

**Julia Cortina Campopiano**

**INFLUÊNCIA DA ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS VIA  
RECEPTORES DO TIPO TOLL (TLRs) NA PRODUÇÃO  
DE FATORES MODULADORES DA SOBREVIVÊNCIA  
DE LINFÓCITOS T**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

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

São Paulo

2010

## RESUMO

Campopiano JC. Influência da ativação de macrófagos via receptores do tipo Toll (TLRs) na produção de fatores moduladores da sobrevivência de linfócitos T [dissertação (Mestrado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

A interação entre a imunidade inata e adaptativa acontece durante todo o processo da resposta imune, ocorrendo através do contato célula-célula e pela secreção de fatores solúveis, tais com mediadores lipídicos e citocinas. Os *Toll-like receptors* (TLRs) presentes nas células da imunidade inata, tem importante papel na ativação de macrófagos e células dendríticas e, conseqüentemente, no conjunto de moléculas secretadas por estas células. Sabe-se que estas substâncias são importantes na modulação dos processos de ativação, diferenciação e proliferação de linfócitos T. Porém, pouco se sabe sobre o seu papel no processo de contração da população de células T ativadas (*Activation-induced cell death* - AICD). Portanto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar se macrófagos estimulados com diferentes agonistas de TLRs poderiam produzir fatores solúveis com capacidade modulatória da morte por AICD. Primeiramente, demonstramos por RT-PCR em tempo real, que tanto a linhagem macrofágica J774, quanto os macrófagos derivados de medula óssea (BMDMs) expressam todos os TLRs, com excessão do TLR11. Comprovamos que estas proteínas são funcionais, uma vez que o estímulo com Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>, Poly(I:C), LPS, Flagelina, Imiquimod e CpG, agonistas de TLR1/2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7 e TLR9, respectivamente, é capaz de ativar o fator de transcrição NF-κB nestes macrófagos. Com relação aos mecanismos de morte celular (AICD), constatamos que todos os sobrenadantes gerados pelas J774 são capazes de proteger as células DO11.10 da AICD mediada por anticorpos anti-CD3. Por outro lado, apenas sobrenadantes de BMDMs estimuladas com Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>, Poly(I:C), LPS e Imiquimod tiveram o mesmo efeito protetor. Comprovamos que este fenômeno é parcialmente mediado por PGE<sub>2</sub>, uma vez que este mediador lipídico foi detectado, através de ensaio imunoenzimático, em sobrenadantes gerados por células J774. Mostramos, ainda, que a inibição da morte ocorre através da regulação negativa da expressão de FasL nas células DO11.10. Finalmente, demonstramos que este fenômeno não é restrito ao hibridoma de linfócitos T, mas também ocorre em blastos de linfócitos T CD4<sup>+</sup> primários, gerados *ex vivo*. Em conjunto, estes resultados indicam que as APCs podem modular a expressão de FasL, em resposta aos agonistas de TLRs, evitando a morte dos linfócitos T.

**Palavras-chave:** Apoptose. Fas/FasL. Receptores do tipo Toll (TLRs). AICD. Linfócitos T. PAMPs.

## ABSTRACT

Campopiano JC. Effect of soluble factors produced by TLR-activated macrophages on T lymphocytes survival [dissertação (Mestrado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

