a diferenciação de TGF- $\beta$ .
- Determinar quais são os efeitos da deleção específica de AMPK nas células T CD4 sobre a diferenciação de células Treg após o tratamento com o TGF- $\beta$ .
- Estabelecer quais são os efeitos moleculares, celulares e metabólicos da deleção de AMPK nas células Treg.
- Avaliar o papel de AMPK nas células T reguladoras, no desenvolvimento e progressão tumoral.

## ***4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL***

---



## ***5. MATERIAL E MÉTODOS***

---

### 5.1. Animais

Os animais foram utilizados no background C57BL/6J. Os animais CD4cre e AMPK $\alpha$ <sup>flox/flox</sup> foram doados pelo laboratório do Professor Niels Saraiva Olsen do ICB-USP. Os animais Foxp3<sup>YFP-CRE</sup> foram obtidos do laboratórios Jackson (JAX® Mice and Services). Estes animais foram cruzados para geração de animais deficientes para AMPK $\alpha$  condicionais tanto nas células T CD4, como nas células FOXP3 e devidamente genotipados para uso (de acordo com as sequências de primers sugeridas pelo laboratório Jackson). Todos os animais foram mantidos no biotério do departamento de Farmacologia da FMRP USP. Todos os experimentos. Todos os experimentos foram realizados em ambos os sexos, porém pareados com seus littermates, na idade entre 6 e 14 semanas. Todos os animais para experimentação foram mantidos no biotério do Departamento de Farmacologia da FMRP-USP sob condições de temperatura de 23-25°C, ciclo de claro/escuro de 12h, com acesso livre a água e ração. Os protocolos experimentais realizados neste trabalho estão de acordo com os Princípios éticos de experimentação animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA) do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP (certificado nº 075/2019).

### 5.2. Ferramenta Farmacológica

Foram usados o ativador alostérico de AMPK $\alpha$  A-769662 (TOCRIS) numa concentração de 10  $\mu$ M para experimentos de cultura *in vitro*. Também foi usado a droga AICAR (Tocris) numa concentração de 30  $\mu$ M.

### 5.3. Separação de células T naive e iTregs

Após os camundongos serem eutanasiados, o baço e/ou os linfonodos foram retirados, e colocados em tubos de propietileno de 15 ml (Falcon®) contendo 1 ml de meio RPMI 1640 incompleto. A seguir, os órgãos foram divididos em peneira de propietileno (Falcon® - separador de células – 100  $\mu$ m) com auxílio do êmbolo da seringa de 5 ml (Plastipak®), formando uma única suspensão celular. As hemácias foram lisadas por choque hiposmótico utilizando um tampão de lise e uma nova centrifugação foi realizada. Subsequentemente, as células do baço foram

ressuspensas em 3 ml, 1 ml e 2 ml de PBS cotendo 2% de soro bovino fetal inativado, respectivamente. As células foram contadas em câmara de Neubaber.

Para isolamento de células T naive por beads. Após, a subpopulação de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> do baço e linfonodos totais de camundongos C57/B6 hípidos foram separadas utilizando um kit comercial proveniente da Miltenyi Biotec (Auburn, CA) e seguindo o protocolo recomendado por o fabricante. Resumidamente, as células foram primeiramente marcadas com um coquetel de beads anti-CD4. Após 15 minutos de incubação, as células foram lavadas, 400 g por 10 minutos a 4-8 °C e a população CD4<sup>+</sup> (maior que 90 % pureza) foi separada magneticamente por MACS®-sorting através da seleção positivas em colunas adequadas ao número de células. Posteriormente, as células foram marcadas com anti-CD4 Alexa 488 (BD, 1:200), anti-CD25 PE (BD, 1:200) e anti-CD62L APC (BD, 1:200) e suspensas em solução de 2% de soro bovino fetal mais 2mM de EDTA. As células T naive CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD62L<sup>+</sup> foram obtidas após FACS sorting (FACSAria, BD; XDP or MoFlo, Beckman Coulter).

#### **5.4. Diferenciação de células T efectoras e células T reguladoras *in vitro***

Após o isolamento das células T naive (com pureza maior que 90%), estas foram submetidas a diferenciação de iTregs. Meio RPMI 1640 GlutaMAX (*Life Technologies*) foi utilizado para diferenciação das iTreg. Os meios foram suplementados com 10% de soro bovino fetal inativado (Biochrom), 500 U penicilina/estreptomicina (PAA *laboratories*) e 50 Mm de β-mercaptoethanol (*Life Technologies*). Para diferenciação de células iTreg, célula T naïve foram cultivadas em placas de fundo chato de 96 poços com *coating* de anti-CD3ε e anti-CD28 (10 µg mL<sup>-1</sup>). Para diferenciação de células iTregs, 1 × 10<sup>5</sup> células T naïve foram cultivadas em placas de fundo em U de 96 poços com *coating* de anti-CD3ε (5 µg mL<sup>-1</sup>, clone 145- 2C11; Bio X Cell) e mais coquetel específico para diferenciação: anti-CD28 (1 µg mL<sup>-1</sup>), rhTGF-β1 (concentrações variadas de acordo com os experimentos). Para ativação de células T CD4 (TH0) foram cultivadas de acordo com o protocolo para iTregs, porém na ausência TGF-β. Todas as culturas foram feitas em condições estéreis e diferenciação finalizadas após 96 horas a 37°C em estufa 5% de CO<sub>2</sub>.



### 5.5. Ensaio de atividade metabólica: Seahorse

As células foram coletas 48 horas após a cultura de iTregs.  $4 \times 10^5$  células foram plaqueadas em microplacas de 96 poços do kit Xfe96 em meio próprio para o ensaio de glicólise (DMEM modificado para o ensaio de XF), ambos provenientes da *Seahorse Biosciences (Agilent Technologies)*. A microplaca foi incubada por 30 minutos a 37°C em estufa sem CO<sub>2</sub> e submetidos a análise da taxa acidificação do meio extracelular (ECAR) em tempo real no analisador de fluxo extracelular da Seahorse XF96. Para ensaio de glicólise, o teste de estresse glicolítico foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante (Seahorse biosciences) utilizando as subseqüentes injeções de glicose (10mM), oligomicina (1µM) e 2-deoxiglicose (2-DG, 50mM). Para a avaliação do estresse oxidativo mitocondrial, as células foram suspensas em meio RPMI modificado para XF com adição de 10mM de glicose e plaqueadas em microplacas XF96. Após incubação de 30 minutos de incubação em estufa sem CO<sub>2</sub> as células foram submetidos a análise da taxa de consumo de oxigênio (OCR) em tempo real no analisador de fluxo extracelular da Seahorse XF96. O ensaio de fosforilação oxidativa foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante (Seahorse biosciences) utilizando as subseqüentes injeções de oligomicina (1µM), FCCP (1,5 µM) e rotenona/actinomicina (0,5 µM de cada). Os dados foram analisados pelo software *Wave Desktop (Agilent Technologies)*.

### 5.6. Avaliação da expressão gênica

A avaliação da expressão gênica foi realizada em células em diferenciação e em iTregs após a diferenciação. O RNA total foi isolado utilizando o RNeasy Mini Kit (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. O cDNA (0,5 µg of RNA) foi convertido através do high capacity cDNA RT Kit (Applied Biosystem), de acordo com as instruções do fabricante. O cDNA foi utilizado para Real-time PCR através de uso de SYBR Green Master mix (Thermofischer) and TaqMan (Applied Biosystems) e avaliados no Vii7 PCR system. Todos os dados foram normalizado pelos valores do gene endógeno. Os resultados foram analisados com base no valor de CT (*Cicle Threshold* ou ciclo limiar). A fórmula utilizada para análise dos resultados foi  $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ , na qual  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ amostra} - \Delta Ct \text{ controle}$  e  $\Delta Ct = CT \text{ gene alvo} - CT \text{ gene de referência endógeno } (\beta\text{-Actina})$ . As sequências dos

*primers* avaliados encontram-se na tabela abaixo.

Gene alvo	Forward	Reverse
Foxp3	TTCTCCAGGACAGACCACT	GTTGCTGTCTTTCCTGGGTGTA
HK2	TGATCGCCTGCTTATTCACGG	AACCGCCTAGAAATCTCCAGA
LDHA	CATTGTCAAGTACAGTCCACT	TTCCAATTACTCGGTTTTGGGA
PKM2	TCGCATGCAGVACCTGATT	CCTCGAATAGCTGCAAGTGTA
GAPDH	CATCTTCTTGTGCAGTGCCA	CGGCCAAATCCGTTTAC
GLUT1	CACACCCACCACCACGATAA	CACACCCACCACCACGATAA
HIF1A	CACACCCACCACCACGATAA	CCAGTGTTATAGCCCGAAC
CPT1A	CTGAGCCATGAAGCCCTCAA	CACACCCACCACCACGATAA

### 5.7. Avaliação proteica por Immunoblotting

O lisado das células foi preparado com tampão de lise (Pierce RIPA buffer, Thermo Scientific) com inibidor de protease (complete cocktail) e inibidor de fosfatase PhosSTOP, ambos da Roche Applied Science. As amostras foram quantificadas (kit de BCA, sigma) de acordo com as instruções do fabricante e de 20-40µg de proteínas foram utilizadas na eletroforese. Para separar as amostras por peso molecular foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida SDS e transferidas da membrana de nitrocelulose (Merck Millipore) e bloqueadas por 1 hora a temperatura ambiente com leite 5%. Para a marcação foram utilizados os seguintes anticorpos diluídos em BSA 5%: O-Linked N- acetylglucosamine (RL2) (MILIPORE, 1:1000), AMPK (Cell Signaling, 1:1000), pAMPK $\alpha$  (Cell Signaling, 1:1000), P-Smad2(S465/467)/Smad3(S423/425) (Cell signaling, 1:1000), Smad2/3(D7G7) (Cell signaling, 1:1000), Foxp3 (Thermo Fisher Scientific, 1:1000), p70-S6 (Cell signaling, 1:1000), pP70-S6 (Cell Signaling, 1:500). Anticorpos anti-mouse e anti-rabbit com peroxidase (Cell signaling) foram utilizados na concentração de 1:5000 diluídos em leite 5%/TBST. O sinal foi detectado com ECL prime (GE Healthcare) no Chemidoc imaging systems (Bio-Rad Laboratories).

### 5.8. ELISA

As quantificações de IL-10 (eBioscience Inc., San Diego, CA, USA) foi realizada no sobrenadante da cultura ao final da diferenciação de iTregs (96h). A quantificação desta citocinas foi realizada por método imunoenzimático (ELISA), conforme descrito pelo fabricante.

### 5.9. Citometria de Fluxo

Foram utilizados anticorpos monoclonais específicos para antígenos murinos com fluorocromos para FACS das seguintes empresas e nas concentrações descritas: CD25 PE (PC61; 1:200), CD4 Alexa488 (GK1.5; 1:800), CD4 eFluor450 (eBioscience, 1:200), CD4 BV510 (BD 1:200), Smad2 (ps465/467)/Smad3 (ps423/425) (BD 1:100), CD62L PE- Cy7 (MEL-14; 1:600), Foxp3 eFluor450 (FJK-16s; 1:400), Foxp3 APC (BD 1:200), Foxp3 PE (BD 1:200), Alexa-fluor 647 O-GlcNac (RL2 Novus biologicals). As células mortas foram excluídas pela marcação com *LIVE/DEAD Fixable Dead Cell Stain* (Life Technologies) e bloqueadas com *Fc-block* (CD16/32, 2.4G2) por 10 min no gelo. As células foram lavadas com PBS e incubadas com tampão de FACS (0.25% BSA/2 mM EDTA em PBS) para marcação extracelular. Para marcação intracelular (IFN-  $\gamma$ , Foxp3), as células foram fixadas com 2% PFA em PBS por 20 min no gelo. Estas células foram lavadas com tampão de permeabilização (0.25% BSA/2 mM EDTA/0.5% saponin em PBS). Previamente, para marcação de citocinas intracelulares, as células foram estimuladas com PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate, 0.1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; Sigma-Aldrich) and ionomicina (1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; Sigma-Aldrich) por 2 h, seguido de Brefeldin A (5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) por mais 2 h. Para marcação de IFN $\gamma$  e Foxp3 foi utilizado um kit de fixação/permeabilização (Affymetrix/eBioscience) e o procedimento foi de acordo com as instruções do fabricante. As células foram adquiradas nos seguintes aparelhos: CyAn ADP (Beckman Coulter), a LSR II (Becton Dickinson), FACSVerse (BD Biosciences). Os dados foram analisados no software FlowJo versão 10.0.

### 5.10. Análises Estatísticas

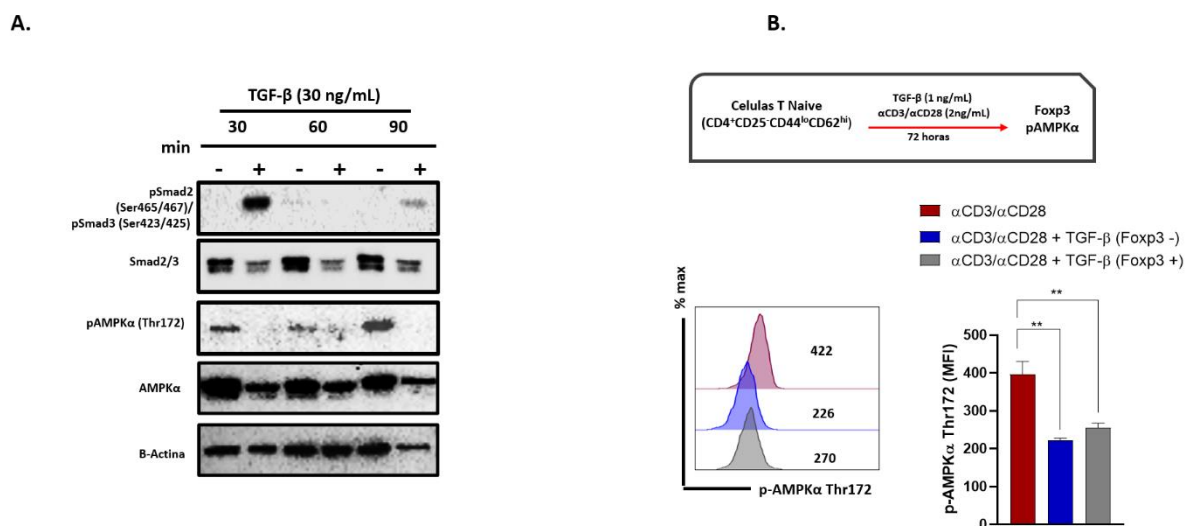
Os resultados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão (DP). Para determinar a diferença estatística entre os grupos de animais no experimento de colite foi utilizado o teste t de *Student* não-pareado. A análise de variância (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Tukey foi aplicado para amostras com distribuições normais. As análises foram realizadas através do programa GraphPad-Prism (GraphPad Software Inc., San Diego CA, EUA) e foram consideradas estatisticamente significativas as diferenças que apresentaram valores de P igual ou menor a 0,05.

## ***6. RESULTADOS***

---

### 6.1. O TRATAMENTO COM TGF- $\beta$ REDUZ A ATIVIDADE DE AMPK $\alpha$ NAS CÉLULAS T AO MESMO TEMPO QUE AUMENTA A ATIVIDADE DE SMAD 2/3.

Um dos principais efeitos de TGF- $\beta$  sobre as células é induzir a fosforilação do complexo Smad2 e Smad3 (Nakao, 1997). Adicionalmente, tem sido observado que a ativação de AMPK leva a uma diminuição da fosforilação dos Smad 2 e 3 e portanto a uma interferência na sinalização do TGF- $\beta$  (H. Lin et al., 2015; H. Yadav et al., 2017). Para testar qual é o efeito do TGF- $\beta$  sobre a atividade de AMPK $\alpha$  nas células T, foram isoladas células T naive (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD44<sup>lo</sup>CD62<sup>hi</sup>) por sorting. Primeiramente, essas células foram tratadas com TGF- $\beta$  de maneira aguda. Se escolheu uma concentração de TGF- $\beta$  maior para induzir o máximo estímulo possível e a fosforilação tanto de AMPK $\alpha$  como dos Smad2/3 foram acompanhadas em vários tempos (Figura 9A). Nesse primeiro experimento, foi possível observar por *western blot* que o tratamento agudo com TGF- $\beta$  induz, em um período de 30 minutos, a fosforilação do complexo Smad2/3. Curiosamente, esse tratamento bloqueou completamente a fosforilação de AMPK $\alpha$ . Enquanto as células não tratadas com TGF- $\beta$  mantinham a fosforilação de AMPK $\alpha$  ativa, o tratamento com TGF- $\beta$  reverteu esse efeito.

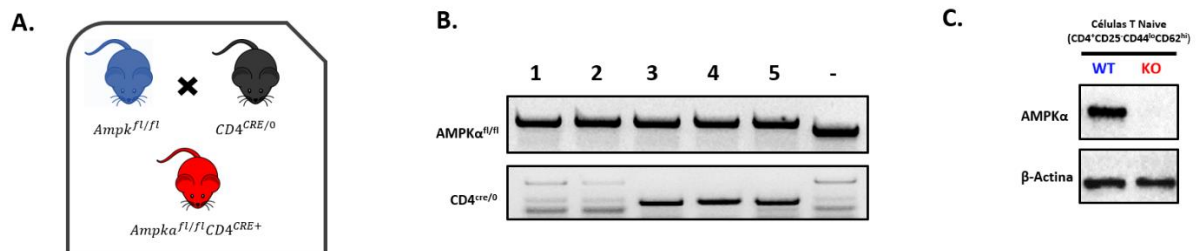


**Figura 9. Efeito do tratamento com TGF- $\beta$  sobre a fosforilação de AMPK $\alpha$  em células T naive.** A) Atividade de Smad2/3 e AMPK $\alpha$  após o tratamento agudo com uma concentração elevada de TGF- $\beta$ . B) Atividade de AMPK $\alpha$  em células T ativadas após o tratamento crônico com TGF- $\beta$ .

Para determinar se esse resultado se mantinha com um tratamento crônico com TGF- $\beta$ , células T naive foram cultivadas em condições polarizantes para Treg (TGF- $\beta$  +  $\alpha$ Cd3/ $\alpha$ CD28) e analisadas por citometria de fluxo para determinar a atividade de AMPK $\alpha$  (Figura 9B). Os resultados mostram que as células que não foram tratadas com TGF- $\beta$  e tinham a ativação apenas por meio do TCR ( $\alpha$ Cd3/ $\alpha$ CD28) apresentavam uma maior quantidade de fosforilação de AMPK $\alpha$  comparadas com as células que receberam tratamento com o TGF- $\beta$ . Adicionalmente, foi possível observar que a fosforilação de AMPK $\alpha$  reduz de maneira similar nas populações tanto positiva como negativa para Foxp3. No entanto, esse efeito é independente da expressão de Foxp3.

## 6.2. GERAÇÃO DOS ANIMAIS *Ampk $\alpha^{f1/f1}CD4^{CRE/-}$*

Para estudar o efeito da ausência específica de AMPK $\alpha$  na diferenciação das células T reguladoras, nós utilizamos camundongos deficientes para AMPK $\alpha$  nas células T CD4 (Figura 10A). Para isto, usamos o sistema por recombinação CRE-LOX (Wurst & Kühn, 2009), onde camundongos machos que apresentam o exon 3 da região gênica da subunidade alpha de AMPK (*Ampk $\alpha^{f1/f1}$* ) flanqueada por dois sítios Loxp (<https://www.jax.org/strain/014141>) foram cruzados com camundongos fêmeas que expressam a CRE recombinase sob o controle do promotor de CD4 (<https://www.jax.org/strain/017336>). Com isso, foi possível deletar condicionalmente AMPK $\alpha$  nas células CD4. Assim, camundongos knockout *Ampk $\alpha^{f1/f1}CD4^{CRE/-}$*  (KO) e os controle *Ampk $\alpha^{f1/f1}CD4^{-/-}$*  foram usados nesse estudo. A genotipagem dos animais foi feita por PCR convencional para AMPK $\alpha$  flox e CRE genérico (Figura 10B). A ausência de AMPK nas células T CD4 foi avaliada por *western blot* (Figura 10C).

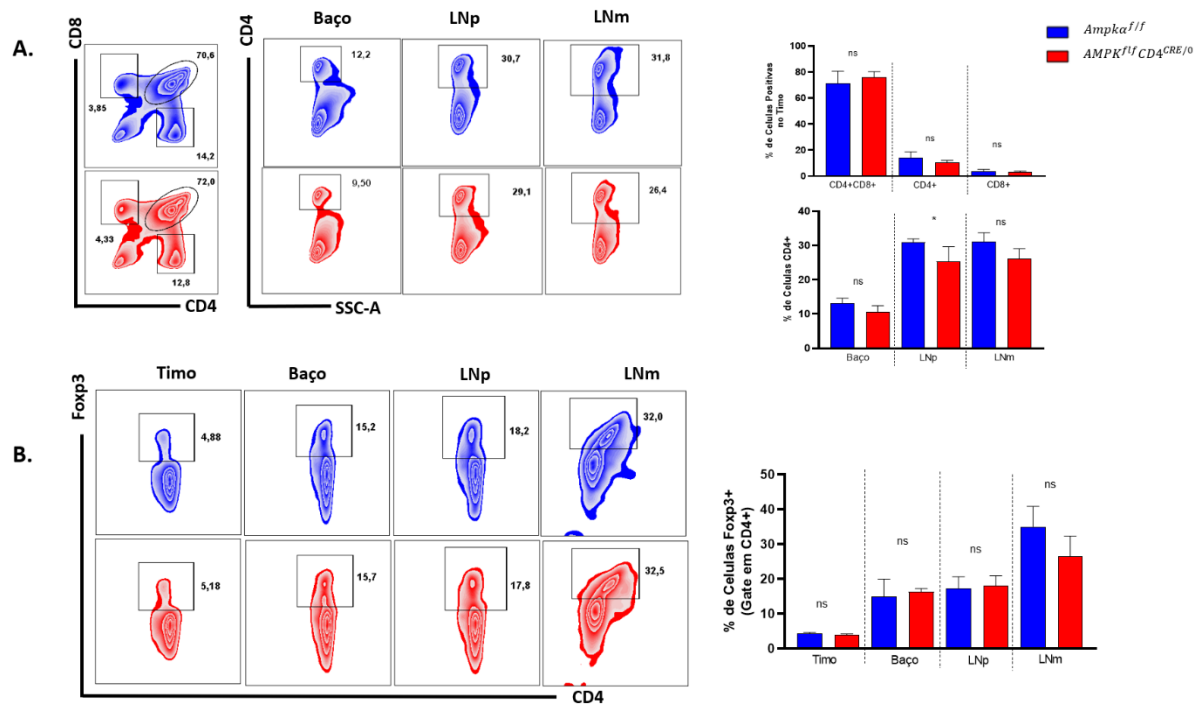


**Figura 10. Geração de camundongos knockout condicionais para AMPK nas células CD4.** A) Esquema de cruzamento para geração de camundongos deficientes para AMPK $\alpha$

nas células CD4. B). Genotipagem de 5 animais para validação do cruzamento. C). Western Blot de células T naive (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD44<sup>lo</sup>CD62<sup>hi</sup>) sorteadas de camundongos *Ampkα<sup>fl/fl</sup>* (Azul) (Azul) e *Ampkα<sup>fl/fl</sup>CD4<sup>CRE/-</sup>* (Vermelho) e analisadas para produção de AMPKα.