The interaction between innate and adaptive immunity occurs in several phases of the immune response, taking place by cell to cell contact and by secretion of soluble factors such as cytokines. The Toll-like receptors (TLRs) are expressed by cells involved in the innate immunity and have an important role in the activation of macrophages and dendritic cells, directly acting on the molecules secreted by these cells. It's known that these soluble factors are able to modulate the activation, differentiation and proliferation of T lymphocytes however, little is known about the role of these secreted molecules on the survival control of activated T lymphocytes (Activation-induced cell death - AICD). Therefore, the aim of the present work was to evaluate the effects of soluble factors produced by macrophages activated with several TLRs agonists, on the survival of T lymphocytes. First we sought the expression of TLRs on both bone marrow-derived and J774 macrophage cell line and we could see that both cells express all TLRs, except for TLR 11. The stimulation of both cells with TLRs agonists leads to the expression of NF- $\kappa$ B and the stimulation of BMDMs stimulated with Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>, Poly(I:C), LPS and Imiquimod led to the production of soluble factors that protected DO11.10 T lymphocyte cell line from AICD induced by  $\alpha$ CD3. Next we determined the partial involvement of PGE<sub>2</sub> in this process by evaluating the production of PGE<sub>2</sub> by ELISA on the supernatants of TLR-stimulated J774 macrophages. Furthermore we showed that the protection of DO11.10 lymphocytes from AICD occurs via down regulation of FasL. We also showed that this protection is not characteristic of the DO11.10 T cell line, being observed in CD4<sup>+</sup> T lymphocytes expanded *ex vivo*. Altogether this data indicate that APCs, in response to TLR agonists, are able to modulate the expression of FasL by T lymphocytes preventing from death by AICD.

**Keywords:** Apoptosis. Fas/FasL. Toll-like receptors (TLRs). AICD. T Lymphocytes. PAMPs.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Considerações Gerais

Funcionando como primeira linha de defesa, o sistema imune inato reconhece estruturas conservadas evolutivamente, presentes em diferentes patógenos. O mecanismo de reconhecimento do sistema imune adaptativo, em contraste, é baseado na expressão clonal de receptores de antígeno e na geração de um diverso repertório de linfócitos. Após a iniciação da resposta imune, os linfócitos proliferam e se diferenciam em células efetoras. Esta é a chamada “fase de expansão”, aonde é gerado um número suficiente de células T efetoras, específicas para determinados patógenos.

Com a resolução da infecção, os linfócitos ativados gerados durante a resposta imune precisam ser eliminados. A alta capacidade proliferativa dos linfócitos ativados exige um controle efetivo de sua vida, a fim de manter a homeostasia do organismo. A morte por apoptose permite a redução do número de linfócitos durante a fase de contração de uma resposta imune. Têm sido bastante discutidos dois conceitos de indução de morte das células T durante o encerramento da resposta imune: AICD (*Activation-Induced Cell Death*) e ACAD (*Activated T Cell Autonomus Death*). A AICD é descrita como a morte das células T ativadas por re-estimulação de seus receptores (TCR). Durante a fase de expansão da resposta imune, as células T possuem um fenótipo de resistência à AICD, que vai gradualmente mudando para um estado de sensibilidade, conforme a resposta caminha para a fase de contração (Khammer, 2000). A principal via de AICD é dependente da interação de FasL (CD95L) ao seu receptor cognato Fas (CD95). Em contraste com a AICD, a morte por ACAD durante a fase de contração da resposta imune não requer a re-estimulação do TCR, pelo contrário, ocorre pela ausência de estimulação via o TCR. ACAD não é mediada por receptores de morte, sendo depende de uma via intrínseca de morte mediada pelo membro pró-apoptótico da família Bcl-2 denominado Bim e, portanto, envolve a mitocôndria na sua cascata de sinalização (Strasser e Pellegrini, 2004).

O mais provável é que os processos de AICD e ACAD cooperem durante o encerramento da resposta imune. Enquanto a morte por ACAD contribui mais fortemente com a redução dos números de células T durante a fase de contração (Hildeman *et al.*, 2002), a AICD parece ser importante para a eliminação de células T cronicamente ativadas e potencialmente auto-reativas (Stranges *et al.*, 2007), e será discutida mais profundamente no decorrer do presente trabalho.