### 6.3. AUSENCIA DE AMPKα NÃO ALTERA A FREQUÊNCIA DE CELULAS CD4, CD8 OU TREG EM CONDIÇÕES DE HOMEOSTASIA

Para determinar se a ausência de AMPK pode afetar o desenvolvimento das células T, nós analisamos as populações de células T CD4, CD8 e Treg natural em diferentes órgãos. A quantidade de células CD4 e CD8 no timo, e as populações de CD4 total no baço e linfonodos são semelhantes entre animais *Ampkα<sup>fl/fl</sup>CD4<sup>CRE/-</sup>* e animais *Ampkα<sup>fl/fl</sup>* controle (Figura 2A). Nós também analisamos a quantidade células Treg Foxp3<sup>+</sup> natural nos órgãos mencionados (Figura 2B) e não encontrando diferenças entre os animais *Ampkα<sup>fl/fl</sup>CD4<sup>CRE/-</sup>* e controle.

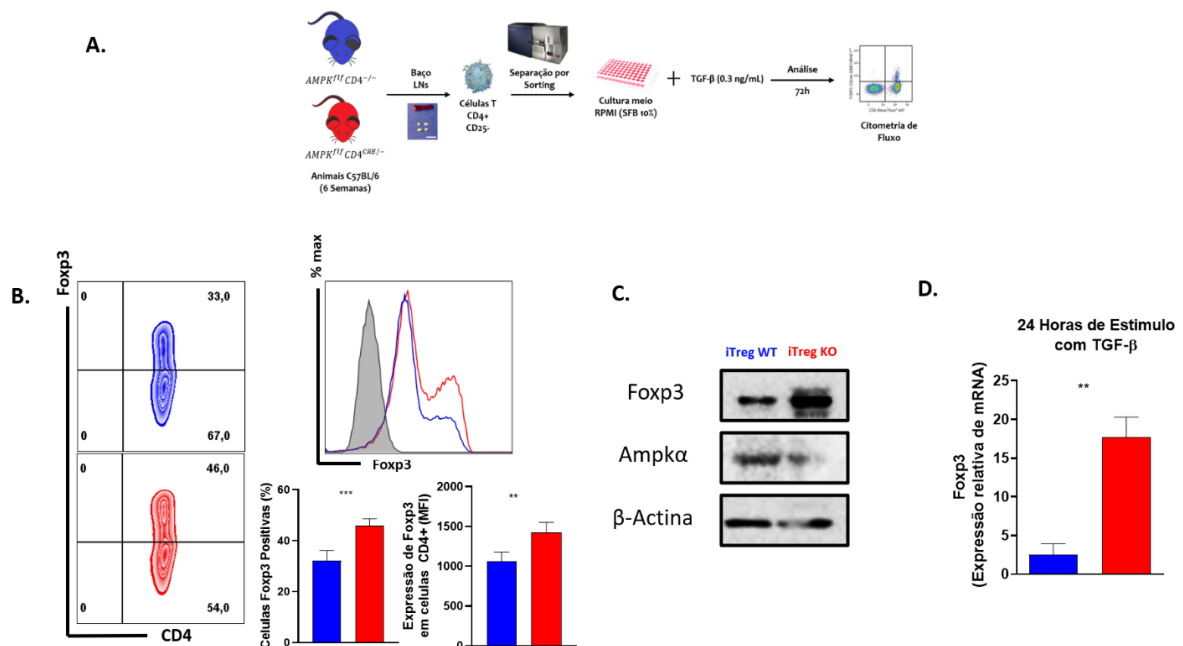


**Figura 11. A deleção gênica de AMPK nas células T CD4 não altera a frequência de linfócitos T CD4, CD8 e populações de Treg natural em condições de homeostasia A)** Análise por citometria de fluxo de células CD4, CD8 e duplo positivo no timo, assim como CD4 total no baço e LNs de animais knockout condicional *Ampkα<sup>fl/fl</sup>CD4<sup>CRE/-</sup>* (vermelho) e camundongos controle *Ampkα<sup>fl/fl</sup>* (azul) em diferentes órgãos imunes, como baço, timo e

linfonodos periféricos (LNs). **B)** Análise de células T reguladoras naturais de animais *Ampkα<sup>fl/fl</sup>CD4<sup>CRE/-</sup>* e camundongos controle *Ampkα<sup>fl/fl</sup>*.

#### 6.4. A DELEÇÃO GÊNICA DE AMPK $\alpha$ EM CELULAS T CD4 NAIVES TRATADAS COM TGF- $\beta$ INDUZ UMA MAIOR PRODUÇÃO DE FOXP3

Nossos resultados mostram que o TGF- $\beta$  reduz a fosforilação e a atividade de AMPK, enquanto promove a ativação da via dos Smad. Porém, a deleção específica de AMPK $\alpha$  nas células T não afeta a quantidade de células Tregs em condição de homeostasia. A partir de isto, nós avaliamos se a deficiência de AMPK $\alpha$  pode ter um efeito sobre a diferenciação das células Tregs na presença de TGF- $\beta$ . Para testar nossa hipótese de que AMPK pode ser um regulador negativo da diferenciação de células Treg, nós isolamos células T naive (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD44<sup>lo</sup>CD62<sup>hi</sup>) de animais *Ampkα<sup>fl/fl</sup>CD4<sup>CRE/-</sup>* e animais controle por *sorting*, as cultivamos em presença de TGF- $\beta$  e, após 72 h, avaliamos a expressão de FOXP3 (Figura 12A).



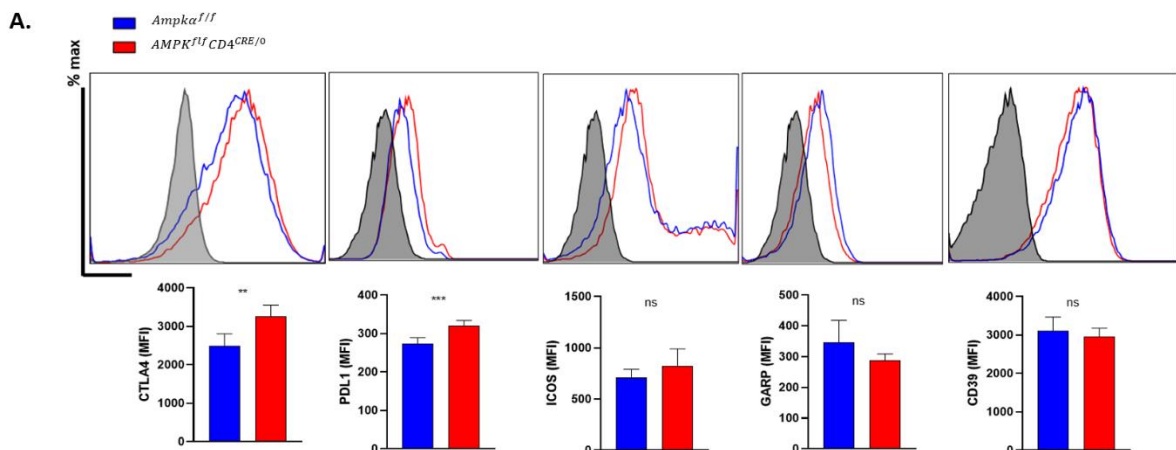
**Figura 12. A deleção gênica de AMPK aumenta a diferenciação de linfócitos para um perfil T regulador.** Células T naive (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>) foram isoladas de camundongos *Ampkα<sup>fl/fl</sup>CD4<sup>CRE/-</sup>* e camundongos controle *Ampkα<sup>fl/fl</sup>* e colocadas em cultura sob diferentes concentrações de TGF- $\beta$ . Após 72 horas, a expressão de FOXP3 foi avaliada nessas células.



Nossos resultados demonstram que células T naïve (CD4+CD25-), na ausência de AMPK $\alpha$ , diferenciam mais para um perfil T regulador após o tratamento com TGF- $\beta$  (Figura 12B). Tanto por citometria, como por Western Blot (Figura 12C) foi possível observar que essas células expressam uma quantidade significativamente maior de Foxp3 que as células controle. Curiosamente, quando se analisa a expressão relativa de Foxp3 24 horas depois de iniciada a cultura, é possível observar uma indução maior de Foxp3 nas células deficientes para Ampk $\alpha$  após o tratamento com o TGF- $\beta$  (Figura 12D). Esses resultados demonstram a importância da AMPK na diferenciação de células Treg após o tratamento com TGF- $\beta$ .

### 6.5. CÉLULAS TREG DIFERENCIADAS NA AUSÊNCIA DE AMPK $\alpha$ PRODUZEM MAIS CTLA4 E PDL1 QUE AS CÉLULAS CONTROLE

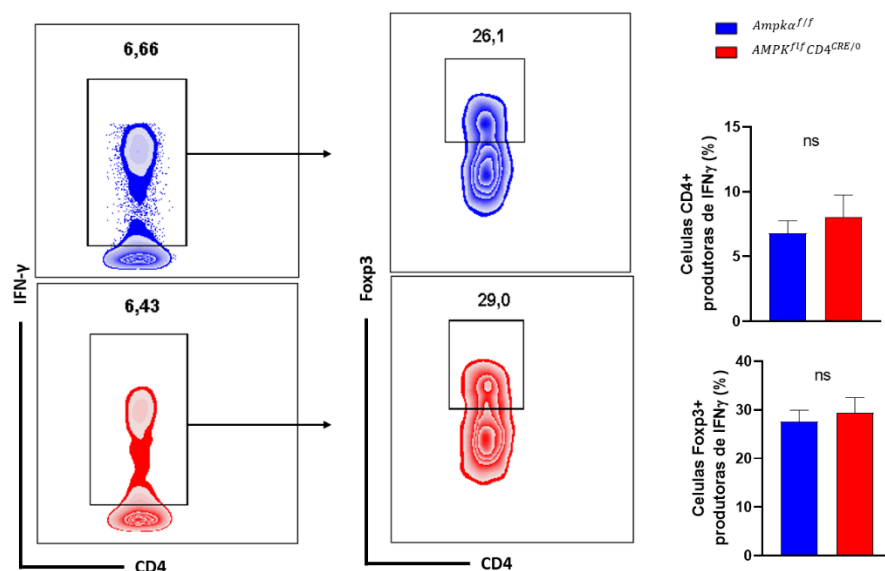
Uma vez que nossos resultados demonstram que a concentração de TGF- $\beta$  de 0.3 ng/mL é suficiente para obtermos uma diferenciação significativa tanto na porcentagem de Tregs, como na expressão de FOXP3 por parte dessas células na ausência de AMPK, nosso próximo passo foi investigar se essas células deficientes para AMPK mantêm um fenótipo regulador. Para isso, nós analisamos diferentes marcadores de supressão (Figura 4C). As células T reguladoras que apresentam maior diferenciação na ausência de AMPK produzem maior quantidade de moléculas supressoras como CTLA4 e PDL1, mas não de outras moléculas como GARP, CD39 ou ICOS. Esses resultados nos permitem concluir que as células Treg, na ausência de AMPK, não só diferenciam mais, mas também conseguem manter um fenótipo regulador.



**Figura 13. Células TREG deficientes de AMPK apresentam uma maior produção de moléculas de supressão CTLA4 e PDL1.** A) Produção de diferentes moléculas de supressão por parte das células Treg deficientes para AMPK e células controle.

### 6.6. CÉLULAS TREG DIFERENCIADAS NA AUSÊNCIA DE AMPK $\alpha$ NÃO APRESENTAM DIFERENÇAS NA PRODUÇÃO DE INTERFERON GAMMA (IFN $\gamma$ )

Fisiologicamente, existe uma população de células Treg que expressa IFN- $\gamma$  e é a primeira linha de defesa durante as respostas imunes inflamatórias (Daniel et al., 2015). Entretanto, recentemente mostrou-se que ocorre uma diminuição da capacidade supressora das células Treg em algumas doenças autoimunes e ambientes inflamatórios (Gerriets et al., 2016; Sumida et al., 2018). Para determinar se a ausência de AMPK tem um efeito na produção de IFN- $\gamma$  por parte das células Treg, nós diferenciamos células CD4 naive isoladas de animais *Ampk $\alpha$ <sup>f/f</sup>CD4<sup>CRE/-</sup>* e controle e, após 72 h, avaliamos a expressão de IFN- $\gamma$  dentro da população de células FOXP3. Os achados demonstram que a ausência de AMPK não tem efeito sobre a quantidade de células Treg produtoras de IFN- $\gamma$  (Figura 14). Portanto, nossos resultados nos permitem concluir parcialmente que as células Treg na ausência de AMPK mantem um perfil supressor similar que ao observado em células controle.

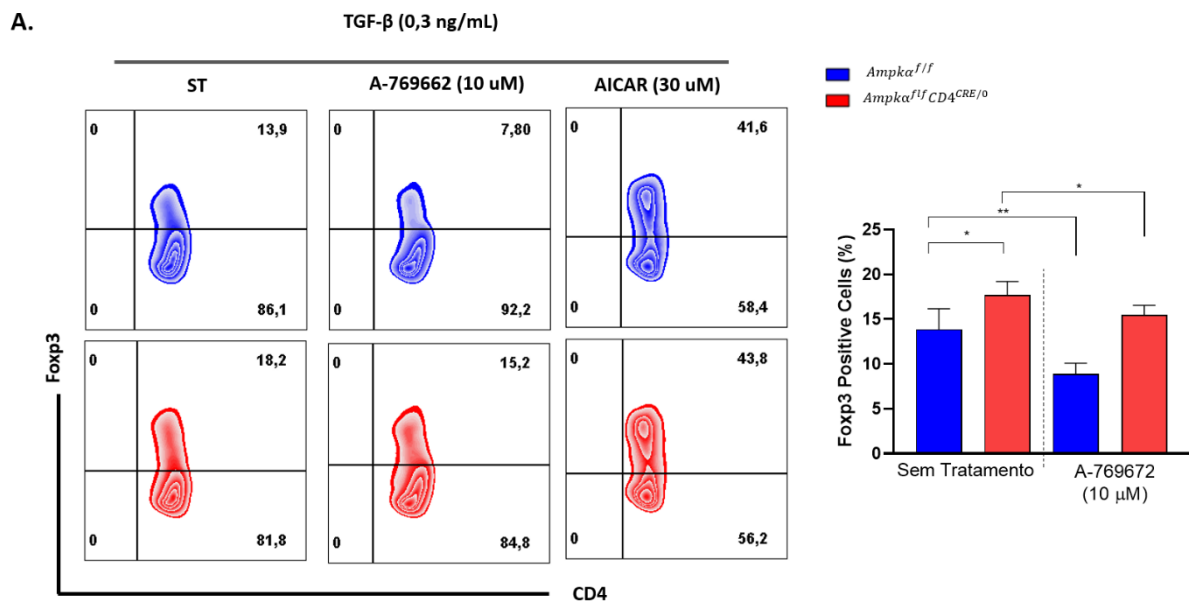


**Figura 14. A deficiência de AMPK nas células Treg não afeta a produção de IFN $\gamma$ .** A) Produção de IFN $\gamma$  por parte das células Treg deficientes para AMPK comparadas com células controle.

## 6.7. A ATIVAÇÃO ALOSTÉRICA DE AMPK $\alpha$ INIBE A DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS TREGS

Nossos resultados demonstram claramente que a deleção específica de AMPK $\alpha$  nas células T CD4 promove a diferenciação de células Tregs após o tratamento com o TGF-B. Porém, na literatura existem relatos de que o uso de ativadores de AMPK, como o AICAR, potencializam significativamente a diferenciação de células Tregs (Gualdoni et al., 2016). Por este motivo, quisermos avaliar se o uso de ativadores de AMPK $\alpha$  como o AICAR, um análogo da adenosina que se liga preferencialmente a subunidade gamma de AMPK, e um ativador alostérico da subunidade alfa o composto A769662 promoviam de igual maneira a diferenciação de células Tregs. Para validar a especificidade desses compostos, nós realizamos a diferenciação de células Tregs tanto em células T CD4 deficientes para AMPK $\alpha$  quanto em células controle.

Nossos resultados mostram, de maneira interessante, que células naive controles tratadas com o composto A769662, na presença do TGF- $\beta$ , apresentavam uma diminuição significativa da diferenciação de células Tregs. Por outro lado, em células T deficientes para AMPK tratadas com o mesmo composto, a diferenciação só teve uma leve redução, indicando que a ativação alostérica de AMPK $\alpha$  com o composto A769662 reduz a diferenciação de células Tregs na presença do TGF-B. Curiosamente, quando é avaliado o efeito do AICAR, esse composto tem um efeito completamente oposto, potencializando a diferenciação de células Tregs tanto em células controle como em células deficientes (Figura 15). Esses resultados indicam um potencial efeito *off-target* do AICAR.



**Figura 15. A ativação alostérica de AMPKa pelo composto A769662 inibe a diferenciação de células Tregs.** A) Células T naive de animais deficientes para AMPK e células controle foram cultivadas em condições polarizantes para Treg em presença do composto A769662 (10 uM) e analisadas para expressão de Foxp3 96 horas depois.

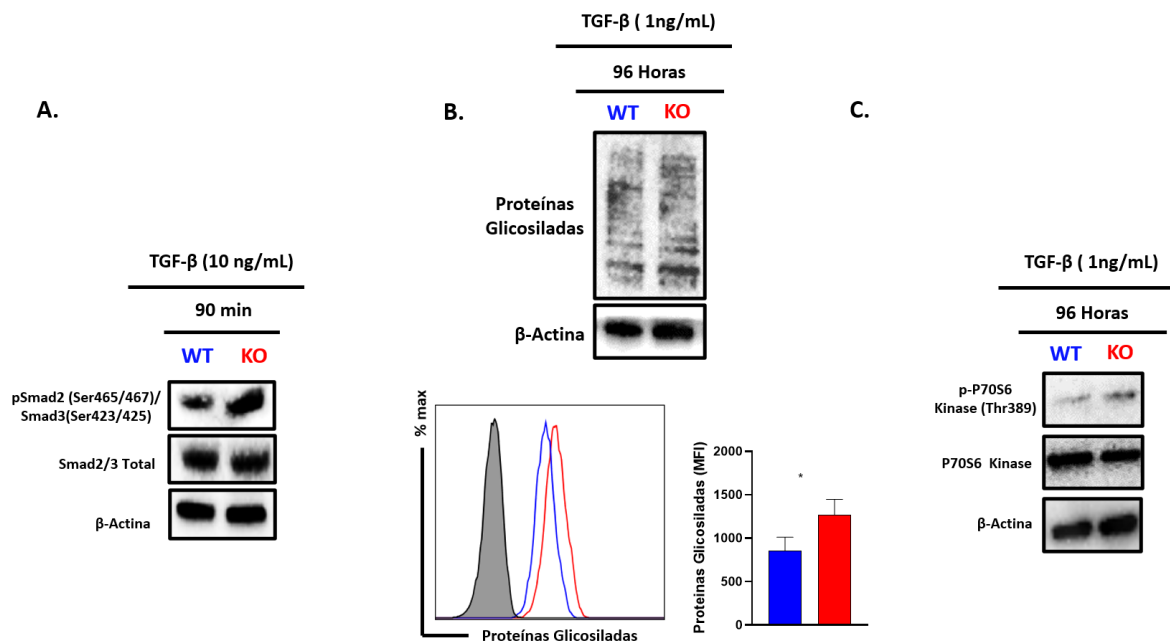
### 6.8. CÉLULAS TREG DIFERENCIADAS NA AUSÊNCIA DE AMPK $\alpha$ APRESENTAM MAIOR ATIVIDADE EM ALGUMAS VIAS DE IMPORTÂNCIA PARA AS TREGS

Nossos resultados demonstram que na ausência de AMPK $\alpha$ , as células Tregs expressam uma maior quantidade de Foxp3. A expressão de Foxp3 por parte das células Tregs após o tratamento com TGF- $\beta$  é dependente da sinalização por Smad2/3 (T. Takimoto et al., 2010). Por essa razão, avaliamos a fosforilação de Smad2 e Smad3 por *Western Blot* após o tratamento agudo com TGF- $\beta$  (Figura 15A). Após 90 minutos de estímulo, foi possível observar uma maior fosforilação do complexo Smad2/3 nas células T naive deficientes para AMPK $\alpha$ . Esses resultados indicam que na ausência de AMPK $\alpha$  as células ficam mais sensíveis ao TGF- $\beta$ , induzindo uma maior atividade das proteínas Smad2/3.

Nós também nos perguntamos se algumas outras vias de importância para as células Tregs poderiam estar mais ativadas. Dentro das vias reguladas por AMPK $\alpha$ , encontram-se duas que tem uma importância relevante para a diferenciação de células Tregs. Por um lado, encontra-se a glicosilação de proteínas e, por outro, a via

de mTOR (Cork et al., 2018). Para testar nossa hipótese, nós induzimos a diferenciação de células Treg de células naive deficientes para AMPK $\alpha$  e células controle na presença do TGF- $\beta$  por 96 h e avaliamos a quantidade de proteínas glicosiladas tanto por *western blot* como por citometria de fluxo (Figura 15B). Nossos resultados mostram que as células Treg diferenciadas na presença de TGF- $\beta$  apresentam uma maior quantidade de proteínas glicosiladas quando comparadas com as células controle. Esses resultados indicam que na ausência de AMPK $\alpha$  existe uma atividade maior da via das hexosaminas que culmina com uma maior glicosilação de proteínas.

Adicionalmente, avaliamos a atividade da via do mTOR através da fosforilação da proteína P70S6, um reconhecido alvo do complexo mTORC1 (Datan et al., 2014). Nas células Treg deficientes para AMPK $\alpha$ , foi possível observar uma maior fosforilação da proteína P70S6 comparadas com as células controle, indicando, assim, a indução de mTOR nessas células. Nossos resultados sugerem que na ausência de AMPK $\alpha$  existe uma maior atividade de mTOR, o que pode também se correlacionar com alterações metabólicas nessas células.

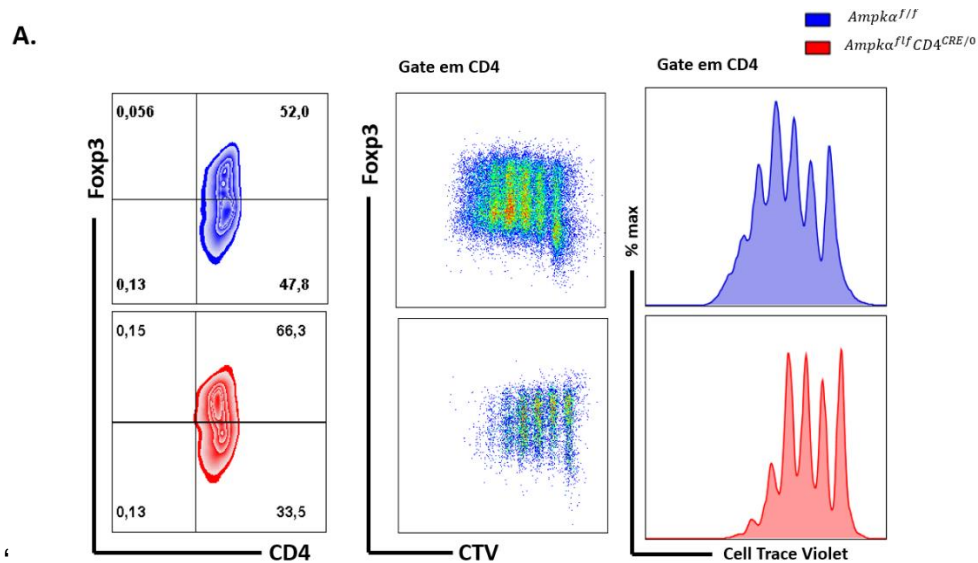


**Figura 16. A deficiência de AMPK nas células Treg aumenta a atividade de vias de sinalização de importância nas células Tregs.** A) Avaliação da fosforilação do complexo smad2/3 por *Western Blot* após o tratamento agudo com TGF- $\beta$  de células T naive. B). Avaliação do estado de glicosilação de proteínas de células cultivadas em condições de

polarização para Treg (TGF- $\beta$  +  $\alpha$ CD3/CD28 por 96 horas) tanto por *Western Blot* como por citometria de fluxo. C). Avaliação da atividade de mTOR através da fosforilação da proteína p70S6 por *Western Blot* em células cultivadas em condições de polarização par Treg.

## 6.8. CELULAS TREG DIFERENCIADAS NA AUSENCIA DE AMPK $\alpha$ PROLIFERAM MENOS

mTOR é principalmente ativado quando a célula precisa de energia e encontra-se em processo de crescimento e proliferação, sendo que o AMPK é o principal regulador negativo desse processo (Gwinn & Shaw, 2010). Se as células Tregs na ausência de AMPK apresentam uma maior atividade mTOR, elas podem ter alterações em seus níveis de proliferação. A partir disso, nós perguntamos se as células Tregs deficientes para AMPK $\alpha$  apresentariam alterações na sua capacidade de proliferação. Para responder isto, isolamos células T naive de camundongos *Ampk $\alpha$ <sup>f1/f1</sup>Foxp3<sup>CRE/CRE</sup>* (KO) e animais *Foxp3<sup>CRE/CRE</sup>* (WT) e induzimos a diferenciação de iTregs em presença de TGF- $\beta$  (0,3 ng/mL). As células foram tratadas previamente com um marcador de proliferação fluorescente (Cell Trace Violet) e analisadas 96 h depois por citometria de fluxo para avaliar a queda da fluorescência. O sobrenadante da cultura também foi usado para analisar consumo de glicose e produção de lactato por parte dessas células por meio de teste bioquímico. Nossos resultados demonstram que as células iTregs na ausência de *Ampk $\alpha$*  apresentam uma maior taxa de diferenciação, acompanhado também de uma diminuição da proliferação quando comparadas com as células WT (Figura 1A).



**Figura 17. Células Treg deficientes para AMPK $\alpha$  proliferam menos em resposta ao TGF- $\beta$ .** Células Naive de animais *Ampk $\alpha$ <sup>fl/fl</sup>Foxp3<sup>CRE/CRE</sup>* e animais *Foxp3<sup>CRE/CRE</sup>* foram isoladas por sorting e tratadas por 96 horas com TGF- $\beta$  (0.3 ng/mL) na presença de  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28. Foram avaliadas a proliferação por marcação de um Cell Trace Violet (CTV), tamanho celular por citometria de fluxo

### 6.9. CÉLULAS TREG DEFICIENTES PARA AMPK $\alpha$ APRESENTAM UMA REPROGRAMAÇÃO METABÓLICA DE GLICÓLISE PARA FOSFORILAÇÃO OXIDATIVA

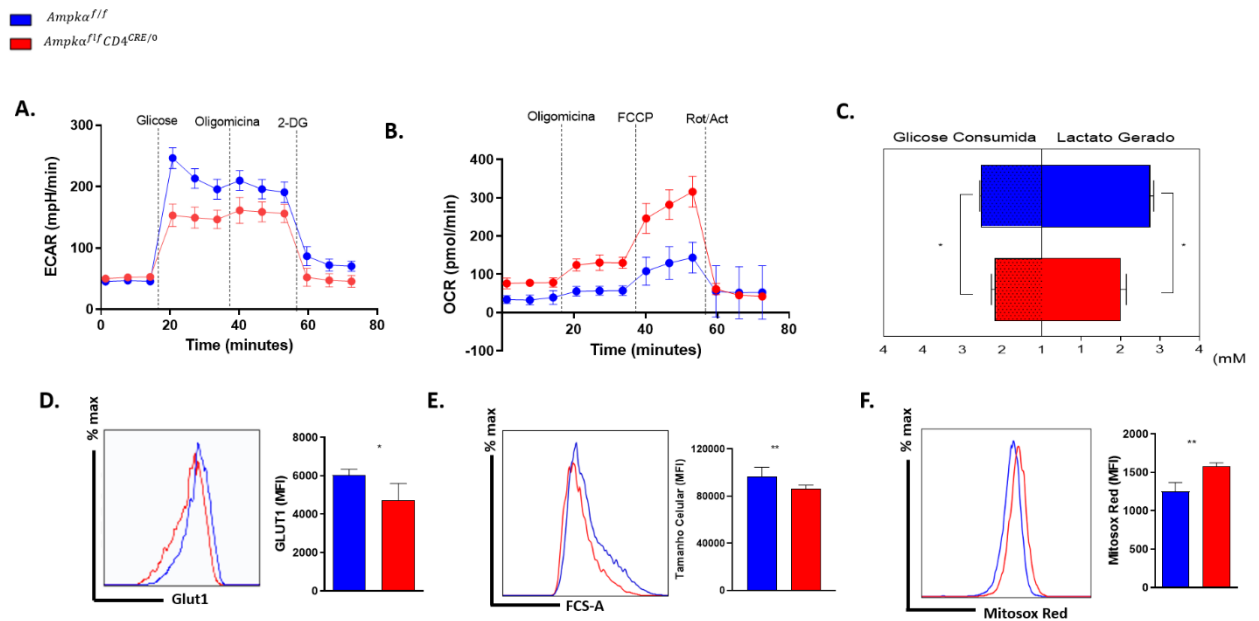
As células Tregs que tem uma menor proliferação tem uma maior capacidade supressora e isto se correlaciona com uma diminuição da glicólises e com um aumento da fosforilação oxidativa (Huynh et al., 2015). A partir dessa ideia, nós objetivamos determinar o perfil metabólico celular das células Tregs deficientes para AMPK. Para avaliar isto, nós medimos, em tempo real, como as células respondiam a uso de drogas moduladoras da atividade glicolítica e atividade mitocondrial.

Em primeiro lugar, medimos a taxa de acidificação do meio ou ECAR, que registra a quantidade de lactato que a célula libera a partir do processamento da glicoses via glicólise. Nossos resultados mostram que na ausência de AMPK as células Treg, quando são expostas a glicose, reagem muito menos quando comparadas as célula controle, apresentando uma significativa redução em sua capacidade glicolítica (Figura 17A). A partir disso, nós medimos a taxa de consumo de oxigênio ou OCR, que registra a capacidade respiratória da célula. Nossos resultados mostram que em

as células deficientes para AMPKa apresentam um OCR basal maior e que, quando se gera o desacople da membrana mitocondrial através do uso da droga FCCP, as células deficientes para AMPK apresentam uma capacidade respiratória superior que as células controle, o que é indicativo de uma maior atividade mitocondrial na ausência de AMPKa (Figura 17B). Adicionalmente, analisamos o sobrenadante da cultura e foi possível observar que as células Tregs na ausência de AMPK consomem menos glicose e que a maior parte dessa glicólise não é liberada em forma de lactato, o que é indicativo de um uso alternativo desse combustível (Figura 17C).

Para determinar se o menor consumo de glicose se deve a uma diminuição da produção do principal transportador Glut1, nós avaliamos, por citometria de fluxo, a produção por parte das células Tregs. Percebemos que células Tregs deficientes para AMPKa apresentam uma menor produção de Glut1 (Figura 17D). Paralelamente, avaliamos, por citometria de fluxo, se as células deficientes para AMPKa apresentam mudanças em seu tamanho celular. Curiosamente, essas células são menores em tamanho quando comparadas com as células controle (Figura 17E). Por último, avaliamos a função mitocondrial através do uso da sonda MitoSox-Red, que determina a quantidade de produção de ROS mitocondrial. Nossos resultados mostram que na ausência de AMPKa as células produzem mais ROS mitocondrial que as células controle, o que é indicativo de uma atividade mitocondrial maior (Figura 17F). Em conjunto, os resultados mostram que as células Tregs na ausência de AMPKa tem uma preferência maior por usar a fosforilação oxidativa em detrimento da glicólise como fonte de energia.



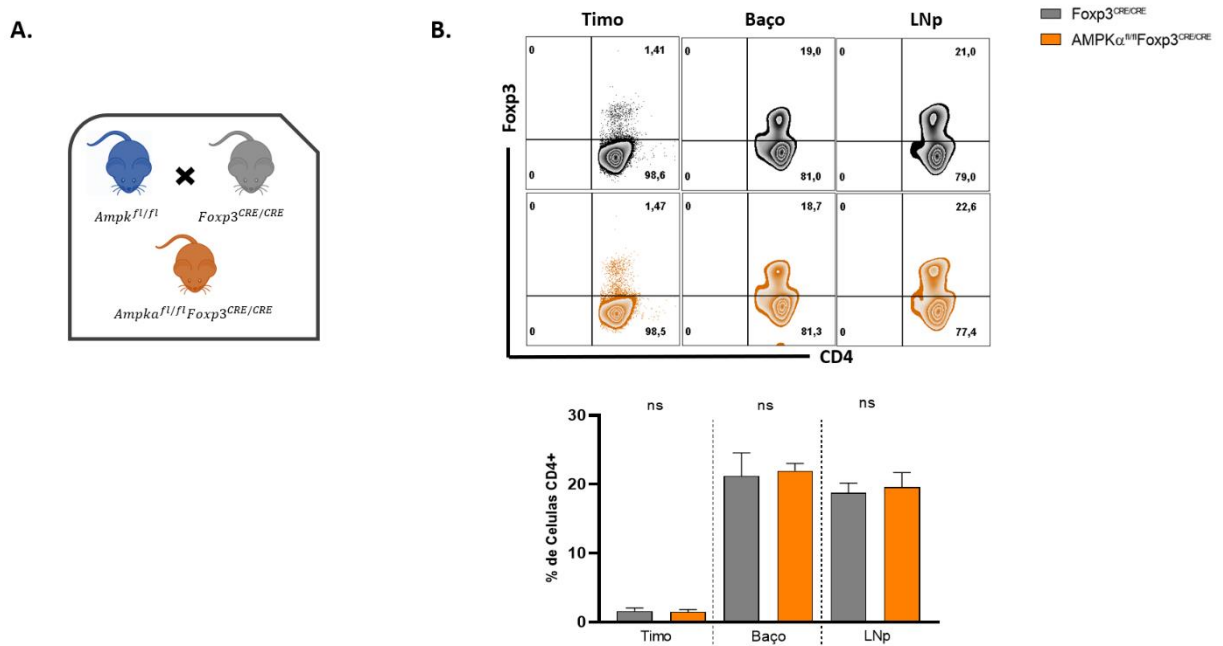


**Figura 18. Células Treg deficientes para AMPK $\alpha$  tem uma reprogramação metabólica da glicólises para fosforilação oxidativa.** A) Taxa de acidificação extracelular de células Treg diferenciadas de animais deficientes para *Ampk $\alpha$*  e animais controle. B) Taxa de consumo de oxigênio ou OCR de células Treg diferenciadas. C) Análises bioquímico colorimétrico de consumo de glicose e lactado gerada de células Treg diferenciadas. D). Produção por MFI de Glut1 por parte de células Treg diferenciadas (Gate em células *Foxp3+*). E) Tamanho celular calculado por MFI de forward scatter (Gate em células *Foxp3+*). usado para discriminar as células por seu tamanho. F). Produção de ROS mitocondrial analisado por MFI de sonda fluorescente Mitosox-Red de células Treg

## 6.10. A DELEÇÃO ESPECÍFICA DE AMPK $\alpha$ NAS CÉLULAS NTREG NÃO AFETA A PROPORÇÃO DE CÉLULAS TREGS NOS DIFERENTES ORGÃOS LINFÓIDES

Nossos resultados prévios mostraram que a deficiência de AMPK $\alpha$  nas células T CD4 e CD8 totais (animal *Ampk<sup>fl/fl</sup>CD4<sup>CRE/CRE</sup>*) não resulta em nenhuma alteração das populações células T CD4, CD8 ou Treg em condições de homeostasia. Porém, é importante ressaltar que o uso de animas *CD4<sup>CRE/0</sup>* tem como principal característica a deleção gênica em todas as populações de CD4 e CD8 devido a dupla expressão desses marcadores durante a seleção tímica (Rao et al., 2016). Para estudar diretamente o efeito da ausência de AMPK $\alpha$  nas células *Foxp3* positivas, foi feito o cruzamento de *Foxp3 – YFP<sup>CRE/CRE</sup>* com camundongos *Ampk<sup>fl/fl</sup>* (Figura 18<sup>a</sup>).

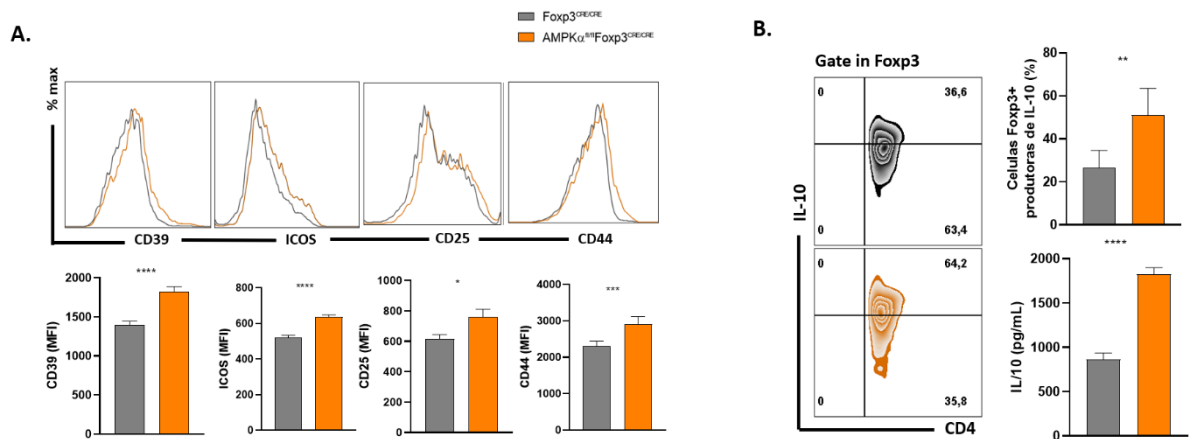
Esse tipo de camundongo já tem sido utilizado amplamente em trabalhos que investigam a biologia das células Tregs (Rubtsov et al., 2008). Em primeiro lugar, nós analisamos se em condições de homeostasia existe diferença na quantidade de células Foxp3 nos órgãos linfoides desses animais. Nossos resultados demonstram que a ausência de AMPK $\alpha$  não afeta porcentagem percentual de células Foxp3 (Figura 18B).



**Figura 19. Proporção de células Foxp3 em diferentes órgãos linfoides.** A). Estratégia de cruzamento para geração de animais  $Ampk^{fl/fl}Foxp3^{CRE/CRE}$ . B). Análise por citometria de fluxo de células Foxp3 em animais (laranja) comparados a animais controle (azul) em diferentes órgãos linfoides.

### 6.11. CÉLULAS NTREG DEFICIENTES PARA AMPK $\alpha$ EXPRESSAM MAIS MARCADORES DE SUPRESSÃO E ATIVAÇÃO

Apesar da deficiência de AMPK $\alpha$  nas células Foxp3 positivas não afetar sua proporção nos diferentes órgãos linfoides, o próximo objetivo foi analisar se a expressão dos marcadores de supressão e de ativação dessas células poderia estar sendo afetadas. Portanto, avaliamos a expressão de marcadores de superfície de ativação, como CD25 e CD44, e de supressão, como ICOS e CD39 (Figura 19).



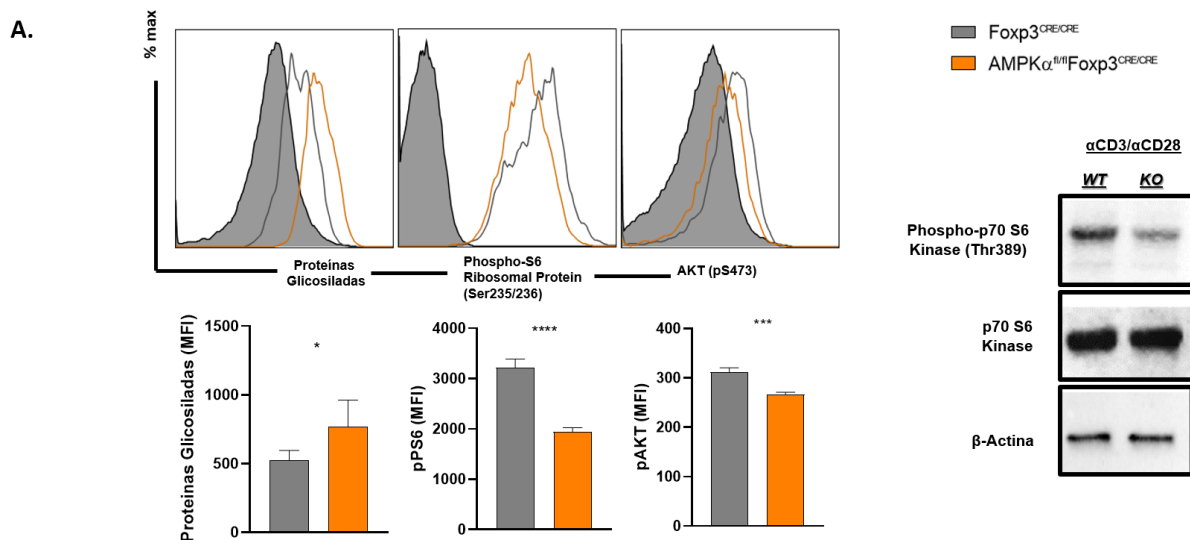
**Figura 20. Expressão de marcadores de supressão por parte de células Foxp3 deficientes para AMPK $\alpha$ .** A) Análise por citometria de fluxo de marcadores de superfície e supressão de células Foxp3 isoladas de animais  $Ampka^{fl/fl}Foxp3^{CRE/CRE}$  (laranja) comparados a animais controle (cinza). B). Análises por citometria de fluxo de células e Elisa para avaliar produção de IL-10 por parte de células Foxp3 ativadas com  $\alpha$ CD3 e  $\alpha$ CD28 mais IL-2.

Nossos resultados demonstram que na ausência de AMPK $\alpha$  as células Treg produzem uma maior quantidade de CD25 e CD44, indicando assim uma maior ativação. Por outro lado, elas também produzem uma quantidade maior das moléculas de supressão de CD39 e de ICOS comparada com as células controle. Esses resultados são interessantes, uma vez que demonstram que na ausência de AMPK $\alpha$  as Tregs aumentam a expressão de várias moléculas associadas com sua capacidade supressiva.

Se as células Tregs deficientes para AMPK $\alpha$  parecem ter um perfil mais supressor, nós analisamos se essas células produziram uma maior quantidade de IL-10. Por este motivo, ativamos as células com  $\alpha$ CD3 e  $\alpha$ CD28 mais IL-2 e avaliamos a produção de IL-10 tanto por citometria de fluxo assim como por ELISA no sobrenadante na cultura (Figura 10). Nossos resultados mostram que as células Treg deficientes para AMPK $\alpha$  produzem uma maior quantidade de IL-10 que as células controle, demonstrando assim um potencial supressor maior.

## 6.12. CÉLULAS NTREG DEFICIENTES PARA AMPK $\alpha$ APRESENTAM UMA MENOR ATIVAÇÃO DA VIA DO MTOR E UMA MAIOR GLICOSILAÇÃO DE PROTEÍNAS

Resultados anteriores mostraram que células T deficientes para *Ampka* e diferenciadas com TGF-B apresentam um aumento da sinalização de mTOR, fato este evidenciado pelo aumento da fosforilação da proteína p70S6 (Figura 13B e Figura 16B). Neste caso, avaliamos o que acontece nas células nTreg YFP+ ativadas previamente com  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28 e estimuladas com IL-2. Curiosamente, essas células apresentam uma menor ativação do complexo mTOR, evidenciado pela fosforilação tanto da proteína p70S6 p, conjuntamente, são indicativos da atividade do mTORC1, assim como a menor fosforilação do AKT que indica atividade do complexo mTORC2 (Priyadharshini et al., 2018).

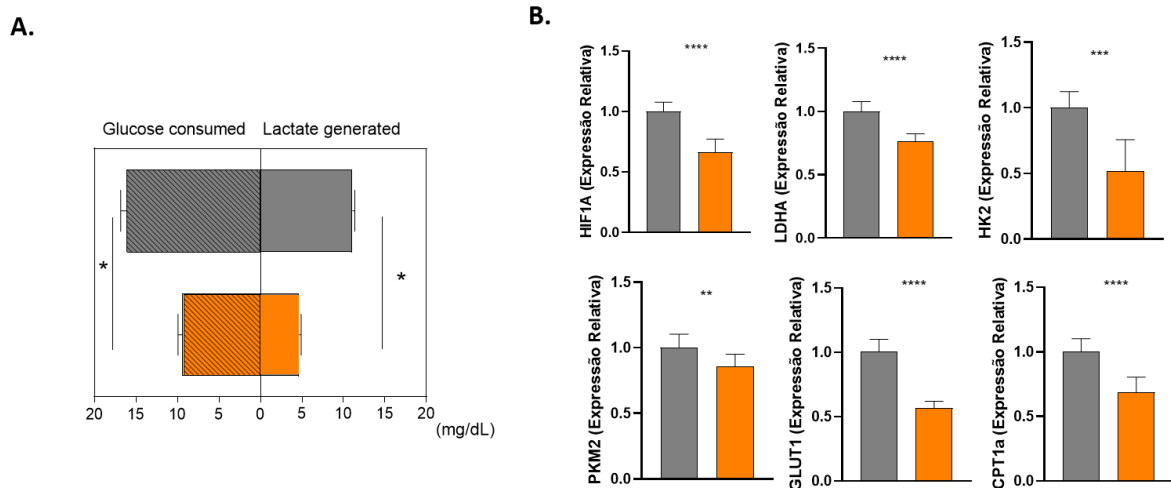


**Figura 21.** Células Treg YFP+ foram isoladas por sorting de animais *Ampk $\alpha^{fl/fl}$ Foxp3<sup>CRE/CRE</sup>* e animais *Foxp3<sup>CRE/CRE</sup>*. Posteriormente foram estimuladas por 96 horas com  $\alpha$ CD3/CD28 + IL-2. A fosforilação de proteínas alvos foi avaliada por citometria de fluxo e western blot.

Desta forma, nossos resultados sugerem que células nTreg estimuladas com IL-2 apresentam uma redução da glicólise e menor atividade de mTOR, o que pode ser correlacionado com o aumento de moléculas de supressão como IL-10, ICOS, CD39 e CD25. No mesmo contexto, nós também observamos, por citometria de fluxo, um aumento significativo da glicosilação total de proteínas avaliadas.

### 6.13. CÉLULAS NTREG DEFICIENTES PARA AMPK $\alpha$ APRESENTAM UMA REDUÇÃO DA VÁRIAS ENZIMAS ASSOCIADAS A VIA GLICOLÍTICA

A redução da atividade de mTOR nas células nTreg deficientes para AMPK $\alpha$  pode também resultar em alterações metabólicas. Então, a partir dessas informações, nós avaliamos como se encontrava o metabolismo das células nTregs deficientes para Ampk $\alpha$ . Em primeiro lugar, avaliamos o consumo de glicose (substrato) e produção de lactato (produto) por parte dessas células (Figura 21A). Posteriormente, avaliamos várias enzimas da via glicolítica por qRT-PCR (Figura 21B). Nossos resultados mostram que as células nTreg deficientes para AMPK $\alpha$ , quando estimuladas com  $\alpha$ CD3/CD28 e IL-2 por 4 dias, consomem menos glicose e produzem menos lactato quando comparadas com as células controle.