## **1.2 Ativação de macrófagos e células dendríticas e a interação com linfócitos T**

Os linfócitos T CD4<sup>+</sup>, também chamados linfócitos T auxiliares ou Th (T “helper”) são as células centrais do sistema imunológico adaptativo, responsáveis pela orquestração da resposta imune. A ativação adequada dos linfócitos T virgens é um evento essencial para o desenvolvimento de uma resposta imune eficaz no combate aos patógenos e tumores, e importante para evitar o aparecimento de doenças auto-imunes. Este processo acontece nos órgãos linfóides periféricos, que fornecem um microambiente apropriado para uma interação afinada entre diversos tipos celulares e moléculas do sistema imune (Huang e Germain, 2004). Nestes locais, a ativação, proliferação clonal e diferenciação dos linfócitos T em células efetoras somente ocorrem quando estas células reconhecem antígenos através da interação do seu TCR com fragmentos peptídicos apresentados por moléculas do MHC (*major histocompatibility complex*). Os linfócitos T CD4<sup>+</sup> reconhecem peptídeos antigênicos associados a moléculas do MHC classe II, presentes na superfície de células apresentadoras de antígenos (APCs), como macrófagos e células dendríticas e linfócitos B, enquanto que os linfócitos T CD8<sup>+</sup> reconhecem antígenos associados a moléculas de MHC classe I, presentes em todas as células nucleadas do organismo. Porém, para que haja a completa ativação dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, estas células precisam de sinais co-estimuladores provenientes das APCs durante o reconhecimento antigênico. Se o primeiro sinal ocorrer e não for acompanhado pelo segundo sinal, as células adquirem

um estado anérgico (irresponsável), levando-as, em alguns casos, à morte (Gimmi *et al.*, 1993)

O sinal co-estimulador, ou segundo sinal melhor descrito até hoje é a interação entre CD28 presente constitutivamente em linfócitos T, e o CD80/CD86 de expressão indutível na superfície das APCs. A expressão de CD80 e CD86 é positiva e rapidamente modulada após a estimulação com ligantes de TLRs (Ghosh *et al.*, 1998). Além da interação entre estas moléculas, os sinais co-estimuladores também podem ser transduzidos pela interação entre CD40L/CD40, CD2/LFA3 e TIM1/TIM4 (Armitage *et al.*, 1993; Selvaraj *et al.*, 1987; Meyers *et al.*, 2005).

A completa maturação dos macrófagos e DCs são fundamentais para aumentar a sua capacidade de apresentação dos antígenos, expressão de moléculas co-estimuladoras e para alterar o perfil de produção e secreção de moléculas solúveis. Um dos sinais mais importantes para a maturação das APCs ocorre através da estimulação de receptores denominados PRRs (*Pattern-recognition receptors*) (Ghosh *et al.*, 1998; Iwasaki e Medzhitov, 2004), que reconhecem padrões moleculares que são frequentemente associados aos patógenos (*Pathogen associated molecular pattern - PAMPs*) (Kopp e Medzhitov, 2003).

Macrófagos e células dendríticas atuam como uma ponte entre o sistema imune inato e adaptativo, funcionando como sensores de produtos microbianos e sinais de perigo e realizando sua apresentação para o sistema imune adquirido. Como comentado anteriormente, a ótima ativação de células T virgens requer a sinalização através do TCR e da molécula CD28 (Lenschow *et al.*, 1996; Liu e Janeway, 1992). Estas exigências são cumpridas apenas por DCs maduras expostas à ligantes de TLRs, que sinalizam para o aumento na expressão de moléculas do MHC e de moléculas co-estimuladoras (Banchereau e Steinman, 1998). A migração das APCs para o linfonodo drenante e subsequente ativação das células T virgens garante que a resposta imune seja montada somente contra antígenos derivados de patógenos, sendo que a interação entre DCs imaturas e células T virgens gera um estado de tolerância ou indução de células T reguladoras (Steinman *et al.*, 2003)

### 1.3 Receptores do Tipo Toll (TLRs)

Como dito acima, a ativação das APCs pelos patógenos ocorre por diversos mecanismos, podendo envolver diferentes receptores denominados PRRs (*Patter-recognition receptors*).