**Figura 22.** A) Células Treg YFP<sup>+</sup> foram isoladas por sorting de animais *Ampk $\alpha$ <sup>fl/fl</sup>Foxp3<sup>CRE/CRE</sup>* e animais *Foxp3<sup>CRE/CRE</sup>*. Posteriormente foram estimuladas por 96 horas com  $\alpha$ CD3/CD28 + IL-2 o sobrenadante foi usado para avaliação- de consumo de glicose e liberação de lactato por teste bioquímico. B). RNA total das células foi coletado para avaliação por qRT-PCR de algumas enzimas da via glicolítica enquanto

Adicionalmente, nós observamos que a expressão relativa de algumas enzimas da via glicolítica estão significativamente reduzidas nas células KO (Figura 21B), o que demonstra uma redução do metabolismo glicolítico por parte dessas células. Entre esses enzimas, destaca-se o HIF1A, hexoquinase 2 (HK2), o Lactato Deshidrogenase (LDHA) a enzima PKM2, assim como uma menor produção do transportador de

glicose. Adicionalmente, avaliamos a expressão do transportador de carnitina CPT1a, o qual também encontrou-se reduzido em células nTreg deficientes para Ampk $\alpha$ . Nossos dados em conjunto mostram que as Tregs na ausência de Ampk $\alpha$  usam menos o metabolismo glicolítico, o que poderia explicar porque essas células parecem ter uma maior atividade supressora.

## ***7. DISCUSSÃO***

---

As Tregs são células especializadas na manutenção da tolerância central e periférica e no controle das respostas inflamatórias (Josefowicz et al., 2012). As células Tregs se caracterizam pela expressão do fator de transcrição Foxp3, o qual comanda a maior parte do programa funcional desse conjunto celular (Hill et al., 2007; Samstein et al., 2012). A expressão de Foxp3 é promovida após o início de cascatas de sinalização iniciadas através da ativação do TCR ou a ação das citocinas IL-2 e do TGF- $\beta$  (W. Chen & Konkel, 2015; Mercer & Unutmaz, 2009). O processo de diferenciação das células Tregs é molecular e metabolicamente complexo e implica a ação conjunta de várias proteínas, fatores de transcrição e uma grande quantidade de disponibilidade de nutrientes e energia (Colamatteo et al., 2020; H. Shi & Chi, 2019). Portanto, existem diferentes mecanismos que regulam a transcrição do gene de Foxp3, assim como a estabilidade e função das células Tregs. Muitos desses mecanismos incluem modificações postranducionais, como a ação de proteínas quinases que vão fosforilar alvos específicos, ubiquitinas ligases que vão promover a ubiquitinação e a posterior degradação de proteínas ou enzimas que vão glicosilar proteínas (van Loosdregt & Coffey, 2014).

Dentro dos principais processos que regulam a transcrição do gene de Foxp3 em células Tregs, encontra-se a via de sinalização comandada pela citocina TGF- $\beta$  (Shevach et al., 2008). Células T naive quando são tratadas com a TGF- $\beta$  começam expressar Foxp3, polarizando assim para um perfil regulador (S. Fu et al., 2004). Essas células são funcionalmente similares as Tregs naturais que migram do timo, expressando de igual maneira muitos dos marcadores de supressão típicos delas (Lu et al., 2009; Marie et al., 2005). A via de sinalização de TGF- $\beta$  pode ser regulada através da fosforilação ou ubiquitinação do complexo Smad2/3 (Gao et al., 2009; Massagué, 2012). Por esse motivo, um dos nossos principais interesses foi determinar quais são os mecanismos que regulam a sinalização do TGF- $\beta$  nas células Treg.

Em primeiro lugar, a proteína quinase AMPK chamou nossa atenção pelas evidências acerca do seu papel no controle da sinalização por TGF- $\beta$  (N.-S. Li et al., 2016; H. Lin et al., 2015; Pan et al., 2018; H. Yadav et al., 2017). Porém, esses resultados são todos em células como fibroblastos ou células epiteliais. Até o momento, nada tinha sido descrito sobre AMPK e TGF- $\beta$  em células T. Sendo assim, ao nosso conhecimento, somos os primeiros a investigar o papel da AMPK no controle



da diferenciação de células T. Quando as células T naive são tratadas com TGF- $\beta$ , rapidamente é induzida a fosforilação intracelular de Smad2/3, o que está de acordo com o estabelecido na literatura sobre a cinética de fosforilação de Smad2/3 (Tidin et al., 2019). Porém, quando é analisada a cinética de fosforilação de AMPK, é possível observar que as células T naive apresentam uma fosforilação basal de AMPK. Já foi demonstrado que as células T naive não ativadas via TCR se encontram em estado de quiescência, o que leva a aumento da quantidade da proporção de AMP/ATP e resultando em uma atividade maior de AMPK (Fracchia et al., 2013). Curiosamente, quando essas células T naive são tratadas com TGF- $\beta$ , a atividade de AMPK cessa completamente, enquanto a fosforilação do complexo Smad2/3 aumenta significativamente. Nosso resultado, então, demonstra que a fosforilação de AMPK e de Smad2/3 tem um relação inversa. AMPK inibe a fosforilação de Smad2/3, enquanto que o TGF- $\beta$  inibe a fosforilação e, portanto, ativação de AMPK. Resultados semelhantes já tinham sido evidenciados em células epiteliais (H. Lin et al., 2015).

A partir disso, nós quisemos avaliar o que aconteceria com a fosforilação de AMPK em células ativadas via TCR com  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28 e tratadas na presença e ausência de TGF- $\beta$  por um período mais longo de tempo. Células células que foram tratadas com TGF- $\beta$  apresentam uma diminuição da atividade de AMPK $\alpha$  em relação àquelas que foram ativadas unicamente por TCR. A ativação do TCR potencializa a proliferação e crescimento das células T (Guy et al., 2013), o que vem acompanhado tanto por um aumento da glicólise, como por um maior gasto de energia (Fracchia et al., 2013). O tratamento com o TGF- $\beta$  reduz significativamente a atividade AMPK, e o fato de que tanto a população positiva como negativa para Foxp3 apresentam uma menor fosforilação de AMPK demonstra que esse evento é independente da produção de Foxp3. Esses eventos podem estar associados ao efeito que TGF- $\beta$  tem sobre a inibição do metabolismo de glicose e pode afetar a proliferação das células T (Priyadharshini et al., 2018). Em conjunto, nossos resultados mostram que AMPK controla a sinalização de TGF- $\beta$  em células T.

Para entender como AMPK pode controlar a diferenciação de células T reguladoras, nós decidimos usar camundongos condicionais onde a subunidade alfa de AMPK seja deletada especificamente das células CD4 e CD8 (Ampk $\alpha^{fl/fl}$ CD4 $^{Cre/0}$ ). Esses camundongos já têm sido utilizados em outros trabalhos, por exemplo, Rao e

colaboradores (2015) estudaram o efeito da ausência de AMPK sobre as funções antitumorais das células CD8 (Rao et al., 2015). Posteriormente, os mesmos autores usaram esse tipo de camundongos para analisar os efeitos dependentes e independentes de AICAR e composto C sobre as respostas das células T CD4 e CD8 (Rao et al., 2016). O fato de que a CRE recombinase esteja sob o controle do promotor de CD4 faz com que seja possível deletar AMPK desde o desenvolvimento dos tímócitos duplo positivos e assim subsequentemente em todas as populações de células T (Araki & Ahmed, 2013).

Em consequência disso, nós avaliamos se a ausência de AMPK $\alpha$  nas células T CD4 ou CD8 tinha algum efeito sobre a proporção dessas células em homeostasia. A ausência de AMPK $\alpha$  nessas células não gerou efeitos nas populações celulares nem de CD4 nem CD8 em qualquer dos órgãos linfoides analisados. Portanto, AMPK $\alpha$  não é importante para geração de linfócitos T CD4 ou CD8. Nosso interesse é sobre as células T reguladoras, dessa forma, avaliamos também as populações de células Treg em diferentes órgãos linfoides e não encontrando diferenças. Portanto, a deficiência de AMPK não tem um efeito significativo sobre o desenvolvimento das células Treg em condições homeostáticas. Esses resultados são comparáveis com aqueles reportados por Rao e colegas (2015) (Rao et al., 2015), onde encontraram que as diferentes populações imunes e marcadores de células T não apresentaram diferenças entre animais *Ampk $\alpha$ <sup>f1/f1</sup>CD4<sup>CRE/-</sup>* e controle.

Na sequência, nosso interesse foi entender qual seria o efeito que tem a deleção de AMPK $\alpha$  nas células T CD4 sobre a diferenciação de células Treg. Para isso, cultivamos células T naive em presença de TGF- $\beta$ . Sabendo que AMPK $\alpha$  controle a sinalização por TGF- $\beta$ , nossa hipótese era que sua deleção potencializaria a diferenciação de células Treg. Nossos resultados foram bem interessantes, posto que o TGF- $\beta$  promoveu não só uma maior diferenciação de células Tregs, como também aumentou sua expressão gênica e proteica. Contudo, a literatura tem mostrado um papel de AMPK na diferenciação de células Tregs mais controverso. Por exemplo, foi visto que o uso de AICAR, um potente ativador de AMPK, promove uma maior diferenciação de células T reguladoras (Gualdoni et al., 2016). Várias revisões são constantes ao afirmar que AMPK é uma proteína que promove a diferenciação de células Tregs (Kempkes et al., 2019; Pacella & Piconese, 2019). Por conseguinte,

nossos resultados estão de acordo com o já relatado na literatura acerca da diferenciação das Tregs.

Nós quisermos nos aprofundar nas características funcionais dessas células Tregs deficientes para AMPK $\alpha$ . Após serem ativadas via TCR, as células Tregs ativam diversos mecanismos supressores tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Akkaya et al., 2019). Essas capacidades supressoras são derivadas da produção de diferentes citocinas anti-inflamatórias como IL-10, assim como de moléculas inibitórias como CTLA-4 e ICOS (Sakaguchi et al., 2010). Por esse motivo, nosso próximo passo foi investigar se essas células deficientes para AMPK mantêm um fenótipo regulador. Para isso, nós analisamos diferentes marcadores de supressão. As células T reguladoras que diferenciam mais na ausência de AMPK apresentam uma produção maior de moléculas supressoras como CTLA4 e PDL1, mas não de outras moléculas como GARP, CD39 ou ICOS. Esses resultados nos permitem concluir que as células Treg na ausência de AMPK não só diferenciam mais, mas também conseguem manter um fenótipo regulador.

Sabendo-se que o CTLA4 é uma molécula inibitória que compete com o CD28 pelo ligante CD80 e que a sinalização CD28/CD80 é importante para a ativação das células T efectoras (Walker, 2013), o fato das células Treg deficientes para AMPK expressarem mais CTLA4 que as células controle pode sugerir uma capacidade maior de supressão. Ainda, PDL1 é molécula importante para controlar as respostas efectoras das células T após ativação, e também uma molécula importante para a manutenção e estabilidade das próprias células Treg induzidas (Francisco et al., 2009). Dessa maneira, é importante demonstrar que essas células possam ter uma maior capacidade de supressão.

Adicionalmente, avaliamos se essas Tregs deficientes para AMPK $\alpha$  podem perder estabilidade e começam a produzir citocinas pró-inflamatórias. Fisiologicamente, existe uma população de células Treg que expressam IFN- $\gamma$  e são a primeira linha de defesa durante as respostas imunes inflamatórias (Daniel et al., 2015). Entretanto, recentemente tem sido demonstrado que em algumas doenças autoimunes e ambientes inflamatórios as células Treg que expressam IFN- $\gamma$  tem uma diminuição nas suas capacidades supressoras (Gerriets et al., 2016; Sumida et al., 2018). Nossos

achados demonstram que a ausência de AMPK não tem efeito sobre a quantidade de células Treg produtoras de IFN- $\gamma$ . Portanto, essas células mantêm o fenótipo regulador apesar da ausência de AMPK $\alpha$ .

Uma vez que determinamos que as células Treg deficientes para AMPK $\alpha$  produzem muito mais Foxp3 que as controle, o passo seguinte foi analisar o que aconteceria se fosse usado um ativador alostérico específico para a subunidade alfa de AMPK $\alpha$ . Existem disponíveis no mercado vários ativadores de AMPK (J. Kim et al., 2016). Entre os mais usados, encontra-se o AICAR, o qual é um análogo da adenosina que simula um aumento da concentração de AMP intracelular e ativa indiretamente a subunidade gamma de AMPK (Herzig & Shaw, 2018; Y. Sun et al., 2007). Porém, esse composto tem bastante efeito inespecífico e independente de AMPK (Rao et al., 2016). Por este motivo, avaliamos o composto A769662, um ativador alostérico específico e potente de AMPK $\alpha$  (Gélinas, Mailleux, et al., 2018; Göransson et al., 2007). Nosso objetivo era observar o efeito do ativador sobre as células normais e usar as células deficientes como um controle da especificidade do ativador. Em conformidade com a nossa hipótese, o ativador A769662 reduz significativamente a diferenciação de células Treg normais em presença do TGF- $\beta$  enquanto teve um leve efeito nas células deficientes. Além disso, usamos também o composto AICAR para observar os efeitos sobre a diferenciação nas células Tregs, e em concordância com o exposto na literatura, ele induz uma potente produção de Foxp3 (Gualdoni et al., 2016). De maneira similar, as células deficientes também foram afetadas pelas ações do AICAR, demonstrando assim uma ação independente da subunidade alfa de AMPK.

Logo depois, nós procuramos entender quais são os mecanismos que potencializam a expressão de Foxp3 nas células Treg deficientes para AMPK $\alpha$ . Para isso, focamos em 3 vias de importância para as células Tregs. A primeira delas era o fato de que se AMPK $\alpha$  inibe a sinalização de TGF- $\beta$  fosforilando os Smad2/3 (H. Lin et al., 2015; Zhao et al., 2015), a deleção de AMPK $\alpha$  nas células T vai levar a um incremento da atividade dos Smad2/3. A dinâmica de fosforilação de Smad2/3 depende de vários fatores, como tempo, concentração e disponibilidade de substrato (Zi et al., 2012). Do mesmo modo, tem sido observado que o tratamento com TGF- $\beta$  induz uma fosforilação rápida dos Smad dentro dos primeiros 90 minutos de estímulo (Gao et al., 2009). Por esse motivo, nós avaliamos se o tratamento com o TGF- $\beta$  induz uma maior

fosforilação dos Smad2/3 nas células Treg deficientes para AMPK $\alpha$ . Como hipotetizado por nós, as células Treg deficientes apresentaram uma fosforilação maior do complexo Smad2/3, indicando uma maior sensibilidade ao TGF- $\beta$ . Uma maior atividade de Smad3 parece potencializar a transcrição de Foxp3 (Tone et al., 2008), sendo assim, AMPK $\alpha$  pode funcionar como um freio natural da sinalização por TGF- $\beta$  controlando sua intensidade e duração durante a diferenciação de células Tregs.

Em segundo lugar, avaliamos a O-Glcnaçiação de proteínas nas células deficientes para AMPK $\alpha$ . Nosso interesse nessa via vem do fato de que a glicosilação de proteínas ser importante para a estabilidade e função das células Tregs (B. Liu et al., 2019). Na mesma linha, AMPK $\alpha$  regula negativamente a O-Glcnaçiação de proteínas através da fosforilação do GFAT1, uma enzima indispensável e limitante da via das hexosaminas (Gélinas, Maillieux, et al., 2018; Zibrova et al., 2017). Células Tregs deficientes para AMPK $\alpha$  apresentam uma maior quantidade de proteínas glicosiladas que as células controle. Resultados não publicados de nosso laboratório mostram que a O-Glcnaçiação de proteínas é indispensável para a diferenciação de células Tregs diferenciadas após o tratamento com o TGF- $\beta$ . Por esse motivo, na ausência de AMPK $\alpha$ , pode existir um fluxo maior de nutrientes entrando na via das hexosaminas que pode culminar numa maior glicosilação de proteínas. Porém, se existe algum alvo especial de glicosilação que seja preferencialmente ativada na ausência de AMPK $\alpha$ , o mesmo precisa ser esclarecido. No entanto, a conexão que tem AMPK $\alpha$  com a via das hexosaminas e posterior glicosilação de proteínas é um interessante mecanismo para abordar (Gélinas, Dontaine, et al., 2018). Destaca-se que existe outra via que se conecta tanto a AMPK como na glicosilação de proteínas, é a via do mTOR (J. Xu et al., 2012).

Dessa maneira, nós quisemos estudar como se encontrava a sinalização de mTOR. Por esse motivo, foi avaliada a atividade da proteína quinase p70S6, um substrato direto de fosforilação por parte de mTOR (preferencialmente o complexo 1 conhecido como mTORC1) e um “readout” da ativação dessa via de sinalização (Datan et al., 2014). Nossos resultados mostram que em células Tregs deficientes para AMPK a fosforilação do resíduo 308 da proteína p70S6 encontra-se aumentado.

A atividade de mTOR na geração de células Tregs é controverso. Enquanto alguns estudos tem demonstrado que células Tregs apresentam uma maior atividade de mTOR, outros demonstram que a deleção genica de Raptor proteína principal do complexo mTORC1 inibe a função das Tregs (I.-H. Sun et al., 2018). Além disso, existe um aumento exacerbado da atividade do mTOR, o que é altamente prejudicial para as células Tregs (Zeng & Chi, 2017). Contudo, parece que as células iTregs com alta atividade de mTORC1 apresentam uma elevada capacidade supressora (De Rosa et al., 2015). Nesse sentido, é importante ressaltar que o  $Amp\alpha$  é ativado quando existe um aumento significativo de consumo de nutrientes estimulado por mTOR e funciona como um controle direto da atividade de mTOR, fosforilando algumas proteínas *downstream* desta via (González et al., 2020; J. Xu et al., 2012). Deste modo, a ausência de  $Amp\alpha$  pode estar promovendo um aumento da sinalização de mTOR nessas células. Assim, é importante se aprofundar em quais são os efeitos metabólicos que traz o aumento da sinalização de mTORC1 nessas células.

O papel do TGF- $\beta$  na diferenciação de células Tregs é bem caracterizada (S. Fu et al., 2004), apresentando um importante papel na indução da sua proliferação e diferenciação através da ativação do complexo Smad2/3 (Hombach et al., 2007). Uma característica interessante do TGF- $\beta$  é sua capacidade de reduzir a proliferação das células através da supressão do metabolismo glicolítico (Priyadharshini et al., 2018). Apesar de que alguns autores usam a IL-2 como um estímulo para promover a proliferação das células, nossos experimentos de diferenciação de células iTreg não contém IL-2, uma vez que nosso interesse está focado unicamente aos efeitos da sinalização por TGF- $\beta$ . Deste modo, era esperado uma menor proliferação por parte das células tratadas somente com TGF-B. Na ausência de  $Amp\alpha$ , essa diminuição da proliferação é ainda mais evidente e correlaciona com uma maior diferenciação. Em concordância com esse fato, já é descrito na literatura que células Tregs com menor taxa de proliferação apresentam maior capacidade supressora comparada com aquelas que proliferam mais (Gerriets et al., 2016). Este fato é devido a redução da utilização da glicólise e aumento do metabolismo oxidativo como fonte de energia (Gerriets et al., 2016).

Em virtude de nossos resultados conjuntos, decidimos explorar como se encontrava o metabolismo dessas células. AMPK $\alpha$  é o principal sensor da célula e sua principal

função é restaurar o balanço energético (Garcia & Shaw, 2017). Portanto, é de se esperar mudanças no metabolismo celular ante sua ausência. Por causa disso, nós medimos o metabolismo das células Treg deficientes para AMPK em tempo real através da metodologia *seahorse*. Essa metodologia permite a medição simultânea do uso metabólico da via glicolítica e da respiração mitocondrial por parte das células T (van der Windt et al., 2016). Em primeiro lugar, foi possível observar uma diminuição do ECAR nas células Treg deficientes para AMPK comparadas com as células controle. O ECAR é indicativo celular de uso da glicólise anaeróbica por parte da célula. A glicose é transformada em piruvato e posteriormente liberado ao meio em forma de lactato (Mookerjee & Brand, 2015). A diminuição de ECAR nas células deficientes para AMPK $\alpha$  tem várias implicações. A primeira delas é o fato de reagir menos a glicose quando as células são expostas a ela. Portanto, células deficientes para AMPK $\alpha$  usam menos a glicólise que as células controle. Por outro lado, está o fato de essas células ter uma menor capacidade glicolítica que as células controle. Esse resultado é interessante, porque mostra que AMPK $\alpha$  é importante para promover a glicólises nas células T tratados com TGF- $\beta$ .

Se bem tem sido mostrado que AMPK não é uma enzima pró-glicolítica por excelência, ele é importante para controlar o balanço entre a glicólise e o metabolismo mitocondrial (Kishton et al., 2016). Por exemplo, vários trabalhos reportam que a ativação de AMPK promove a glicólise através da fosforilação da enzima PFKFB3 (Doménech et al., 2015; F.-L. Li et al., 2018). Na mesma linha, a deleção de AMPK $\alpha$  reduz significativamente a glicólise durante diferenciação de células endoteliais (Q. Yang et al., 2018). Por outro lado, nas células T ativadas, a deficiência de AMPK não alterava o ECAR das células (Blagih et al., 2015). Então, AMPK $\alpha$  pode prover sim o uso de glicólise como fonte de energia de uma maneira dependente do contexto celular ou da via de sinalização envolvida. Dado que é conhecido que o TGF- $\beta$  tem a capacidade de inibir a glicólise nas células Tregs (Xuelu Chen et al., 2020; Priyadharshini et al., 2018), o efeito visto sobre a glicólise na ausência de AMPK $\alpha$  pode ser devido também a uma maior sensibilidade ao TGF- $\beta$ .

Simultaneamente avaliamos a taxa de consumo de oxigênio que permite analisar a respiração mitocondrial e funciona como um indicativo do status metabólico da célula (Smolina et al., 2017). Nossos resultados mostram que células deficientes para AMPK

apresentam basalmente um maior consumo de oxigênio, o que é indicativo de uma maior respiração mitocondrial. As células Tregs apresentam uma reprogramação metabólica que favorece a beta-oxidação de lipídeos e fosforilação oxidativa ao invés da glicólise (Howie et al., 2017). Essa reprogramação é dependente da expressão de Foxp3 e se correlaciona com uma maior estabilidade, função e adaptabilidade (Angelin et al., 2017; Gerriets et al., 2016; Howie et al., 2017). O que também é reforçado quando é visto na ausência de Foxp3, as células Treg ficam mais instáveis e altamente glicolíticas (Charbonnier et al., 2019). As células T deficientes para AMPK $\alpha$  também apresentam uma maior capacidade respiratória mitocondrial evidenciada pelo efeito que tem o FCCP para desacoplar a membrana mitocondrial e permitir um fluxo maior de íons através da cadeia transportadora de elétrons. As células Tregs diferenciadas com TGF- $\beta$  apresentam um maior consumo de oxigênio que as células naive (Howie et al., 2017), então o que a ausência de AMPK $\alpha$  está fazendo é potenciando a atividade mitocondrial nas células Tregs. Não existem trabalhos que avaliem o metabolismo celular das Tregs em ausência de AMPK $\alpha$ , uma vez que a informação disponível está com células CD4 efectoras, nas quais tem sido amplamente observado que AMPK $\alpha$  é indispensável para proliferação das células, capacidade respiratória mitocondrial, manutenção dos níveis de ATP e biogêneses mitocondrial (Blagih et al., 2015; Lepez et al., 2020). Em contraste, o TGF- $\beta$  tem sido descrito como um potente estimulante da fosforilação oxidativa e por conseguinte a respiração mitocondrial (Abe et al., 2013; Negmadjanov et al., 2015). Portanto, é possível que o fato das células Tregs deficientes para AMPK $\alpha$  apresentarem uma maior capacidade respiratória seja pelo fato delas serem mais sensíveis ao TGF- $\beta$  e produzir uma maior quantidade Foxp3.