Dentre os PRRs citosólicos encontram-se os RLRs (*Retinoic acid-inducible gene 1 (RIG-1)-like receptors*) e os NLRs (*Nucleotide binding domain and leucine-rich repeat-containing receptors*) (Pichlmair e Reis e Sousa, 2007). Os RLRs RIG-1 e MDA-5 (*melanoma differentiation factor 5*) são sensores para ácidos nucleicos, sendo importantes para o reconhecimento de RNA viral. Os NLRs representam uma grande família de sensores intracelulares que podem detectar patógenos e sinais de stress (Martinon *et al.*, 2009). Os PRRs transmembrânicos incluem a família das lectinas tipo C, como Dectin-1 e Dectin-2, que atuam durante infecções fúngicas, detectando  $\beta$ -glucana e manana (Robinson *et al.*, 2009; Brown, 2006), respectivamente, e os TLRs (*Toll-like receptors*) que compõe a mais bem caracterizada classe de PRRs (Takeda e Akira, 2005; Iwasaki e Medzhitov, 2004).

O envolvimento do Toll na imunidade inata foi primeiramente descrito na mosca *Drosophila melanogaster*. O gene para o receptor Toll foi descoberto em meados dos anos 80 por Eric Wieschaus e Christiane Nüsslein-Volhard, que ganharam o prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia em 1995. Eles descreveram o Toll como um receptor transmembrânico necessário para o estabelecimento da polaridade dorso-ventral correta e desenvolvimento embrionário adequado do inseto. Em 1996, Lemaitre e Hoffman observaram que moscas com mutações neste receptor eram susceptíveis à infecção pelo fungo *Aspergillus fumigatus*, uma vez que mutações no gene Toll bloqueavam a indução do peptídeo anti-microbiano Drosomicina, em resposta à infecção fungica (Lemaitre *et al.*, 1996). Mais tarde, Charles Janeway e Ruslan Medzhitov identificaram a presença de receptores homólogos ao Toll no genoma humano que foram denominados *Toll-like receptors* (TLRs). Esses receptores foram descritos primeiramente em componentes celulares da imunidade inata, que quando estimulados pelos seus respectivos ligantes, induziam a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, além de

umentar a expressão de moléculas co-estimuladoras por essas células (Medzhitov *et al.*, 1997).

Sabe-se hoje que, tanto camundongos quanto seres humanos possuem receptores semelhantes à Toll (TLR), cada um aparentemente envolvido no reconhecimento de um padrão molecular associado à patógenos (PAMPs)

Atualmente 12 membros da família TLR foram identificados em mamíferos, sendo que camundongos não possuem TLR8 e TLR10 e o genoma humano não apresenta TLR11 e TLR12 (Beutler, 2009; Medzhitov, 2007). Os TLRs são glicoproteínas transmembrânicas, caracterizadas estruturalmente pela presença de um domínio extracelular N-terminal rico em repetições leucina (*leucine-rich repeat* - LRR), que está envolvido diretamente ou através de moléculas acessórias, no reconhecimento dos ligantes. Um domínio transmembrânico de passagem única e um domínio intracitoplasmático de sinalização, homólogo ao receptor da interleucina-1 (*Toll/interleukin-1 receptor* – TIR), que é necessário para a interação com moléculas adaptadoras e para a sinalização intracelular (Takeda *et al.*, 2003).

Acredita-se que a maioria dos TLRs atue em forma de multímeros, sendo que alguns formam heterodímeros e outros se associam à moléculas que não fazem parte da família dos TLRs (Beutler 2009).