Em seguida, nós medimos por ensaio colorimétrico a captação de glicose e liberação de lactato por parte das células Tregs deficientes para AMPK $\alpha$  e controle. Como era de se esperar, tendo em conta os resultados da bioenergética, células Treg deficientes para AMPK $\alpha$  captam menos glicose e, portanto, liberam menos lactato no meio. Vários trabalhos tem mostrado que a ativação de AMPK $\alpha$  promove uma maior captação de glicose a regular as atividades do transportadores Glut1 e Glut4 (Abbud et al., 2000; Habegger et al., 2012; Kjøbsted et al., 2019; Musi & Goodyear, 2003). Para verificar se a diminuição na captação de glicose era devida a uma menor produção do



transportador Glut1 o qual é o principal transportador de glicose em células T CD4 (Macintyre et al., 2014), nós avaliamos as células Treg deficientes para AMPK $\alpha$  e células controle por citometria. As células Treg deficientes apresentavam uma menor produção de Glut1 comparadas com as células controle. Essa chado indica que AMPK $\alpha$  regula a produção de Glut1 nas células e é responsável pela pouca captação de glicose nessas células. Paralelamente, determinamos o diâmetro celular por citometria de fluxo. O tamanho menor das células Treg deficientes é um indicativo adicional de que a célula se encontra em um estágio menos proliferativo e menos glicolítico (Gerriets et al., 2016; Saravia et al., 2020). Finalmente, devido a maior atividade mitocondrial é de se esperar uma maior produção de ROS mitocondrial. Para quantificar essa produção, usamos a sonda fluorescente MitoSox-Red, que permite medir a quantidade de superóxido mitocondrial gerado por citometria de fluxo (Kauffman et al., 2016). Uma vez que as células deficientes para AMPK $\alpha$  apresentam sinal maior por MFI da sonda MitoSox, é possível concluir que Tregs deficientes para AMPK $\alpha$  tem um aumento em sua respiração mitocondrial e, portanto, um aumento na produção de superóxido mitocondrial.

Até o momento, todos nossos resultados estão focados no estudo da deficiência de AMPK $\alpha$  nas células T CD4 totais através de o uso de um animal AMPK $\alpha^{fl/fl}$ CD4<sup>Cre/0</sup>. Os animais CD4<sup>CRE</sup> são uma importante ferramenta para o estudo das células T nas diferentes subpopulações células. Porém, devido ao fato de que a deleção gênica se dar em todas as células CD4/CD8 desde o estágio duplo positivo no timo, não é o modelo ideal para estudar o desenvolvimento das células T (Sharma & Zhu, 2014), principalmente pensando-se em uma abordagem posterior *in vivo*. Nossos resultados demonstram que na ausência de AMPK as células Treg diferenciam de modo semelhante às células controle. Tendo isto em conta, nós procuramos desenvolver um modelo animal que permitisse estudar o efeito da deleção de AMPK unicamente nas células FOXP3. Atualmente, existem disponíveis camundongos geneticamente modificados onde o promotor do gene FOXP3 está ligado com a recombinase CRE. O animal FOXP3<sup>YFP-CRE</sup> (<https://www.jax.org/strain/016959>), o qual, além de ter a região gênica de FOXP3 ligada a CRE recombinase, tem ligado também uma região que codifica para a proteína verde fluorescente sem afetar a função gênica, de modo tal que é possível sortear células FOXP3+ por sua fluorescência.

A criação dos camundongos  $AMPK\alpha^{f/f}Foxp3^{Cre/Cre}$  nos permitiu estudar diretamente a deficiência de  $AMPK\alpha$  nas células nTreg. Esse tipo de camundongo já tem sido utilizado amplamente em trabalhos que investigam a biologia das células Tregs (Rubtsov et al., 2008). Em primeiro lugar, nós analisamos se em condições de homeostasia existe uma diferença na quantidade de células  $Foxp3$  nos órgãos linfoides desses animais. Nossos resultados demonstram que a ausência de  $AMPK\alpha$  não afeta a porcentagem de células  $Foxp3$  nem sua expressão proteica. Nossos resultados são comparáveis a outros achados na literatura que demonstram que a ausência de  $AMPK\alpha$  não afeta a proporção de células Tregs nos diferentes órgãos linfoides (He et al., 2017; Timilshina et al., 2019; D. Wu et al., 2017; K. Yang et al., 2017). Esse resultado explica por que não existem muitos trabalhos abordando a importância de  $AMPK\alpha$  na função e estabilidade das nTregs, isto é, devido ao fato que a deleção da proteína quinase LKB1, a qual é uma das principais proteínas que fosforila  $AMPK\alpha$ , é deletéria para a função das células nTregs e culmina no desenvolvimento de um síndrome imunoproliferativa letal (Timilshina et al., 2019; D. Wu et al., 2017; K. Yang et al., 2017).

Porém, nós quisemos explorar mais profundamente o fenótipo das células nTreg na ausência de  $AMPK\alpha$ . Apesar da deficiência de  $AMPK\alpha$  nas células  $Foxp3$  positivas não afetar sua proporção nos diferentes órgãos linfoides, o próximo objetivo foi analisar a expressão dos marcadores de supressão e ativação dessas células poderiam estar sendo afetadas. Nossos resultados demonstram que na ausência de  $AMPK\alpha$  as células nTreg expressam mais CD25 e CD44 que as células controle. É importante ressaltar que a população de células Treg que expressa maiores quantidades de CD25 é classificada como uma população com maior capacidade de supressão (Xin Chen et al., 2010). Adicionalmente, a expressão de CD25 é associada com uma maior estabilidade de  $Foxp3$  nas células Treg (Huynh et al., 2015). O aumento de CD44 também é interessante, dado que a expressão de CD44 também correlaciona com o aumento das capacidades supressivas das nTregs, potencializando a produção de IL-10 e TGF- $\beta$  (Bollyky et al., 2009; T. Liu et al., 2009). Adicionalmente, as células Tregs CD44+ comumente são chamadas de Treg efetoras e se caracterizam por ter uma maior atividade, maior proliferação e maior expressão de moléculas de ativação e supressão (Smigiel et al., 2014). Por sua vez, a ICOS

facilita a transcrição de Foxp3, aumentando a sobrevivência e capacidade supressora das Treg (Q. Chen et al., 2018). Além disso, tem sido demonstrado que as subpopulações de Treg que expressam CD39 possuem uma capacidade supressiva maior (Borsellino et al., 2007). Esses resultados são interessantes, porque demonstram que na ausência de AMPK $\alpha$  as Tregs aumentam a expressão de várias moléculas associadas com sua capacidade supressiva.

A produção de IL10 por células Treg é um importante mecanismo de imunossupressão para controlar as respostas imunes exacerbadas (Maynard et al., 2007; Shevach & Thornton, 2014). Tendo isto em conta, nós procuramos investigar se existia uma alteração na porcentagem de células Foxp3 produtoras de IL10 na ausência de AMPK $\alpha$ . Surpreendentemente, encontramos um aumento significativo das células Foxp3 positivas para IL10 tanto por citometria como por ELISA. Esses resultados demonstram que em ausência de AMPK $\alpha$  as células FOXP3 produzem mais IL-10. Curiosamente, foi demonstrado que a população de células Treg que mais produz IL-10 é a induzida periféricamente sob o estímulo por TGF- $\beta$  (Maynard et al., 2007). Dessa forma, a ausência de AMPK $\alpha$  nas células Treg não só aumenta a expressão de moléculas de supressão como também produzem uma maior quantidade de IL-10, uma importante citocina anti-inflamatória, sugerindo assim uma maior capacidade de controle das respostas inflamatórias.

Nossos resultados anteriores mostraram que células T deficientes para Ampk $\alpha$  e diferenciadas com TGF- $\beta$  apresentam um aumento da sinalização de mTOR, fato este evidenciado pelo aumento da fosforilação da proteína p70S6. Por essa razão, nós procuramos avaliar o que aconteceria nas células nTreg que ao invés de serem estimuladas com TGF- $\beta$ , são estimuladas com IL-2. Curiosamente, essas células apresentam uma menor fosforilação da proteína p70S6, da proteína S6 Ribossomal e do AKT, indicando assim uma diminuição da atividade tanto de mTORC1 como mTORC2 nessas células. Existem diferenças metabólicas entre as Tregs diferenciadas a partir do TGF- $\beta$ , como as nTreg tímicas (Priyadharshini et al., 2018), posto que dependendo do estado da célula (proliferação, migração ou função supressora), vias metabólicas distintas são utilizadas (Gerriets et al., 2016; Kempkes et al., 2019). Por exemplo, a sinalização de IL-2 ativa tanto mTORC1 como de mTORC2 durante diferenciação de células T CD8 e T foliculares (Cornish et al., 2006;

Marzec et al., 2008; Ray et al., 2015). Curiosamente, a sinalização por IL-2 também pode induzir a O-Glcnaçiação de proteínas através da captação de glicose e glutamina (B. Liu et al., 2019; Ross & Cantrell, 2018; Swamy et al., 2016), e nossos resultados mostram que as células nTreg deficientes para AMPK $\alpha$  apresentam uma maior glicosilação de proteínas após o tratamento com IL-2. Por conseguinte, é necessário explorar qual é relação que tem a sinalização de IL-2 com AMPK $\alpha$  e como este pode estar regulando mTOR.

Paralelamente a esses resultados, nós avaliamos como estava o consumo de glicose e produção de lactato nas células nTreg deficientes para AMPK $\alpha$ . De maneira interessante, o consumo de glicose esta significativamente reduzido nas células nTreg deficientes para AMPK $\alpha$ . Quando avaliamos a expressão de enzimas relacionadas a via glicolítica, observamos uma redução significativa de HIF1A, LDHA, HK2, PKM2 ou GLUT1. Esses resultados explicam por que as células nTreg deficientes para AMPK $\alpha$  consomem menos glicose. O fato de que as células Tregs usam preferencialmente a fosforilação oxidativa que a glicólise é um fato bem documentado (Angelin et al., 2017; Gerriets et al., 2016), porém nos chamou a atenção o fato da enzima CPT1a, a qual se encarrega do transporte de lipídios através da membrana mitocondrial para sua  $\beta$ -oxidação (Raud et al., 2018), estar reduzida. Como resultado, as células nTregs deficientes para AMPK $\alpha$  não só apresentam redução da glicólise como potencialmente da  $\beta$ -oxidação. Por consequência, essas células podem estar tendo uma reprogramação metabólica completamente distinta. Uma das hipóteses seria que na incapacidade de captar glicose, as células nTreg usariam mais a glutamina disponível. Sob condições de limitação da glicose as células T conseguem usar a glutamina como fonte de energia para dar suporte ao metabolismo alimentando diretamente o ciclo de Krebs e posterior fosforilação oxidativa (Blagih et al., 2015). Potencialmente, parte dessa glutamina pode estar alimentando também a via das hexosaminas e potenciando a glicosilação de proteínas (Swamy et al., 2016). De fato, o aumento de atividade de AMPK $\alpha$  correlaciona com uma menor captação de glutamina (Ding et al., 2021; Ni et al., 2019). É importante ressaltar que é necessário aprofundar mais no papel que tem AMPK $\alpha$  na regulação do metabolismos das nTregs.

## ***8. CONCLUSÃO***

---

- A proteína quinase AMPK $\alpha$  regula a sinalização por TGF- $\beta$ , posto que para que aconteça a fosforilação do complexo de Smad2/3 é necessário a defosforilação de AMPK $\alpha$ .
- A deleção específica de AMPK $\alpha$  nas células T CD4, T CD8 ou Tregs não tem efeitos nas proporções dessas células em condições de homeostasia.
- A ativação alostérica de AMPK $\alpha$  inibe a diferenciação de células iTregs após o tratamento com o TGF- $\beta$ .
- Células T CD4 naive deficientes para AMPK $\alpha$  são mais susceptíveis aos efeitos do TGF- $\beta$ , promovendo uma maior atividade do complexo Smad2/3, maior transcrição do gene Foxp3, maior diferenciação de células Tregs e maior produção de moléculas de supressão.
- Células iTregs deficientes para AMPK $\alpha$  apresentam uma maior glicosilação de proteínas e uma maior atividade de mTOR, indicando uma reprogramação metabólica. Essas células têm uma menor capacidade de proliferação, uma menor capacidade glicolítica, enquanto apresentam uma maior atividade mitocondrial evidenciada por um aumento na sua respiração mitocondrial e produção de ROS mitocondrial.
- Células nTregs deficientes para AMPK $\alpha$  tem um fenótipo mais ativado, produzem mais moléculas de supressão como CD39, ICOS e maior produção de IL-10.
- Células nTregs deficientes para AMPK $\alpha$  tem uma menor atividade glicolítica, que correlaciona com uma menor atividade do mTOR e uma maior glicosilação de proteínas.

## ***9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

---

- Abbud, W., Habinowski, S., Zhang, J.-Z., Kendrew, J., Elkairi, F. S., Kemp, B. E., Witters, L. A., & Ismail-Beigi, F. (2000). Stimulation of AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) Is Associated with Enhancement of Glut1-Mediated Glucose Transport. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *380*(2), 347–352. <https://doi.org/10.1006/abbi.2000.1935>
- Abe, Y., Sakairi, T., Beeson, C., & Kopp, J. B. (2013). TGF- $\beta$ 1 stimulates mitochondrial oxidative phosphorylation and generation of reactive oxygen species in cultured mouse podocytes, mediated in part by the mTOR pathway. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, *305*(10), F1477–F1490. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00182.2013>
- Ahmadian, M., Abbott, M. J., Tang, T., Hudak, C. S. S., Kim, Y., Bruss, M., Hellerstein, M. K., Lee, H.-Y., Samuel, V. T., Shulman, G. I., Wang, Y., Duncan, R. E., Kang, C., & Sul, H. S. (2011). Desnutrin/ATGL Is Regulated by AMPK and Is Required for a Brown Adipose Phenotype. *Cell Metabolism*, *13*(6), 739–748. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.05.002>
- Aken, B. L., Ayling, S., Barrell, D., Clarke, L., Curwen, V., Fairley, S., Fernandez Banet, J., Billis, K., García Girón, C., Hourlier, T., Howe, K., Kähäri, A., Kokocinski, F., Martin, F. J., Murphy, D. N., Nag, R., Ruffier, M., Schuster, M., Tang, Y. A., ... Searle, S. M. J. (2016). The Ensembl gene annotation system. *Database*, *2016*, baw093. <https://doi.org/10.1093/database/baw093>
- Akkaya, B., Oya, Y., Akkaya, M., Al Souz, J., Holstein, A. H., Kamenyeva, O., Kabat, J., Matsumura, R., Dorward, D. W., Glass, D. D., & Shevach, E. M. (2019). Regulatory T cells mediate specific suppression by depleting peptide-MHC class II from dendritic cells. *Nature Immunology*, *20*(2), 218–231. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0280-2>
- Almeida, L., Lochner, M., Berod, L., & Sparwasser, T. (2016). Metabolic pathways in T cell activation and lineage differentiation. *Seminars in Immunology*, *28*(5), 514–524. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2016.10.009>
- Alvisi, G., Brummelman, J., Puccio, S., Mazza, E. M. C., Tomada, E. P., Losurdo, A., Zanon, V., Peano, C., Colombo, F. S., Scarpa, A., Alloisio, M., Vasanthakumar,



- A., Roychoudhuri, R., Kallikourdis, M., Pagani, M., Lopci, E., Novellis, P., Blume, J., Kallies, A., ... Lugli, E. (2020). IRF4 instructs effector Treg differentiation and immune suppression in human cancer. *Journal of Clinical Investigation*, *130*(6), 3137–3150. <https://doi.org/10.1172/JCI1130426>
- Anders, S., Pyl, P. T., & Huber, W. (2015). HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*, *31*(2), 166–169. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu638>
- Andrews, S. (2010). *A quality control tool for high throughput sequence data*. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
- Angelin, A., Gil-de-Gómez, L., Dahiya, S., Jiao, J., Guo, L., Levine, M. H., Wang, Z., Quinn, W. J., Kopinski, P. K., Wang, L., Akimova, T., Liu, Y., Bhatti, T. R., Han, R., Laskin, B. L., Baur, J. A., Blair, I. A., Wallace, D. C., Hancock, W. W., & Beier, U. H. (2017). Foxp3 Reprograms T Cell Metabolism to Function in Low-Glucose, High-Lactate Environments. *Cell Metabolism*, *25*(6), 1282-1293.e7. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.12.018>
- Antonioli, L., Pacher, P., Vizi, E. S., & Haskó, G. (2013). CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends in Molecular Medicine*, *19*(6), 355–367. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2013.03.005>
- Araki, K., & Ahmed, R. (2013). AMPK: A metabolic switch for CD8 + T-cell memory. *European Journal of Immunology*, *43*(4), 878–881. <https://doi.org/10.1002/eji.201343483>
- Artimo, P., Jonnalagedda, M., Arnold, K., Baratin, D., Csardi, G., de Castro, E., Duvaud, S., Flegel, V., Fortier, A., Gasteiger, E., Grosdidier, A., Hernandez, C., Ioannidis, V., Kuznetsov, D., Liechti, R., Moretti, S., Mostaguir, K., Redaschi, N., Rossier, G., ... Stockinger, H. (2012). ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic Acids Research*, *40*(W1), W597–W603. <https://doi.org/10.1093/nar/gks400>
- Baffi, T. R., Lordén, G., Wozniak, J. M., Feichtner, A., Yeung, W., Kornev, A. P., King, C. C., Del Rio, J. C., Limaye, A. J., Bogomolovas, J., Gould, C. M., Chen, J., Kennedy, E. J., Kannan, N., Gonzalez, D. J., Stefan, E., Taylor, S. S., &

- Newton, A. C. (2021). mTORC2 controls the activity of PKC and Akt by phosphorylating a conserved TOR interaction motif. *Science Signaling*, *14*(678), eabe4509. <https://doi.org/10.1126/scisignal.abe4509>
- Bai, A., Yong, M., Ma, A. G., Ma, Y., Weiss, C. R., Guan, Q., Bernstein, C. N., & Peng, Z. (2010). Novel Anti-Inflammatory Action of 5-Aminoimidazole-4-carboxamide Ribonucleoside with Protective Effect in Dextran Sulfate Sodium-Induced Acute and Chronic Colitis. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *333*(3), 717–725. <https://doi.org/10.1124/jpet.109.164954>
- Barbi, J., Pardoll, D., & Pan, F. (2013). Metabolic control of the Treg/Th17 axis. *Immunological Reviews*, *252*(1), 52–77. <https://doi.org/10.1111/imr.12029>
- Battaglia, M., Stabilini, A., Migliavacca, B., Horejs-Hoeck, J., Kaupper, T., & Roncarolo, M.-G. (2006). Rapamycin Promotes Expansion of Functional CD4 + CD25 + FOXP3 + Regulatory T Cells of Both Healthy Subjects and Type 1 Diabetic Patients. *The Journal of Immunology*, *177*(12), 8338–8347. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.12.8338>
- Bergeron, R., Ren, J. M., Cadman, K. S., Moore, I. K., Perret, P., Pypaert, M., Young, L. H., Semenkovich, C. F., & Shulman, G. I. (2001). Chronic activation of AMP kinase results in NRF-1 activation and mitochondrial biogenesis. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, *281*(6), E1340–E1346. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.2001.281.6.E1340>
- Blagih, J., Coulombe, F., Vincent, E. E., Dupuy, F., Galicia-Vázquez, G., Yurchenko, E., Raissi, T. C., van der Windt, G. J. W., Viollet, B., Pearce, E. L., Pelletier, J., Piccirillo, C. A., Krawczyk, C. M., Divangahi, M., & Jones, R. G. (2015). The Energy Sensor AMPK Regulates T Cell Metabolic Adaptation and Effector Responses In Vivo. *Immunity*, *42*(1), 41–54. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.12.030>
- Bollyky, P. L., Falk, B. A., Long, S. A., Preisinger, A., Braun, K. R., Wu, R. P., Evanko, S. P., Buckner, J. H., Wight, T. N., & Nepom, G. T. (2009). CD44 Costimulation Promotes Foxp3 + Regulatory T Cell Persistence and Function via Production of IL-2, IL-10, and TGF- $\beta$ . *The Journal of Immunology*, *183*(4), 2232–

2241. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900191>

- Boothby, I. C., Cohen, J. N., & Rosenblum, M. D. (2020). Regulatory T cells in skin injury: At the crossroads of tolerance and tissue repair. *Science Immunology*, 5(47), eaaz9631. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aaz9631>
- Borsellino, G., Kleinewietfeld, M., Di Mitri, D., Sternjak, A., Diamantini, A., Giometto, R., Höpner, S., Centonze, D., Bernardi, G., Dell'Acqua, M. L., Rossini, P. M., Battistini, L., Rötzschke, O., & Falk, K. (2007). Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood*, 110(4), 1225–1232. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-12-064527>
- Broschat, K. O., Gorka, C., Page, J. D., Martin-Berger, C. L., Davies, M. S., Huang, H., Gulve, E. A., Salsgiver, W. J., & Kasten, T. P. (2002). Kinetic Characterization of Human Glutamine-fructose-6-phosphate Amidotransferase I. *Journal of Biological Chemistry*, 277(17), 14764–14770. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201056200>
- Bullen, J. W., Balsbaugh, J. L., Chanda, D., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Neumann, D., & Hart, G. W. (2014). Cross-talk between Two Essential Nutrient-sensitive Enzymes. *Journal of Biological Chemistry*, 289(15), 10592–10606. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.523068>
- Bultot, L., Guigas, B., Von Wilamowitz-Moellendorff, A., Maisin, L., Vertommen, D., Hussain, N., Beullens, M., Guinovart, J. J., Foretz, M., Viollet, B., Sakamoto, K., Hue, L., & Rider, M. H. (2012). AMP-activated protein kinase phosphorylates and inactivates liver glycogen synthase. *Biochemical Journal*, 443(1), 193–203. <https://doi.org/10.1042/BJ20112026>
- Burmeister, Y., Lischke, T., Dahler, A. C., Mages, H. W., Lam, K.-P., Coyle, A. J., Kroczeck, R. A., & Hutloff, A. (2008). ICOS Controls the Pool Size of Effector-Memory and Regulatory T Cells. *The Journal of Immunology* Burmeister, Y., Lischke, T., Dahler, A. C., Mages, H. W., Lam, K.-P., Coyle, A. J., Kroczeck, R. A., & Hutloff, A. (2008). ICOS Controls the Pool Size of Effector-Memory and Regulatory T Cells. *The Journal of Immunology*, 180(2), 77, 180(2), 774–782.