O TLR4 foi o primeiro membro da família a ser isolado e, juntamente com componentes acessórios na superfície celular como MD-2 e CD14, reconhece uma enorme variedade de PAMPs, como lipopolissacarídeos (LPS) presentes em bactérias gram-negativas (Shimazu *et al.*, 1999), glicoinusitolfosfolípidos (GIPLs) de *Trypanossoma Cruzi* (Gazzinelli *et al.*, 2004), manana de *Candida albicans* (Netea *et al.*, 2004) e envelopes virais glicoprotéicos (Kurt-Jones *et al.*, 2000). Animais com deficiência nesse receptor são excepcionalmente susceptíveis à infecção por bactérias gram-negativas (Werts *et al.*, 2006). O TLR2 pode formar heterodímeros com TLR1 e TLR6 para reconhecer lipídios, incluindo peptídeoglicano, lipopeptídeos e lipoproteínas de bactérias Gram positivas (Lien *et al.*, 1999), lipopetídeos de micoplasma e zimozan de fungos (Netea *et al.*, 2004). Em particular, TLR1/2 e TLR2/6 podem discriminar entre diacil e triacil-lipopeptídeos, respectivamente. Em adição, TLR10 parece se heterodimerizar com TLR2 e TLR1, embora o



ligante deste heterodímero ainda não esteja bem estabelecido (Zhang *et al.*, 2004). A flagelina, maior constituinte do flagelo de bactérias, como *Salmonella typhimurium* e *Bacillus subtilis*, é reconhecida pelo TLR5 (Yonekura *et al.*, 2003). Interessantemente, os receptores associados ao reconhecimento viral, TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9 são expressos em vesículas endocíticas e compartimentos lisossômicos e transitam para estes locais a partir do retículo endoplasmático (ER) com o auxílio da proteína UNC93B (Beutler 2009). RNA de fita dupla (dsRNA) produzido durante a replicação viral e seu análogo sintético, ácido poliinosinedeoxicitidílico (poly(I:C)) são reconhecidos pelo TLR3 (Alexopoulou *et al.*, 2001). Os genes do TLR7 e TLR8 possuem grande homologia, sendo que o TLR7 murino e o TLR8 humano reconhecem componentes sintéticos de imidazoquinolinas (Imiquimod, por exemplo), análogos da guanossina (como a loxorribina) e fita simples de RNA (ssRNA) (Hemmi *et al.*, 2000). TLR9 reconhece seqüências CpG não-metiladas presentes no DNA bacteriano e em alguns vírus de DNA, como o citomegalovírus murino (MCMV) (Krug *et al.*, 2001). Finalmente, bactérias uropatogênicas e profilina de *Toxoplasma gondii* são reconhecidas pelo TLR11, embora não seja conhecido o componente exato responsável por essa ativação.

Recentemente, componentes não associados a patógenos, inclusive moléculas endógenas, estão sendo descritos como ligantes de TLRs, porém a relevância fisiológica deste reconhecimento ainda não foi bem estabelecida.