<https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.2.774>

- Burzyn, D., Kuswanto, W., Kolodin, D., Shadrach, J. L., Cerletti, M., Jang, Y., Sefik, E., Tan, T. G., Wagers, A. J., Benoist, C., & Mathis, D. (2013). A Special Population of Regulatory T Cells Potentiates Muscle Repair. *Cell*, *155*(6), 1282–1295. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.054>
- Chapman, N. M., Zeng, H., Nguyen, T.-L. M., Wang, Y., Vogel, P., Dhungana, Y., Liu, X., Neale, G., Locasale, J. W., & Chi, H. (2018). mTOR coordinates transcriptional programs and mitochondrial metabolism of activated Treg subsets to protect tissue homeostasis. *Nature Communications*, *9*(1), 2095. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04392-5>
- Charbonnier, L.-M., Cui, Y., Stephen-Victor, E., Harb, H., Lopez, D., Bleesing, J. J., Garcia-Lloret, M. I., Chen, K., Ozen, A., Carmeliet, P., Li, M. O., Pellegrini, M., & Chatila, T. A. (2019). Functional reprogramming of regulatory T cells in the absence of Foxp3. *Nature Immunology*, *20*(9), 1208–1219. <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0442-x>
- Chen, Q., Mo, L., Cai, X., Wei, L., Xie, Z., Li, H., Li, J., & Hu, Z. (2018). ICOS signal facilitates Foxp3 transcription to favor suppressive function of regulatory T cells. *International Journal of Medical Sciences*, *15*(7), 666–673. <https://doi.org/10.7150/ijms.23940>
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., & Wahl, S. M. (2003). Conversion of Peripheral CD4 + CD25 – Naive T Cells to CD4 + CD25 + Regulatory T Cells by TGF- $\beta$  Induction of Transcription Factor Foxp3. *The Journal of Experimental Medicine*, *198*(12), 1875–1886. <https://doi.org/10.1084/jem.20030152>
- Chen, W., & Konkel, J. E. (2015). Development of thymic Foxp3(+) regulatory T cells: TGF- $\beta$  matters. *European Journal of Immunology*, *45*(4), 958–965. <https://doi.org/10.1002/eji.201444999>
- Chen, Xin, Subleski, J. J., Hamano, R., Howard, O. M. Z., Wiltrout, R. H., & Oppenheim, J. J. (2010). Co-expression of TNFR2 and CD25 identifies more of the functional CD4 + FOXP3 + regulatory T cells in human peripheral blood.

- European Journal of Immunology*, 40(4), 1099–1106.  
<https://doi.org/10.1002/eji.200940022>
- Chen, Xuelu, Feng, L., Li, S., Long, D., Shan, J., & Li, Y. (2020). TGF- $\beta$ 1 maintains Foxp3 expression and inhibits glycolysis in natural regulatory T cells via PP2A-mediated suppression of mTOR signaling. *Immunology Letters*, 226, 31–37.  
<https://doi.org/10.1016/j.imlet.2020.06.016>
- Chen, Xuelu, Li, S., Long, D., Shan, J., & Li, Y. (2021). Rapamycin facilitates differentiation of regulatory T cells via enhancement of oxidative phosphorylation. *Cellular Immunology*, 365, 104378.  
<https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2021.104378>
- Chi, H. (2012). Regulation and function of mTOR signalling in T cell fate decisions. *Nature Reviews Immunology*, 12(5), 325–338. <https://doi.org/10.1038/nri3198>
- Chinen, T., Kannan, A. K., Levine, A. G., Fan, X., Klein, U., Zheng, Y., Gasteiger, G., Feng, Y., Fontenot, J. D., & Rudensky, A. Y. (2016). An essential role for the IL-2 receptor in Treg cell function. *Nature Immunology*, 17(11), 1322–1333.  
<https://doi.org/10.1038/ni.3540>
- Choi, Y., & Chan, A. P. (2015). PROVEAN web server: a tool to predict the functional effect of amino acid substitutions and indels. *Bioinformatics*, 31(16), 2745–2747.  
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv195>
- Chougnet, C., & Hildeman, D. (2016). Helios—controller of Treg stability and function. *Translational Cancer Research*, 5(S2), S338–S341.  
<https://doi.org/10.21037/tcr.2016.07.37>
- Cipolletta, D., Cohen, P., Spiegelman, B. M., Benoist, C., & Mathis, D. (2015). Appearance and disappearance of the mRNA signature characteristic of T reg cells in visceral adipose tissue: Age, diet, and PPAR $\gamma$  effects. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(2), 482–487.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1423486112>
- Colamatteo, A., Carbone, F., Bruzzaniti, S., Galgani, M., Fusco, C., Maniscalco, G. T., Di Rella, F., de Candia, P., & De Rosa, V. (2020). Molecular Mechanisms Controlling Foxp3 Expression in Health and Autoimmunity: From Epigenetic to

- Post-translational Regulation. *Frontiers in Immunology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.03136>
- Copeland, R. J., Bullen, J. W., & Hart, G. W. (2008). Cross-talk between GlcNAcylation and phosphorylation: roles in insulin resistance and glucose toxicity. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 295(1), E17–E28. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90281.2008>
- Cork, G. K., Thompson, J., & Slawson, C. (2018). Real Talk: The Inter-play Between the mTOR, AMPK, and Hexosamine Biosynthetic Pathways in Cell Signaling. *Frontiers in Endocrinology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00522>
- Cornish, G. H., Sinclair, L. V., & Cantrell, D. A. (2006). Differential regulation of T-cell growth by IL-2 and IL-15. *Blood*, 108(2), 600–608. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-12-4827>
- Cortez, J. T., Montauti, E., Shifrut, E., Gatchalian, J., Zhang, Y., Shaked, O., Xu, Y., Roth, T. L., Simeonov, D. R., Zhang, Y., Chen, S., Li, Z., Woo, J. M., Ho, J., Vogel, I. A., Prator, G. Y., Zhang, B., Lee, Y., Sun, Z., ... Fang, D. (2020). CRISPR screen in regulatory T cells reveals modulators of Foxp3. *Nature*, 582(7812), 416–420. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2246-4>
- Cully, M. (2017). Autoimmunity: LKB1 helps Treg cells battle exhaustion. *Nature Reviews Immunology*, 17(10), 592–593. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.116>
- Daniel, V., Trojan, K., Adamek, M., & Opelz, G. (2015). IFN $\gamma$ + Treg in-vivo and in-vitro represent both activated nTreg and peripherally induced aTreg and remain phenotypically stable in-vitro after removal of the stimulus. *BMC Immunology*, 16, 45. <https://doi.org/10.1186/s12865-015-0111-2>
- Datan, E., Shirazian, A., Benjamin, S., Matassov, D., Tinari, A., Malorni, W., Lockshin, R. A., Garcia-Sastre, A., & Zakeri, Z. (2014). mTOR/p70S6K signaling distinguishes routine, maintenance-level autophagy from autophagic cell death during influenza A infection. *Virology*, 452–453, 175–190. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.01.008>
- Davidson, T. S., DiPaolo, R. J., Andersson, J., & Shevach, E. M. (2007). Cutting Edge: IL-2 Is Essential for TGF- $\beta$ -Mediated Induction of Foxp3 + T Regulatory

- Cells. *The Journal of Immunology*, 178(7), 4022–4026.  
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.7.4022>
- De Rosa, V., Galgani, M., Porcellini, A., Colamatteo, A., Santopaolo, M., Zuchegna, C., Romano, A., De Simone, S., Procaccini, C., La Rocca, C., Carrieri, P. B., Maniscalco, G. T., Salvetti, M., Buscarinu, M. C., Franzese, A., Mozzillo, E., La Cava, A., & Matarese, G. (2015). Glycolysis controls the induction of human regulatory T cells by modulating the expression of FOXP3 exon 2 splicing variants. *Nature Immunology*, 16(11), 1174–1184.  
<https://doi.org/10.1038/ni.3269>
- Dehairs, J., Talebi, A., Cherifi, Y., & Swinnen, J. V. (2016). CRISP-ID: decoding CRISPR mediated indels by Sanger sequencing. *Scientific Reports*, 6, 28973.  
<https://doi.org/10.1038/srep28973>
- Delgoffe, G. M., Kole, T. P., Zheng, Y., Zarek, P. E., Matthews, K. L., Xiao, B., Worley, P. F., Kozma, S. C., & Powell, J. D. (2009). The mTOR Kinase Differentially Regulates Effector and Regulatory T Cell Lineage Commitment. *Immunity*, 30(6), 832–844. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.04.014>
- Ding, J., Gou, Q., Jia, X., Liu, Q., Jin, J., Shi, J., & Hou, Y. (2021). AMPK phosphorylates PPAR $\delta$  to mediate its stabilization, promote glucose and glutamine uptake, and inhibit colon tumor growth. *Journal of Biological Chemistry*, 100954. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100954>
- Diskin, B., Adam, S., Cassini, M. F., Sanchez, G., Liria, M., Aykut, B., Buttar, C., Li, E., Sundberg, B., Salas, R. D., Chen, R., Wang, J., Kim, M., Farooq, M. S., Nguy, S., Fedele, C., Tang, K. H., Chen, T., Wang, W., ... Miller, G. (2020). PD-L1 engagement on T cells promotes self-tolerance and suppression of neighboring macrophages and effector T cells in cancer. *Nature Immunology*, 21(4), 442–454. <https://doi.org/10.1038/s41590-020-0620-x>
- Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., & Gingeras, T. R. (2013). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, 29(1), 15–21.  
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635>

- Doménech, E., Maestre, C., Esteban-Martínez, L., Partida, D., Pascual, R., Fernández-Miranda, G., Seco, E., Campos-Olivas, R., Pérez, M., Megias, D., Allen, K., López, M., Saha, A. K., Velasco, G., Rial, E., Méndez, R., Boya, P., Salazar-Roa, M., & Malumbres, M. (2015). AMPK and PFKFB3 mediate glycolysis and survival in response to mitophagy during mitotic arrest. *Nature Cell Biology*, *17*(10), 1304–1316. <https://doi.org/10.1038/ncb3231>
- Dudda, J. C., Perdue, N., Bachtanian, E., & Campbell, D. J. (2008). Foxp3+ regulatory T cells maintain immune homeostasis in the skin. *Journal of Experimental Medicine*, *205*(7), 1559–1565. <https://doi.org/10.1084/jem.20072594>
- Dumitru, C., Kabat, A. M., & Maloy, K. J. (2018). Metabolic Adaptations of CD4+ T Cells in Inflammatory Disease. *Frontiers in Immunology*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00540>
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, *32*(5), 1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- Eguchi, S., Oshiro, N., Miyamoto, T., Yoshino, K., Okamoto, S., Ono, T., Kikkawa, U., & Yonezawa, K. (2009). AMP-activated protein kinase phosphorylates glutamine : fructose-6-phosphate amidotransferase 1 at Ser243 to modulate its enzymatic activity. *Genes to Cells*, *14*(2), 179–189. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2008.01260.x>
- Fracchia, K. M., Pai, C. Y., & Walsh, C. M. (2013). Modulation of T Cell Metabolism and Function through Calcium Signaling. *Frontiers in Immunology*, *4*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00324>
- Francisco, L. M., Salinas, V. H., Brown, K. E., Vanguri, V. K., Freeman, G. J., Kuchroo, V. K., & Sharpe, A. H. (2009). PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *The Journal of Experimental Medicine*, *206*(13), 3015–3029. <https://doi.org/10.1084/jem.20090847>
- Fu, S., Zhang, N., Yopp, A. C., Chen, D., Mao, M., Chen, D., Zhang, H., Ding, Y., &



- Bromberg, J. S. (2004). TGF- $\beta$  Induces Foxp3 + T-Regulatory Cells from CD4 + CD25 - Precursors. *American Journal of Transplantation*, 4(10), 1614–1627. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2004.00566.x>
- Fu, W., Ergun, A., Lu, T., Hill, J. A., Haxhinasto, S., Fassett, M. S., Gazit, R., Adoro, S., Glimcher, L., Chan, S., Kastner, P., Rossi, D., Collins, J. J., Mathis, D., & Benoist, C. (2012). A multiply redundant genetic switch “locks in” the transcriptional signature of regulatory T cells. *Nature Immunology*, 13(10), 972–980. <https://doi.org/10.1038/ni.2420>
- Fullerton, M. D., Galic, S., Marcinko, K., Sikkema, S., Pulinilkunnil, T., Chen, Z.-P., O’Neill, H. M., Ford, R. J., Palanivel, R., O’Brien, M., Hardie, D. G., Macaulay, S. L., Schertzer, J. D., Dyck, J. R. B., van Denderen, B. J., Kemp, B. E., & Steinberg, G. R. (2013). Single phosphorylation sites in Acc1 and Acc2 regulate lipid homeostasis and the insulin-sensitizing effects of metformin. *Nature Medicine*, 19(12), 1649–1654. <https://doi.org/10.1038/nm.3372>
- Gandhi, R., Farez, M. F., Wang, Y., Kozoriz, D., Quintana, F. J., & Weiner, H. L. (2010). Cutting Edge: Human Latency-Associated Peptide + T Cells: A Novel Regulatory T Cell Subset. *The Journal of Immunology*, 184(9), 4620–4624. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903329>
- Gao, S., Alarcón, C., Sapkota, G., Rahman, S., Chen, P.-Y., Goerner, N., Macias, M. J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., & Massagué, J. (2009). Ubiquitin Ligase Nedd4L Targets Activated Smad2/3 to Limit TGF- $\beta$  Signaling. *Molecular Cell*, 36(3), 457–468. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.09.043>
- Garcia, D., & Shaw, R. J. (2017). AMPK: Mechanisms of Cellular Energy Sensing and Restoration of Metabolic Balance. *Molecular Cell*, 66(6), 789–800. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.05.032>
- Gélinas, R., Dontaine, J., Horman, S., Beauloye, C., Bultot, L., & Bertrand, L. (2018). AMP-Activated Protein Kinase and O-GlcNAcylation, Two Partners Tightly Connected to Regulate Key Cellular Processes. *Frontiers in Endocrinology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00519>
- Gélinas, R., Mailleux, F., Dontaine, J., Bultot, L., Demeulder, B., Ginion, A.,

- Daskalopoulos, E. P., Esfahani, H., Dubois-Deruy, E., Lauzier, B., Gauthier, C., Olson, A. K., Bouchard, B., Des Rosiers, C., Viollet, B., Sakamoto, K., Balligand, J.-L., Vanoverschelde, J.-L., Beauloye, C., ... Bertrand, L. (2018). AMPK activation counteracts cardiac hypertrophy by reducing O-GlcNAcylation. *Nature Communications*, *9*(1), 374. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02795-4>
- Gerriets, V. A., Kishton, R. J., Johnson, M. O., Cohen, S., Siska, P. J., Nichols, A. G., Warmoes, M. O., de Cubas, A. A., MacIver, N. J., Locasale, J. W., Turka, L. A., Wells, A. D., & Rathmell, J. C. (2016). Foxp3 and Toll-like receptor signaling balance Treg cell anabolic metabolism for suppression. *Nature Immunology*, *17*(12), 1459–1466. <https://doi.org/10.1038/ni.3577>
- Geuking, M. B., Cahenzli, J., Lawson, M. A. E., Ng, D. C. K., Slack, E., Hapfelmeier, S., McCoy, K. D., & Macpherson, A. J. (2011). Intestinal Bacterial Colonization Induces Mutualistic Regulatory T Cell Responses. *Immunity*, *34*(5), 794–806. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.03.021>
- González, A., Hall, M. N., Lin, S.-C., & Hardie, D. G. (2020). AMPK and TOR: The Yin and Yang of Cellular Nutrient Sensing and Growth Control. *Cell Metabolism*, *31*(3), 472–492. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.01.015>
- Göransson, O., McBride, A., Hawley, S. A., Ross, F. A., Shpiro, N., Foretz, M., Viollet, B., Hardie, D. G., & Sakamoto, K. (2007). Mechanism of Action of A-769662, a Valuable Tool for Activation of AMP-activated Protein Kinase. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(45), 32549–32560. <https://doi.org/10.1074/jbc.M706536200>
- Graydon, C. G., Mohideen, S., & Fowke, K. R. (2021). LAG3's Enigmatic Mechanism of Action. *Frontiers in Immunology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.615317>
- Gualdoni, G. A., Mayer, K. A., Göschl, L., Boucheron, N., Ellmeier, W., & Zlabinger, G. J. (2016). The AMP analog AICAR modulates the T reg /T h 17 axis through enhancement of fatty acid oxidation. *The FASEB Journal*, *30*(11), 3800–3809. <https://doi.org/10.1096/fj.201600522R>
- Guy, C. S., Vignali, K. M., Temirov, J., Bettini, M. L., Overacre, A. E., Smeltzer, M.,

- Zhang, H., Huppa, J. B., Tsai, Y.-H., Lobry, C., Xie, J., Dempsey, P. J., Crawford, H. C., Aifantis, I., Davis, M. M., & Vignali, D. A. A. (2013). Distinct TCR signaling pathways drive proliferation and cytokine production in T cells. *Nature Immunology*, *14*(3), 262–270. <https://doi.org/10.1038/ni.2538>
- Gwinn, D. M., Shackelford, D. B., Egan, D. F., Mihaylova, M. M., Mery, A., Vasquez, D. S., Turk, B. E., & Shaw, R. J. (2008). AMPK Phosphorylation of Raptor Mediates a Metabolic Checkpoint. *Molecular Cell*, *30*(2), 214–226. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.03.003>
- Gwinn, D. M., & Shaw, R. J. (2010). *AMPK Control of mTOR Signaling and Growth* (pp. 49–75). [https://doi.org/10.1016/S1874-6047\(10\)28003-4](https://doi.org/10.1016/S1874-6047(10)28003-4)
- Habegger, K. M., Hoffman, N. J., Ridenour, C. M., Brozinick, J. T., & Elmendorf, J. S. (2012). AMPK Enhances Insulin-Stimulated GLUT4 Regulation via Lowering Membrane Cholesterol. *Endocrinology*, *153*(5), 2130–2141. <https://doi.org/10.1210/en.2011-2099>
- Hanover, J. A., Krause, M. W., & Love, D. C. (2012). linking metabolism to epigenetics through O-GlcNAcylation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *13*(5), 312–321. <https://doi.org/10.1038/nrm3334>
- Hardie, D. G., Ross, F. A., & Hawley, S. A. (2012). AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *13*(4), 251–262. <https://doi.org/10.1038/nrm3311>
- He, N., Fan, W., Henriquez, B., Yu, R. T., Atkins, A. R., Liddle, C., Zheng, Y., Downes, M., & Evans, R. M. (2017). Metabolic control of regulatory T cell (Treg) survival and function by Lkb1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *114*(47), 12542–12547. <https://doi.org/10.1073/pnas.1715363114>
- Hegazy, A. N., & Powrie, F. (2015). Microbiota ROR $\gamma$  regulates intestinal suppressor T cells. *Science*, *349*(6251), 929–930. <https://doi.org/10.1126/science.aad0865>
- Herzig, S., & Shaw, R. J. (2018). AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *19*(2), 121–135. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.95>
- Hill, J. A., Feuerer, M., Tash, K., Haxhinasto, S., Perez, J., Melamed, R., Mathis, D.,

- & Benoist, C. (2007). Foxp3 Transcription-Factor-Dependent and -Independent Regulation of the Regulatory T Cell Transcriptional Signature. *Immunity*, 27(5), 786–800. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.09.010>
- Hombach, A. A., Kofler, D., Hombach, A., Rappl, G., & Abken, H. (2007). Effective Proliferation of Human Regulatory T Cells Requires a Strong Costimulatory CD28 Signal That Cannot Be Substituted by IL-2. *The Journal of Immunology*, 179(11), 7924–7931. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.11.7924>
- Howie, D., Cobbold, S. P., Adams, E., Ten Bokum, A., Necula, A. S., Zhang, W., Huang, H., Roberts, D. J., Thomas, B., Hester, S. S., Vaux, D. J., Betz, A. G., & Waldmann, H. (2017). Foxp3 drives oxidative phosphorylation and protection from lipotoxicity. *JCI Insight*, 2(3). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.89160>
- Huter, E. N., Punkosdy, G. A., Glass, D. D., Cheng, L. I., Ward, J. M., & Shevach, E. M. (2008). TGF- $\beta$ -induced Foxp3 + regulatory T cells rescue scurfy mice. *European Journal of Immunology*, 38(7), 1814–1821. <https://doi.org/10.1002/eji.200838346>
- Huynh, A., DuPage, M., Priyadharshini, B., Sage, P. T., Quiros, J., Borges, C. M., Townamchai, N., Gerriets, V. A., Rathmell, J. C., Sharpe, A. H., Bluestone, J. A., & Turka, L. A. (2015). Control of PI(3) kinase in Treg cells maintains homeostasis and lineage stability. *Nature Immunology*, 16(2), 188–196. <https://doi.org/10.1038/ni.3077>
- Jager, S., Handschin, C., St.-Pierre, J., & Spiegelman, B. M. (2007). AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(29), 12017–12022. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705070104>
- Jhanwar-Uniyal, M., Wainwright, J. V., Mohan, A. L., Tobias, M. E., Murali, R., Gandhi, C. D., & Schmidt, M. H. (2019). Diverse signaling mechanisms of mTOR complexes: mTORC1 and mTORC2 in forming a formidable relationship. *Advances in Biological Regulation*, 72, 51–62. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2019.03.003>
- John P Konhilas, Y. L. (2015). AMP-Activated Protein Kinase Signalling in Cancer

- and Cardiac Hypertrophy. *Cardiovascular Pharmacology: Open Access*, 04(03).  
<https://doi.org/10.4172/2329-6607.1000154>
- Jornayvaz, F. R., & Shulman, G. I. (2010). Regulation of mitochondrial biogenesis. *Essays in Biochemistry*, 47, 69–84. <https://doi.org/10.1042/bse0470069>
- Josefowicz, S. Z., Lu, L.-F., & Rudensky, A. Y. (2012). Regulatory T Cells: Mechanisms of Differentiation and Function. *Annual Review of Immunology*, 30(1), 531–564. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141623>
- Kanamori, M., Nakatsukasa, H., Okada, M., Lu, Q., & Yoshimura, A. (2016). Induced Regulatory T Cells: Their Development, Stability, and Applications. *Trends in Immunology*, 37(11), 803–811. <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.08.012>
- Kauffman, M., Kauffman, M., Traore, K., Zhu, H., Trush, M., Jia, Z., & Li, Y. (2016). MitoSOX-Based Flow Cytometry for Detecting Mitochondrial ROS. *Reactive Oxygen Species*. <https://doi.org/10.20455/ros.2016.865>
- Kempkes, R. W. M., Joosten, I., Koenen, H. J. P. M., & He, X. (2019). Metabolic Pathways Involved in Regulatory T Cell Functionality. *Frontiers in Immunology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02839>
- Kim, D.-H., Sarbassov, D. D., Ali, S. M., King, J. E., Latek, R. R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., & Sabatini, D. M. (2002). mTOR Interacts with Raptor to Form a Nutrient-Sensitive Complex that Signals to the Cell Growth Machinery. *Cell*, 110(2), 163–175. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00808-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00808-5)
- Kim, J.-H., Kim, B. S., & Lee, S.-K. (2020). Regulatory T Cells in Tumor Microenvironment and Approach for Anticancer Immunotherapy. *Immune Network*, 20(1). <https://doi.org/10.4110/in.2020.20.e4>
- Kim, J. H., Park, J.-M., Yea, K., Kim, H. W., Suh, P.-G., & Ryu, S. H. (2010). Phospholipase D1 Mediates AMP-Activated Protein Kinase Signaling for Glucose Uptake. *PLoS ONE*, 5(3), e9600. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009600>
- Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., & Guan, K.-L. (2011). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nature Cell Biology*, 13(2), 132–141. <https://doi.org/10.1038/ncb2152>