#### **1.4 Vias de Sinalização dos TLRs**

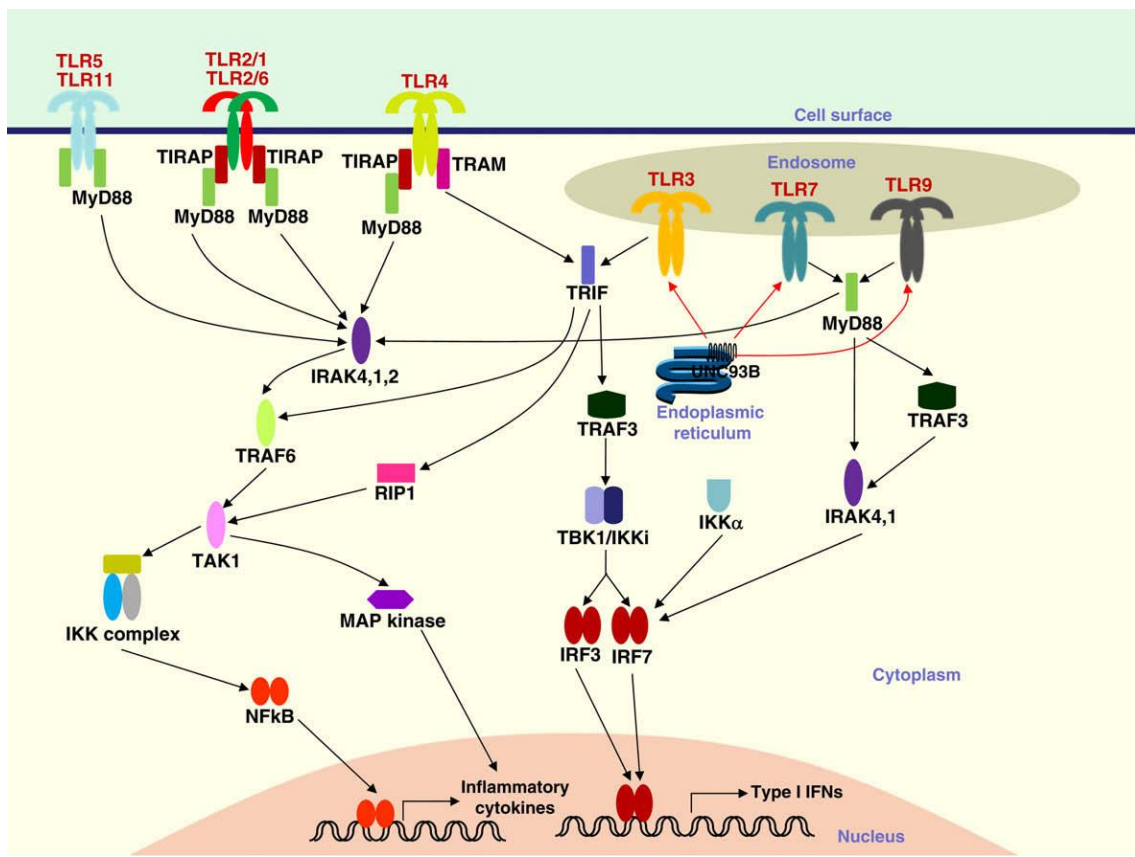
A ligação dos TLRs aos componentes microbianos leva a ativação de cascatas de sinalização que culminam na ativação de fatores de transcrição como NF- $\kappa$ B e membros da família IRF (*IFN-regulatory factor*), com conseqüente produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12, IL-1 $\beta$ , IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ , além da expressão de moléculas co-estimuladoras e moléculas do MHC, entre outras necessárias para proteger a célula do hospedeiro contra patógenos (Kopp e Medzhitov 1999).

Após a ligação aos seus respectivos agonistas, os TLRs dimerizam e sofrem mudanças conformacionais necessárias para o recrutamento de um conjunto de moléculas adaptadoras que contêm o domínio TIR, incluindo MyD88 (*myeloid differentiation factor 88*), TIRAP/MAL (TIR-associated protein / MyD88 adaptor-like), TRIF (*TIR-domain-containing adaptor protein-inducing IFN- $\beta$* ) e TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*) (Takeda *et al.*, 2003). MyD88 e TRIF são responsáveis pela ativação de distintas vias de sinalização, que levam a produção de citocinas pró-inflamatórias e interferons (IFNs) tipo I, respectivamente.

Como é demonstrado na Figura 1, a molécula adaptadora MyD88 é essencial para a sinalização de todos TLRs, com exceção do TLR3 (Carty *et al.*, 2006). Após estimulação, MyD88 se associa, através de seu domínio TIR, com a porção citoplasmática do receptor, permitindo o recrutamento da quinase IRAK-4 (*IL-1R-associated Kinase-4*), que se ativa e fosforila IRAK-1. Uma vez fosforilada, IRAK-1 torna-se ativa, dissocia-se de MyD88 e fosforila TRAF6 (*TNFR-associated factor 6*), ativando esta proteína adaptadora. TRAF6 fosforila TAK1 (TGF $\beta$ -activated kinase 1) e a sua ativação culmina na ativação das quinases IKK $\alpha$  e IKK $\beta$ , que juntamente com a subunidade reguladora IKK $\gamma$  (NEMO), formam o complexo trimérico IKK. Este complexo cataliza a fosforilação de I $\kappa$ B, uma proteína citoplasmática que é retentora do fator de transcrição NF- $\kappa$ B. Essa fosforilação é necessária para degradação de I $\kappa$ B e liberação de NF- $\kappa$ B, com sua subsequente translocação para o núcleo. No caso de TLR2 e TLR4, a proteína MyD88 necessita da molécula adaptadora TIRAP (MAL) para interagir com o domínio TIR destes receptores (Muzio *et al.*, 1997).