- Kim, J., Yang, G., Kim, Y., Kim, J., & Ha, J. (2016). AMPK activators: mechanisms of action and physiological activities. *Experimental & Molecular Medicine*, *48*(4), e224–e224. <https://doi.org/10.1038/emm.2016.16>
- Kishton, R. J., Barnes, C. E., Nichols, A. G., Cohen, S., Gerriets, V. A., Siska, P. J., Macintyre, A. N., Goraksha-Hicks, P., de Cubas, A. A., Liu, T., Warmoes, M. O., Abel, E. D., Yeoh, A. E. J., Gershon, T. R., Rathmell, W. K., Richards, K. L., Locasale, J. W., & Rathmell, J. C. (2016). AMPK Is Essential to Balance Glycolysis and Mitochondrial Metabolism to Control T-ALL Cell Stress and Survival. *Cell Metabolism*, *23*(4), 649–662. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.03.008>
- Kjøbsted, R., Roll, J. L. W., Jørgensen, N. O., Birk, J. B., Foretz, M., Viollet, B., Chadt, A., Al-Hasani, H., & Wojtaszewski, J. F. P. (2019). AMPK and TBC1D1 Regulate Muscle Glucose Uptake After, but Not During, Exercise and Contraction. *Diabetes*, *68*(7), 1427–1440. <https://doi.org/10.2337/db19-0050>
- Klein, L., Kyewski, B., Allen, P. M., & Hogquist, K. A. (2014). Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). *Nature Reviews Immunology*, *14*(6), 377–391. <https://doi.org/10.1038/nri3667>
- Kuswanto, W., Burzyn, D., Panduro, M., Wang, K. K., Jang, Y. C., Wagers, A. J., Benoist, C., & Mathis, D. (2016). Poor Repair of Skeletal Muscle in Aging Mice Reflects a Defect in Local, Interleukin-33-Dependent Accumulation of Regulatory T Cells. *Immunity*, *44*(2), 355–367. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.01.009>
- Laakso, S. M., Laurinolli, T.-T., Rossi, L. H., Lehtoviita, A., Sairanen, H., Perheentupa, J., Kekäläinen, E., & Arstila, T. P. (2010). Regulatory T cell defect in APECED patients is associated with loss of naive FOXP3+ precursors and impaired activated population. *Journal of Autoimmunity*, *35*(4), 351–357. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2010.07.008>
- Laan, M., & Peterson, P. (2013). The many faces of aire in central tolerance. *Frontiers in Immunology*, *4*(October), 326. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00326>
- Lee, H.-M., Bautista, J. L., & Hsieh, C.-S. (2011). *Thymic and Peripheral*

- Differentiation of Regulatory T Cells* (pp. 25–71). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387827-4.00002-4>
- Lee, W., & Lee, G. R. (2018). Transcriptional regulation and development of regulatory T cells. *Experimental & Molecular Medicine*, *50*(3), e456–e456. <https://doi.org/10.1038/emm.2017.313>
- Lepez, A., Pirnay, T., Denanglaire, S., Perez-Morga, D., Vermeersch, M., Leo, O., & Andris, F. (2020). Long-term T cell fitness and proliferation is driven by AMPK-dependent regulation of reactive oxygen species. *Scientific Reports*, *10*(1), 21673. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78715-2>
- Li, C., Spallanzani, R. G., & Mathis, D. (2020). Visceral adipose tissue Tregs and the cells that nurture them. *Immunological Reviews*, *295*(1), 114–125. <https://doi.org/10.1111/imr.12850>
- Li, F.-L., Liu, J.-P., Bao, R.-X., Yan, G., Feng, X., Xu, Y.-P., Sun, Y.-P., Yan, W., Ling, Z.-Q., Xiong, Y., Guan, K.-L., & Yuan, H.-X. (2018). Acetylation accumulates PFKFB3 in cytoplasm to promote glycolysis and protects cells from cisplatin-induced apoptosis. *Nature Communications*, *9*(1), 508. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-02950-5>
- Li, M. O., & Rudensky, A. Y. (2016). T cell receptor signalling in the control of regulatory T cell differentiation and function. *Nature Reviews Immunology*, *16*(4), 220–233. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.26>
- Li, N.-S., Zou, J.-R., Lin, H., Ke, R., He, X.-L., Xiao, L., Huang, D., Luo, L., Lv, N., & Luo, Z. (2016). LKB1/AMPK inhibits TGF- $\beta$ 1 production and the TGF- $\beta$  signaling pathway in breast cancer cells. *Tumor Biology*, *37*(6), 8249–8258. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-4639-9>
- Li, W., Saud, S. M., Young, M. R., Chen, G., & Hua, B. (2015). Targeting AMPK for cancer prevention and treatment. *Oncotarget*, *6*(10), 7365–7378. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3629>
- Li, Y., Xie, M., Men, L., & Du, J. (2019). O-GlcNAcylation in immunity and inflammation: An intricate system (Review). *International Journal of Molecular Medicine*. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2019.4238>

- Li, Y., Xu, S., Mihaylova, M. M., Zheng, B., Hou, X., Jiang, B., Park, O., Luo, Z., Lefai, E., Shyy, J. Y.-J., Gao, B., Wierzbicki, M., Verbeuren, T. J., Shaw, R. J., Cohen, R. A., & Zang, M. (2011). AMPK Phosphorylates and Inhibits SREBP Activity to Attenuate Hepatic Steatosis and Atherosclerosis in Diet-Induced Insulin-Resistant Mice. *Cell Metabolism*, *13*(4), 376–388. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.03.009>
- Liao, G., Nayak, S., Regueiro, J. R., Berger, S. B., Detre, C., Romero, X., de Waal Malefyt, R., Chatila, T. A., Herzog, R. W., & Terhorst, C. (2010). GITR engagement preferentially enhances proliferation of functionally competent CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells. *International Immunology*, *22*(4), 259–270. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxq001>
- Lim, J.-Y., Oh, M.-A., Kim, W. H., Sohn, H.-Y., & Park, S. I. (2012). AMP-activated protein kinase inhibits TGF- $\beta$ -induced fibrogenic responses of hepatic stellate cells by targeting transcriptional coactivator p300. *Journal of Cellular Physiology*, *227*(3), 1081–1089. <https://doi.org/10.1002/jcp.22824>
- Lim, S. A., Wei, J., Nguyen, T.-L. M., Shi, H., Su, W., Palacios, G., Dhungana, Y., Chapman, N. M., Long, L., Saravia, J., Vogel, P., & Chi, H. (2021). Lipid signalling enforces functional specialization of Treg cells in tumours. *Nature*, *591*(7849), 306–311. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03235-6>
- Lin, H., Li, N., He, H., Ying, Y., Sunkara, S., Luo, L., Lv, N., Huang, D., & Luo, Z. (2015). AMPK Inhibits the Stimulatory Effects of TGF- on Smad2/3 Activity, Cell Migration, and Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Molecular Pharmacology*, *88*(6), 1062–1071. <https://doi.org/10.1124/mol.115.099549>
- Lin, J., Wu, H., Tarr, P. T., Zhang, C.-Y., Wu, Z., Boss, O., Michael, L. F., Puigserver, P., Isotani, E., Olson, E. N., Lowell, B. B., Bassel-Duby, R., & Spiegelman, B. M. (2002). Transcriptional co-activator PGC-1 $\alpha$  drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature*, *418*(6899), 797–801. <https://doi.org/10.1038/nature00904>
- Liu, B., Salgado, O. C., Singh, S., Hippen, K. L., Maynard, J. C., Burlingame, A. L., Ball, L. E., Blazar, B. R., Farrar, M. A., Hogquist, K. A., & Ruan, H.-B. (2019). The lineage stability and suppressive program of regulatory T cells require



- protein O-GlcNAcylation. *Nature Communications*, 10(1), 354.  
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-08300-3>
- Liu, T., Soong, L., Liu, G., König, R., & Chopra, A. K. (2009). CD44 expression positively correlates with Foxp3 expression and suppressive function of CD4+ Treg cells. *Biology Direct*, 4(1), 40. <https://doi.org/10.1186/1745-6150-4-40>
- Lizcano, J. M., Göransson, O., Toth, R., Deak, M., Morrice, N. A., Boudeau, J., Hawley, S. A., Udd, L., Mäkelä, T. P., Hardie, D. G., & Alessi, D. R. (2004). LKB1 is a master kinase that activates 13 kinases of the AMPK subfamily, including MARK/PAR-1. *The EMBO Journal*, 23(4), 833–843.  
<https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600110>
- Loebbermann, J., Thornton, H., Durant, L., Sparwasser, T., Webster, K. E., Sprent, J., Culley, F. J., Johansson, C., & Openshaw, P. J. (2012). Regulatory T cells expressing granzyme B play a critical role in controlling lung inflammation during acute viral infection. *Mucosal Immunology*, 5(2), 161–172.  
<https://doi.org/10.1038/mi.2011.62>
- Love, D. C., & Hanover, J. A. (2005). The Hexosamine Signaling Pathway: Deciphering the “O-GlcNAc Code.” *Science Signaling*, 2005(312), re13–re13.  
<https://doi.org/10.1126/stke.3122005re13>
- Love, M. I., Anders, S., Kim, V., & Huber, W. (2015). RNA-Seq workflow: gene-level exploratory analysis and differential expression. *F1000Research*, 4, 1070.  
<https://doi.org/10.12688/f1000research.7035.1>
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12), 550.  
<https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Lu, L., Ma, J., Wang, X., Wang, J., Zhang, F., Yu, J., He, G., Xu, B., Brand, D. D., Horwitz, D. A., Shi, W., & Zheng, S. G. (2009). Synergistic effect of TGF- $\beta$  superfamily members on the induction of Foxp3+ Treg. *European Journal of Immunology*, 40(1), 142–152. <https://doi.org/10.1002/eji.200939618>
- Lui, P. P., Cho, I., & Ali, N. (2020). Tissue regulatory T cells. *Immunology*, 161(1), 4–17. <https://doi.org/10.1111/imm.13208>

- Ma, E. H., Poffenberger, M. C., Wong, A. H.-T., & Jones, R. G. (2017). The role of AMPK in T cell metabolism and function. *Current Opinion in Immunology*, *46*, 45–52. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2017.04.004>
- Macintyre, A. N., Gerriets, V. A., Nichols, A. G., Michalek, R. D., Rudolph, M. C., Deoliveira, D., Anderson, S. M., Abel, E. D., Chen, B. J., Hale, L. P., & Rathmell, J. C. (2014). The Glucose Transporter Glut1 Is Selectively Essential for CD4 T Cell Activation and Effector Function. *Cell Metabolism*, *20*(1), 61–72. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.05.004>
- Maggi, E., Cosmi, L., Liotta, F., Romagnani, P., Romagnani, S., & Annunziato, F. (2005). Thymic regulatory T cells. *Autoimmunity Reviews*, *4*(8), 579–586. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2005.04.010>
- Marie, J. C., Letterio, J. J., Gavin, M., & Rudensky, A. Y. (2005). TGF- $\beta$ 1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells. *Journal of Experimental Medicine*, *201*(7), 1061–1067. <https://doi.org/10.1084/jem.20042276>
- Marzec, M., Liu, X., Kasprzycka, M., Witkiewicz, A., Raghunath, P. N., El-Salem, M., Robertson, E., Odum, N., & Wasik, M. A. (2008). IL-2- and IL-15-induced activation of the rapamycin-sensitive mTORC1 pathway in malignant CD4+ T lymphocytes. *Blood*, *111*(4), 2181–2189. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-06-095182>
- Massagué, J. (2012). TGF $\beta$  signalling in context. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *13*(10), 616–630. <https://doi.org/10.1038/nrm3434>
- Maynard, C. L., Harrington, L. E., Janowski, K. M., Oliver, J. R., Zindl, C. L., Rudensky, A. Y., & Weaver, C. T. (2007). Regulatory T cells expressing interleukin 10 develop from Foxp3+ and Foxp3- precursor cells in the absence of interleukin 10. *Nature Immunology*, *8*(9), 931–941. <https://doi.org/10.1038/ni1504>
- Mercer, F., & Unutmaz, D. (2009). The biology of Foxp3: a key player in immune suppression during infections, autoimmune diseases and cancer. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *665*, 47–59.

4419-1599-3\_4

- Michalek, R. D., Gerriets, V. A., Jacobs, S. R., Macintyre, A. N., MacIver, N. J., Mason, E. F., Sullivan, S. A., Nichols, A. G., & Rathmell, J. C. (2011). Cutting Edge: Distinct Glycolytic and Lipid Oxidative Metabolic Programs Are Essential for Effector and Regulatory CD4 + T Cell Subsets. *The Journal of Immunology*, *186*(6), 3299–3303. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003613>
- Mookerjee, S. A., & Brand, M. D. (2015). Measurement and Analysis of Extracellular Acid Production to Determine Glycolytic Rate. *Journal of Visualized Experiments*, *106*. <https://doi.org/10.3791/53464>
- Mouse Genome Reference Consortium. (2011). *Mouse Genome Overview*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/grc/mouse>
- MUNDAY, M. R., CAMPBELL, D. G., CARLING, D., & HARDIE, D. G. (1988). Identification by amino acid sequencing of three major regulatory phosphorylation sites on rat acetyl-CoA carboxylase. *European Journal of Biochemistry*, *175*(2), 331–338. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1988.tb14201.x>
- Murata, K., Morino, K., Ida, S., Ohashi, N., Lemecha, M., Park, S.-Y., Ishikado, A., Kume, S., Choi, C. S., Sekine, O., Ugi, S., & Maegawa, H. (2018). Lack of O-GlcNAcylation enhances exercise-dependent glucose utilization potentially through AMP-activated protein kinase activation in skeletal muscle. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *495*(2), 2098–2104. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.12.081>
- Musi, N., & Goodyear, L. J. (2003). AMP-activated protein kinase and muscle glucose uptake. *Acta Physiologica Scandinavica*, *178*(4), 337–345. <https://doi.org/10.1046/j.1365-201X.2003.01168.x>
- Nakao, A. (1997). TGF- $\beta$  receptor-mediated signalling through Smad2, Smad3 and Smad4. *The EMBO Journal*, *16*(17), 5353–5362. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.17.5353>
- Negmadjanov, U., Godic, Z., Rizvi, F., Emelyanova, L., Ross, G., Richards, J., Holmuhamedov, E. L., & Jahangir, A. (2015). TGF- $\beta$ 1-Mediated Differentiation of

- Fibroblasts Is Associated with Increased Mitochondrial Content and Cellular Respiration. *PLOS ONE*, 10(4), e0123046.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123046>
- Newton, R., Priyadharshini, B., & Turka, L. A. (2016). Immunometabolism of regulatory T cells. *Nature Immunology*, 17(6), 618–625.  
<https://doi.org/10.1038/ni.3466>
- Ni, F., Yu, W.-M., Li, Z., Graham, D. K., Jin, L., Kang, S., Rossi, M. R., Li, S., Broxmeyer, H. E., & Qu, C.-K. (2019). Critical role of ASCT2-mediated amino acid metabolism in promoting leukaemia development and progression. *Nature Metabolism*, 1(3), 390–403. <https://doi.org/10.1038/s42255-019-0039-6>
- O'Neill, L. A. J., Kishton, R. J., & Rathmell, J. (2016). A guide to immunometabolism for immunologists. *Nature Reviews. Immunology*, 16(9), 553–565.  
<https://doi.org/10.1038/nri.2016.70>
- Ohue, Y., & Nishikawa, H. (2019). Regulatory T (Treg) cells in cancer: Can Treg cells be a new therapeutic target? *Cancer Science*, 110(7), 2080–2089.  
<https://doi.org/10.1111/cas.14069>
- Oki, T., Yamazaki, K., Kuromitsu, J., Okada, M., & Tanaka, I. (1999). cDNA Cloning and Mapping of a Novel Subtype of Glutamine:fructose-6-phosphate Amidotransferase (GFAT2) in Human and Mouse. *Genomics*, 57(2), 227–234.  
<https://doi.org/10.1006/geno.1999.5785>
- Owen, D. L., Mahmud, S. A., Sjaastad, L. E., Williams, J. B., Spanier, J. A., Simeonov, D. R., Ruscher, R., Huang, W., Proekt, I., Miller, C. N., Hekim, C., Jeschke, J. C., Aggarwal, P., Broeckel, U., LaRue, R. S., Henzler, C. M., Alegre, M.-L., Anderson, M. S., August, A., ... Farrar, M. A. (2019). Thymic regulatory T cells arise via two distinct developmental programs. *Nature Immunology*, 20(2), 195–205. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0289-6>
- Pacella, I., & Piconese, S. (2019). Immunometabolic Checkpoints of Treg Dynamics: Adaptation to Microenvironmental Opportunities and Challenges. *Frontiers in Immunology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01889>
- Pan, Y., Liu, L., Li, S., Wang, K., Ke, R., Shi, W., Wang, J., Yan, X., Zhang, Q.,

- Wang, Q., Chai, L., Xie, X., & Li, M. (2018). Activation of AMPK inhibits TGF- $\beta$ 1-induced airway smooth muscle cells proliferation and its potential mechanisms. *Scientific Reports*, *8*(1), 3624. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21812-0>
- Panduro, M., Benoist, C., & Mathis, D. (2016). Tissue Tregs. *Annual Review of Immunology*, *34*(1), 609–633. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-095948>
- Pearce, E. L., & Pearce, E. J. (2013). Metabolic Pathways in Immune Cell Activation and Quiescence. *Immunity*, *38*(4), 633–643. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.04.005>
- Pezzi, N., Assis, A. F., Cotrim-Sousa, L. C., Lopes, G. S., Mosella, M. S., Lima, D. S., Bombonato-Prado, K. F., & Passos, G. A. (2016). Aire knockdown in medullary thymic epithelial cells affects Aire protein, deregulates cell adhesion genes and decreases thymocyte interaction. *Molecular Immunology*, *77*, 157–173. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2016.08.003>
- Priyadharshini, B., Loschi, M., Newton, R. H., Zhang, J.-W., Finn, K. K., Gerriets, V. A., Huynh, A., Rathmell, J. C., Blazar, B. R., & Turka, L. A. (2018). Cutting Edge: TGF- $\beta$  and Phosphatidylinositol 3-Kinase Signals Modulate Distinct Metabolism of Regulatory T Cell Subsets. *The Journal of Immunology*, *201*(8), 2215–2219. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1800311>
- Procaccini, C., De Rosa, V., Galgani, M., Abanni, L., Cali, G., Porcellini, A., Carbone, F., Fontana, S., Horvath, T. L., La Cava, A., & Matarese, G. (2010). An Oscillatory Switch in mTOR Kinase Activity Sets Regulatory T Cell Responsiveness. *Immunity*, *33*(6), 929–941. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.11.024>
- Ramsdell, F., & Ziegler, S. F. (2014). FOXP3 and scurfy: how it all began. *Nature Reviews. Immunology*, *14*(5), 343–349. <https://doi.org/10.1038/nri3650>
- Rao, E., Zhang, Y., Li, Q., Hao, J., Egilmez, N. K., Suttles, J., & Li, B. (2016). AMPK-dependent and independent effects of AICAR and compound C on T-cell responses. *Oncotarget*, *7*(23). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9277>
- Rao, E., Zhang, Y., Zhu, G., Hao, J., Persson, X.-M. T., Egilmez, N. K., Suttles, J., &

- Li, B. (2015). Deficiency of AMPK in CD8+ T cells suppresses their anti-tumor function by inducing protein phosphatase-mediated cell death. *Oncotarget*, 6(10). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3501>
- Raud, B., Roy, D. G., Divakaruni, A. S., Tarasenko, T. N., Franke, R., Ma, E. H., Samborska, B., Hsieh, W. Y., Wong, A. H., Stüve, P., Arnold-Schrauf, C., Guderian, M., Lochner, M., Rampertaap, S., Romito, K., Monsale, J., Brönstrup, M., Bensinger, S. J., Murphy, A. N., ... Berod, L. (2018). Etomoxir Actions on Regulatory and Memory T Cells Are Independent of Cpt1a-Mediated Fatty Acid Oxidation. *Cell Metabolism*, 28(3), 504-515.e7. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.06.002>
- Ray, J. P., Staron, M. M., Shyer, J. A., Ho, P.-C., Marshall, H. D., Gray, S. M., Laidlaw, B. J., Araki, K., Ahmed, R., Kaech, S. M., & Craft, J. (2015). The Interleukin-2-mTORc1 Kinase Axis Defines the Signaling, Differentiation, and Metabolism of T Helper 1 and Follicular B Helper T Cells. *Immunity*, 43(4), 690–702. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.08.017>
- Rosenblum, M. D., Remedios, K. A., & Abbas, A. K. (2015). Mechanisms of human autoimmunity. *Journal of Clinical Investigation*, 125(6), 2228–2233. <https://doi.org/10.1172/JCI78088>
- Ross, S. H., & Cantrell, D. A. (2018). Signaling and Function of Interleukin-2 in T Lymphocytes. *Annual Review of Immunology*, 36(1), 411–433. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-042617-053352>
- Ruan, Q., Kameswaran, V., Tone, Y., Li, L., Liou, H.-C., Greene, M. I., Tone, M., & Chen, Y. H. (2009). Development of Foxp3+ Regulatory T Cells Is Driven by the c-Rel Enhanceosome. *Immunity*, 31(6), 932–940. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.10.006>
- Rubtsov, Y. P., Rasmussen, J. P., Chi, E. Y., Fontenot, J., Castelli, L., Ye, X., Treuting, P., Siewe, L., Roers, A., Henderson, W. R., Muller, W., & Rudensky, A. Y. (2008). Regulatory T Cell-Derived Interleukin-10 Limits Inflammation at Environmental Interfaces. *Immunity*, 28(4), 546–558. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.02.017>

- Sabatini, D. M. (2017). Twenty-five years of mTOR: Uncovering the link from nutrients to growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *114*(45), 11818–11825. <https://doi.org/10.1073/pnas.1716173114>
- Sabatini, D. M., Erdjument-Bromage, H., Lui, M., Tempst, P., & Snyder, S. H. (1994). RAFT1: A mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell*, *78*(1), 35–43. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90570-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90570-3)
- Saito, T., Nishikawa, H., Wada, H., Nagano, Y., Sugiyama, D., Atarashi, K., Maeda, Y., Hamaguchi, M., Ohkura, N., Sato, E., Nagase, H., Nishimura, J., Yamamoto, H., Takiguchi, S., Tanoue, T., Suda, W., Morita, H., Hattori, M., Honda, K., ... Sakaguchi, S. (2016). Two FOXP3+CD4+ T cell subpopulations distinctly control the prognosis of colorectal cancers. *Nature Medicine*, *22*(6), 679–684. <https://doi.org/10.1038/nm.4086>
- Sakaguchi, S., Miyara, M., Costantino, C. M., & Hafler, D. A. (2010). FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nature Reviews Immunology*, *10*(7), 490–500. <https://doi.org/10.1038/nri2785>
- Salmond, R. J. (2018). mTOR Regulation of Glycolytic Metabolism in T Cells. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *6*. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00122>
- Samstein, R. M., Arvey, A., Josefowicz, S. Z., Peng, X., Reynolds, A., Sandstrom, R., Neph, S., Sabo, P., Kim, J. M., Liao, W., Li, M. O., Leslie, C., Stamatoyannopoulos, J. A., & Rudensky, A. Y. (2012). Foxp3 Exploits a Pre-Existent Enhancer Landscape for Regulatory T Cell Lineage Specification. *Cell*, *151*(1), 153–166. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.053>
- Santomauro Jún, A. C., Ugolini, M. R., Santomauro, A. T., & Souto, R. P. do. (2008). Metformina e AMPK: um antigo fármaco e uma nova enzima no contexto da síndrome metabólica. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, *52*(1), 120–125. <https://doi.org/10.1590/S0004-27302008000100017>
- Saravia, J., Zeng, H., Dhungana, Y., Bastardo Blanco, D., Nguyen, T.-L. M., Chapman, N. M., Wang, Y., Kanneganti, A., Liu, S., Raynor, J. L., Vogel, P.,

- Neale, G., Carmeliet, P., & Chi, H. (2020). Homeostasis and transitional activation of regulatory T cells require c-Myc. *Science Advances*, *6*(1), eaaw6443. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaw6443>
- Sasidharan Nair, V., & Elkord, E. (2018). Immune checkpoint inhibitors in cancer therapy: a focus on T-regulatory cells. *Immunology and Cell Biology*, *96*(1), 21–33. <https://doi.org/10.1111/imcb.1003>
- Sauer, S., Bruno, L., Hertweck, A., Finlay, D., Leleu, M., Spivakov, M., Knight, Z. A., Cobb, B. S., Cantrell, D., O'Connor, E., Shokat, K. M., Fisher, A. G., & Merckenschlager, M. (2008). T cell receptor signaling controls Foxp3 expression via PI3K, Akt, and mTOR. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(22), 7797–7802. <https://doi.org/10.1073/pnas.0800928105>
- Savage, P. A., Klawon, D. E. J., & Miller, C. H. (2020). Regulatory T Cell Development. *Annual Review of Immunology*, *38*(1), 421–453. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-100219-020937>
- Scharschmidt, T. C., Vasquez, K. S., Truong, H.-A., Gearty, S. V., Pauli, M. L., Nosbaum, A., Gratz, I. K., Otto, M., Moon, J. J., Liese, J., Abbas, A. K., Fischbach, M. A., & Rosenblum, M. D. (2015). A Wave of Regulatory T Cells into Neonatal Skin Mediates Tolerance to Commensal Microbes. *Immunity*, *43*(5), 1011–1021. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.10.016>
- Schmidt, A., Oberle, N., & Krammer, P. H. (2012). Molecular mechanisms of treg-mediated T cell suppression. *Frontiers in Immunology*, *3*, 51. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00051>
- Schmitt, E. G., & Williams, C. B. (2013). Generation and Function of Induced Regulatory T Cells. *Frontiers in Immunology*, *4*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00152>
- Schumann, K., Raju, S. S., Lauber, M., Kolb, S., Shifrut, E., Cortez, J. T., Skartsis, N., Nguyen, V. Q., Woo, J. M., Roth, T. L., Yu, R., Nguyen, M. L. T., Simeonov, D. R., Nguyen, D. N., Targ, S., Gate, R. E., Tang, Q., Bluestone, J. A., Spitzer, M. H., ... Marson, A. (2020). Functional CRISPR dissection of gene networks controlling human regulatory T cell identity. *Nature Immunology*, *21*(11), 1456–



1466. <https://doi.org/10.1038/s41590-020-0784-4>
- Schwartz, R. H. (2012). Historical Overview of Immunological Tolerance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(4), a006908–a006908.  
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006908>
- Scott, J. W., & Oakhill, J. S. (2017). The sweet side of AMPK signaling: regulation of GFAT1. *Biochemical Journal*, 474(7), 1289–1292.  
<https://doi.org/10.1042/BCJ20170006>
- Sharma, S., & Zhu, J. (2014). Immunologic Applications of Conditional Gene Modification Technology in the Mouse. In *Current Protocols in Immunology* (pp. 10.34.1-10.34.13). John Wiley & Sons, Inc.  
<https://doi.org/10.1002/0471142735.im1034s105>
- Shevach, E. M., & Thornton, A. M. (2014). tTregs, pTregs, and iTregs: similarities and differences. *Immunological Reviews*, 259(1), 88–102.  
<https://doi.org/10.1111/imr.12160>
- Shevach, E. M., Tran, D. Q., Davidson, T. S., & Andersson, J. (2008). The critical contribution of TGF- $\beta$  to the induction of Foxp3 expression and regulatory T cell function. *European Journal of Immunology*, 38(4), 915–917.  
<https://doi.org/10.1002/eji.200738111>
- Shi, H., & Chi, H. (2019). Metabolic Control of Treg Cell Stability, Plasticity, and Tissue-Specific Heterogeneity. *Frontiers in Immunology*, 10.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02716>
- Shi, L. Z., Wang, R., Huang, G., Vogel, P., Neale, G., Green, D. R., & Chi, H. (2011). HIF1 $\alpha$ -dependent glycolytic pathway orchestrates a metabolic checkpoint for the differentiation of TH17 and Treg cells. *Journal of Experimental Medicine*, 208(7), 1367–1376. <https://doi.org/10.1084/jem.20110278>
- Shi, R., Tang, Y., & Miao, H. (2020). Metabolism in tumor microenvironment: Implications for cancer immunotherapy. *MedComm*, 1(1), 47–68.  
<https://doi.org/10.1002/mco2.6>
- Shi, Y., & Zhu, M. (2013). Medullary thymic epithelial cells, the indispensable player in central tolerance. *Science China. Life Sciences*, 56(5), 392–398.

<https://doi.org/10.1007/s11427-013-4482-4>

- Shyer, J. A., Flavell, R. A., & Bailis, W. (2020). Metabolic signaling in T cells. *Cell Research*, 30(8), 649–659. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0379-5>
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J. D., & Higgins, D. G. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*, 7, 539. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.75>
- Sigma-Aldrich. (2015). *CRISPR/Cas Nuclease RNA-guided Genome Editing*. <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/crispr-cas9-genome-editing.html>
- Singh, K., Hjort, M., Thorvaldson, L., & Sandler, S. (2015). Concomitant analysis of Helios and Neuropilin-1 as a marker to detect thymic derived regulatory T cells in naïve mice. *Scientific Reports*, 5(1), 7767. <https://doi.org/10.1038/srep07767>
- Smigiel, K. S., Richards, E., Srivastava, S., Thomas, K. R., Dudda, J. C., Klonowski, K. D., & Campbell, D. J. (2014). CCR7 provides localized access to IL-2 and defines homeostatically distinct regulatory T cell subsets. *Journal of Experimental Medicine*, 211(1), 121–136. <https://doi.org/10.1084/jem.20131142>
- Smolina, N., Bruton, J., Kostareva, A., & Sejersen, T. (2017). *Assaying Mitochondrial Respiration as an Indicator of Cellular Metabolism and Fitness* (pp. 79–87). [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6960-9\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6960-9_7)
- Stein, S. C., Woods, A., Jones, N. A., Davison, M. D., & Carling, D. (2000). The regulation of AMP-activated protein kinase by phosphorylation. *The Biochemical Journal*, 345 Pt 3, 437–443. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10642499>
- Sullivan, J. E., Brocklehurst, K. J., Marley, A. E., Carey, F., Carling, D., & Beri, R. K. (1994). Inhibition of lipolysis and lipogenesis in isolated rat adipocytes with AICAR, a cell-permeable activator of AMP-activated protein kinase. *FEBS Letters*, 353(1), 33–36. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7926017>
- Sumida, T., Lincoln, M. R., Ukeje, C. M., Rodriguez, D. M., Akazawa, H., Noda, T., Naito, A. T., Komuro, I., Dominguez-Villar, M., & Hafler, D. A. (2018). Activated

- $\beta$ -catenin in Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells links inflammatory environments to autoimmunity. *Nature Immunology*, 19(12), 1391–1402.  
<https://doi.org/10.1038/s41590-018-0236-6>
- Sun, I.-H., Oh, M.-H., Zhao, L., Patel, C. H., Arwood, M. L., Xu, W., Tam, A. J., Blosser, R. L., Wen, J., & Powell, J. D. (2018). mTOR Complex 1 Signaling Regulates the Generation and Function of Central and Effector Foxp3<sup>+</sup> Regulatory T Cells. *The Journal of Immunology*, 201(2), 481–492.  
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701477>
- Sun, L., Luo, H., Li, H., & Zhao, Y. (2013). Thymic epithelial cell development and differentiation: cellular and molecular regulation. *Protein & Cell*, 4(5), 342–355.  
<https://doi.org/10.1007/s13238-013-3014-0>
- Sun, Y., Connors, K. E., & Yang, D.-Q. (2007). AICAR induces phosphorylation of AMPK in an ATM-dependent, LKB1-independent manner. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 306(1–2), 239–245. <https://doi.org/10.1007/s11010-007-9575-6>
- Swamy, M., Pathak, S., Grzes, K. M., Damerow, S., Sinclair, L. V, van Aalten, D. M. F., & Cantrell, D. A. (2016). Glucose and glutamine fuel protein O-GlcNAcylation to control T cell self-renewal and malignancy. *Nature Immunology*, 17(6), 712–720. <https://doi.org/10.1038/ni.3439>
- Takimoto, T., Wakabayashi, Y., Sekiya, T., Inoue, N., Morita, R., Ichiyama, K., Takahashi, R., Asakawa, M., Muto, G., Mori, T., Hasegawa, E., Shizuya, S., Hara, T., Nomura, M., & Yoshimura, A. (2010). Smad2 and Smad3 Are Redundantly Essential for the TGF- $\beta$ -Mediated Regulation of Regulatory T Plasticity and Th1 Development. *The Journal of Immunology*, 185(2), 842–855.  
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.0904100>
- Takimoto, Tomohito, Wakabayashi, Y., Sekiya, T., Inoue, N., Morita, R., Ichiyama, K., Takahashi, R., Asakawa, M., Muto, G., Mori, T., Hasegawa, E., Shizuya, S., Hara, T., Nomura, M., & Yoshimura, A. (2010). Smad2 and Smad3 Are Redundantly Essential for the TGF- $\beta$ -Mediated Regulation of Regulatory T Plasticity and Th1 Development. *The Journal of Immunology*, 185(2), 842–855.  
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.0904100>

- Tan, C. L., Kuchroo, J. R., Sage, P. T., Liang, D., Francisco, L. M., Buck, J., Thaker, Y. R., Zhang, Q., McArdel, S. L., Juneja, V. R., Lee, S. J., Lovitch, S. B., Lian, C., Murphy, G. F., Blazar, B. R., Vignali, D. A. A., Freeman, G. J., & Sharpe, A. H. (2021). PD-1 restraint of regulatory T cell suppressive activity is critical for immune tolerance. *Journal of Experimental Medicine*, 218(1).  
<https://doi.org/10.1084/jem.20182232>
- Tanaka, A., & Sakaguchi, S. (2019). Targeting Treg cells in cancer immunotherapy. *European Journal of Immunology*, 49(8), 1140–1146.  
<https://doi.org/10.1002/eji.201847659>
- Tanimine, N., Germana, S. K., Fan, M., Hippen, K., Blazar, B. R., Markmann, J. F., Turka, L. A., & Priyadharshini, B. (2019). Differential effects of 2-deoxy-D-glucose on in vitro expanded human regulatory T cell subsets. *PLOS ONE*, 14(6), e0217761. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217761>
- Team, Rs. (2015). *RStudio: Integrated Development for R* (0.99.903). RStudio, Inc. <http://www.rstudio.com/>
- Thakur, S., Viswanadhapalli, S., Kopp, J. B., Shi, Q., Barnes, J. L., Block, K., Gorin, Y., & Abboud, H. E. (2015). Activation of AMP-Activated Protein Kinase Prevents TGF- $\beta$ 1–Induced Epithelial-Mesenchymal Transition and Myofibroblast Activation. *The American Journal of Pathology*, 185(8), 2168–2180.  
<https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.04.014>
- Thornton, A. M., Donovan, E. E., Piccirillo, C. A., & Shevach, E. M. (2004). Cutting Edge: IL-2 Is Critically Required for the In Vitro Activation of CD4 + CD25 + T Cell Suppressor Function. *The Journal of Immunology*, 172(11), 6519–6523.  
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.11.6519>
- Thornton, A. M., Lu, J., Korty, P. E., Kim, Y. C., Martens, C., Sun, P. D., & Shevach, E. M. (2019). Helios + and Helios – Treg subpopulations are phenotypically and functionally distinct and express dissimilar TCR repertoires. *European Journal of Immunology*, 49(3), 398–412. <https://doi.org/10.1002/eji.201847935>
- Thornton, A. M., & Shevach, E. M. (1998). CD4+CD25+ Immunoregulatory T Cells Suppress Polyclonal T Cell Activation In Vitro by Inhibiting Interleukin 2

- Production. *Journal of Experimental Medicine*, 188(2), 287–296.  
<https://doi.org/10.1084/jem.188.2.287>
- Tidin, O., Friman, E. T., Naef, F., & Suter, D. M. (2019). Quantitative relationships between SMAD dynamics and target gene activation kinetics in single live cells. *Scientific Reports*, 9(1), 5372. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41870-2>
- Timilshina, M., You, Z., Lacher, S. M., Acharya, S., Jiang, L., Kang, Y., Kim, J.-A., Chang, H. W., Kim, K.-J., Park, B., Song, J.-H., Ko, H.-J., Park, Y.-Y., Ma, M.-J., Nepal, M. R., Jeong, T. C., Chung, Y., Waisman, A., & Chang, J.-H. (2019). Activation of Mevalonate Pathway via LKB1 Is Essential for Stability of Treg Cells. *Cell Reports*, 27(10), 2948-2961.e7.  
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.05.020>
- Tone, Y., Furuuchi, K., Kojima, Y., Tykocinski, M. L., Greene, M. I., & Tone, M. (2008). Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer. *Nature Immunology*, 9(2), 194–202. <https://doi.org/10.1038/ni1549>
- Toyama, E. Q., Herzig, S., Courchet, J., Lewis, T. L., Loson, O. C., Hellberg, K., Young, N. P., Chen, H., Polleux, F., Chan, D. C., & Shaw, R. J. (2016). AMP-activated protein kinase mediates mitochondrial fission in response to energy stress. *Science*, 351(6270), 275–281. <https://doi.org/10.1126/science.aab4138>
- Tran, D. Q. (2012). TGF- $\beta$ : the sword, the wand, and the shield of FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells. *Journal of Molecular Cell Biology*, 4(1), 29–37.  
<https://doi.org/10.1093/jmcb/mjr033>
- Tran, D. Q., Andersson, J., Wang, R., Ramsey, H., Unutmaz, D., & Shevach, E. M. (2009). GARP (LRRC32) is essential for the surface expression of latent TGF- $\beta$  on platelets and activated FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(32), 13445–13450.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0901944106>
- van der Windt, G. J. W., Chang, C., & Pearce, E. L. (2016). Measuring Bioenergetics in T Cells Using a Seahorse Extracellular Flux Analyzer. *Current Protocols in Immunology*, 113(1). <https://doi.org/10.1002/0471142735.im0316bs113>
- van Loosdregt, J., & Coffey, P. J. (2014). Post-translational modification networks

- regulating FOXP3 function. *Trends in Immunology*, 35(8), 368–378.  
<https://doi.org/10.1016/j.it.2014.06.005>
- Vandenborre, K., Van Gool, S. W., Kasran, A., Ceuppens, J. L., Boogaerts, M. A., & Vandenberghe, P. (1999). Interaction of CTLA-4 (CD152) with CD80 or CD86 inhibits human T-cell activation. *Immunology*, 98(3), 413–421.  
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.1999.00888.x>
- Vignali, D. A. A., Collison, L. W., & Workman, C. J. (2008). How regulatory T cells work. *Nature Reviews Immunology*, 8(7), 523–532.  
<https://doi.org/10.1038/nri2343>
- Waickman, A. T., & Powell, J. D. (2012). mTOR, metabolism, and the regulation of T-cell differentiation and function. *Immunological Reviews*, 249(1), 43–58.  
<https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2012.01152.x>
- Walker, L. S. K. (2013). Treg and CTLA-4: Two intertwining pathways to immune tolerance. *Journal of Autoimmunity*, 45, 49–57.  
<https://doi.org/10.1016/j.jaut.2013.06.006>
- Wang, R., Wan, Q., Kozhaya, L., Fujii, H., & Unutmaz, D. (2008). Identification of a Regulatory T Cell Specific Cell Surface Molecule that Mediates Suppressive Signals and Induces Foxp3 Expression. *PLoS ONE*, 3(7), e2705.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002705>
- Watson, M. J., Vignali, P. D. A., Mullett, S. J., Overacre-Delgoffe, A. E., Peralta, R. M., Grebinoski, S., Menk, A. V., Rittenhouse, N. L., DePeaux, K., Whetstone, R. D., Vignali, D. A. A., Hand, T. W., Poholek, A. C., Morrison, B. M., Rothstein, J. D., Wendell, S. G., & Delgoffe, G. M. (2021). Metabolic support of tumour-infiltrating regulatory T cells by lactic acid. *Nature*, 591(7851), 645–651.  
<https://doi.org/10.1038/s41586-020-03045-2>
- Willows, R., Sanders, M. J., Xiao, B., Patel, B. R., Martin, S. R., Read, J., Wilson, J. R., Hubbard, J., Gamblin, S. J., & Carling, D. (2017). Phosphorylation of AMPK by upstream kinases is required for activity in mammalian cells. *Biochemical Journal*, 474(17), 3059–3073. <https://doi.org/10.1042/BCJ20170458>
- Windt, G. J. W., & Pearce, E. L. (2012). Metabolic switching and fuel choice during T-

- cell differentiation and memory development. *Immunological Reviews*, 249(1), 27–42. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2012.01150.x>
- Wu, D., Luo, Y., Guo, W., Niu, Q., Xue, T., Yang, F., Sun, X., Chen, S., Liu, Y., Liu, J., Sun, Z., Zhao, C., Huang, H., Liao, F., Han, Z., Zhou, D., Yang, Y., Xu, G., Cheng, T., & Feng, X. (2017). Lkb1 maintains Treg cell lineage identity. *Nature Communications*, 8, 15876. <https://doi.org/10.1038/ncomms15876>
- Wu, N., Zheng, B., Shaywitz, A., Dagon, Y., Tower, C., Bellinger, G., Shen, C.-H., Wen, J., Asara, J., McGraw, T. E., Kahn, B. B., & Cantley, L. C. (2013). AMPK-Dependent Degradation of TXNIP upon Energy Stress Leads to Enhanced Glucose Uptake via GLUT1. *Molecular Cell*, 49(6), 1167–1175. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.01.035>
- Wurst, W., & Kühn, R. (Eds.). (2009). *Gene Knockout Protocols* (Vol. 530). Humana Press. <https://doi.org/10.1007/978-1-59745-471-1>
- Xu, J., Ji, J., & Yan, X.-H. (2012). Cross-Talk between AMPK and mTOR in Regulating Energy Balance. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52(5), 373–381. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.500245>
- Xu, Q., Yang, C., Du, Y., Chen, Y., Liu, H., Deng, M., Zhang, H., Zhang, L., Liu, T., Liu, Q., Wang, L., Lou, Z., & Pei, H. (2014). AMPK regulates histone H2B O-GlcNAcylation. *Nucleic Acids Research*, 42(9), 5594–5604. <https://doi.org/10.1093/nar/gku236>
- Yadav, H., Devalaraja, S., Chung, S. T., & Rane, S. G. (2017). TGF- $\beta$ 1/Smad3 Pathway Targets PP2A-AMPK-FoxO1 Signaling to Regulate Hepatic Gluconeogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 292(8), 3420–3432. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.764910>
- Yadav, M., Louvet, C., Davini, D., Gardner, J. M., Martinez-Llordella, M., Bailey-Bucktrout, S., Anthony, B. A., Sverdrup, F. M., Head, R., Kuster, D. J., Ruminski, P., Weiss, D., Von Schack, D., & Bluestone, J. A. (2012). Neuropilin-1 distinguishes natural and inducible regulatory T cells among regulatory T cell subsets in vivo. *Journal of Experimental Medicine*, 209(10), 1713–1722. <https://doi.org/10.1084/jem.20120822>

- Yang, K., Blanco, D. B., Neale, G., Vogel, P., Avila, J., Clish, C. B., Wu, C., Shrestha, S., Rankin, S., Long, L., KC, A., & Chi, H. (2017). Homeostatic control of metabolic and functional fitness of Treg cells by LKB1 signalling. *Nature*, *548*(7669), 602–606. <https://doi.org/10.1038/nature23665>
- Yang, Q., Xu, J., Ma, Q., Liu, Z., Sudhakar, V., Cao, Y., Wang, L., Zeng, X., Zhou, Y., Zhang, M., Xu, Y., Wang, Y., Weintraub, N. L., Zhang, C., Fukai, T., Wu, C., Huang, L., Han, Z., Wang, T., ... Huo, Y. (2018). PRKAA1/AMPK $\alpha$ 1-driven glycolysis in endothelial cells exposed to disturbed flow protects against atherosclerosis. *Nature Communications*, *9*(1), 4667. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07132-x>
- Yu, X., Harden, K., C Gonzalez, L., Francesco, M., Chiang, E., Irving, B., Tom, I., Ivelja, S., Refino, C. J., Clark, H., Eaton, D., & Grogan, J. L. (2009). The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells. *Nature Immunology*, *10*(1), 48–57. <https://doi.org/10.1038/ni.1674>
- Zachara, N. E., & Hart, G. W. (2006). Cell signaling, the essential role of O-GlcNAc! *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1761*(5–6), 599–617. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2006.04.007>
- Zdrojewicz, Z., Pachura, E., & Pachura, P. (2016). The Thymus: A Forgotten, But Very Important Organ. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, *25*(2), 369–375. <https://doi.org/10.17219/acem/58802>
- Zeng, H., & Chi, H. (2017). mTOR signaling in the differentiation and function of regulatory and effector T cells. *Current Opinion in Immunology*, *46*, 103–111. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2017.04.005>
- Zeng, H., Yang, K., Cloer, C., Neale, G., Vogel, P., & Chi, H. (2013). mTORC1 couples immune signals and metabolic programming to establish Treg-cell function. *Nature*, *499*(7459), 485–490. <https://doi.org/10.1038/nature12297>
- Zhang, W., Liu, J., Tian, L., Liu, Q., Fu, Y., & Garvey, W. T. (2013). TRIB3 Mediates Glucose-Induced Insulin Resistance via a Mechanism That Requires the Hexosamine Biosynthetic Pathway. *Diabetes*, *62*(12), 4192–4200.



<https://doi.org/10.2337/db13-0312>

- Zhao, J., Miyamoto, S., You, Y.-H., & Sharma, K. (2015). AMP-activated protein kinase (AMPK) activation inhibits nuclear translocation of Smad4 in mesangial cells and diabetic kidneys. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 308(10), F1167–F1177. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00234.2014>
- Zhou, G., Myers, R., Li, Y., Chen, Y., Shen, X., Fenyk-Melody, J., Wu, M., Ventre, J., Doebber, T., Fujii, N., Musi, N., Hirshman, M. F., Goodyear, L. J., & Moller, D. E. (2001). Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *Journal of Clinical Investigation*, 108(8), 1167–1174. <https://doi.org/10.1172/JCI13505>
- Zi, Z., Chapnick, D. A., & Liu, X. (2012). Dynamics of TGF- $\beta$ /Smad signaling. *FEBS Letters*, 586(14), 1921–1928. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.03.063>
- Zibrova, D., Vandermoere, F., Göransson, O., Peggie, M., Mariño, K. V., Knierim, A., Spengler, K., Weigert, C., Viollet, B., Morrice, N. A., Sakamoto, K., & Heller, R. (2017). GFAT1 phosphorylation by AMPK promotes VEGF-induced angiogenesis. *Biochemical Journal*, 474(6), 983–1001. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160980>
- Zong, H., Ren, J. M., Young, L. H., Pypaert, M., Mu, J., Birnbaum, M. J., & Shulman, G. I. (2002). AMP kinase is required for mitochondrial biogenesis in skeletal muscle in response to chronic energy deprivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(25), 15983–15987. <https://doi.org/10.1073/pnas.252625599>