Camundongos MyD88-deficientes apresentam falha na ativação de NF- $\kappa$ B, MAPK e na produção de citocinas inflamatórias em resposta aos ligantes específicos de TLR2, 5, 7 e 9. Embora macrófagos deficientes de MyD88 também apresentem falha na produção de citocinas inflamatórias em resposta ao LPS (TLR4), eles parecem ativar NF- $\kappa$ B e MAPK, porém apresentando uma cinética retardada. Além disso, tratamento com ligantes de TLR3 e TLR4 em camundongos MyD88-deficientes, leva à ativação normal de IRF3 e subsequente indução de IFN- $\beta$  (Kawai *et al.*, 2001). Essas observações sugeriram fortemente a presença de uma via independente de MyD88 na

sinalização por TLR3 e TLR4. Neste caso, portanto, TRIF é recrutado como molécula adaptadora e interage diretamente com o domínio TIR do TLR3. TRIF pode recrutar TRAF-6 e dar continuação a uma cascata de sinalização semelhante à via dependente de MyD88, com subsequente ativação de NF- $\kappa$ B ou pode se ligar à TBK1 que medeia a ativação do fator de transcrição IRF-3 e expressão de IFN- $\beta$ . Quando esta via é sinalizada por TLR4, mas não por TLR3, a molécula co-adaptadora TRAM é recrutada e TRIF interage indiretamente com o domínio TIR de TLR4. (Yamamoto *et al.*, 2002)



**Figura 1.** Vias de Sinalização dos Toll-like Receptors (TLRs)  
 Fonte: Kumar *et al.*, 2009.

### 1.5 Subpopulações de linfócitos T CD4+

Uma resposta imune eficiente depende da ativação de compartimentos específicos de seu sistema de acordo com a natureza do patógeno presente. A orquestração desta diferenciação de resposta é mediada principalmente pelos

linfócitos T CD4<sup>+</sup>, que durante a iniciação de uma resposta imune, se diferenciam em diferentes subpopulações.

A diferenciação destas células nas várias subpopulações depende, sobretudo, das citocinas presentes no microambiente. Estas diferentes citocinas são produzidas pelas APCs de acordo com o tipo de ligante que elas reconhecem através dos TLRs (entre outros PRRs), mostrando que estes receptores são fundamentais para o início e para o direcionamento adequado da resposta imune adaptativa (Iwamoto *et al.*, 2007; Moser e Murphy, 2000). Isto é comprovado pelo fato de células T de camundongos deficientes da proteína adaptadora MyD88 não apresentarem proliferação em resposta ao antígeno ou produção de níveis detectáveis de IFN- $\gamma$  em resposta à estimulação antigênica (Schnare *et al.*, 2001).

Após a interação apropriada com o antígeno apresentado na superfície de moléculas do MHC classe II pelas APCs, as células T CD4<sup>+</sup> são ativadas e proliferam. Estas células podem se diferenciar nas subpopulações efetoras, incluindo as clássicas Th1 e Th2, a mais recentemente descrita Th17 e as células T reguladoras induzidas (iTreg). A diferenciação destas células é coordenada predominantemente pelas citocinas presentes no microambiente e, em certo ponto, pela força da interação do receptor de antígeno das células T com o antígeno na fenda da molécula de MHC das APCs (Boyton e Altmann, 2002). A polarização para um perfil Th1 ocorre principalmente em altas concentrações de IL-12 e/ou IFN- $\gamma$ , estas células são caracterizadas pela produção de IFN- $\gamma$  e estão envolvidas na resposta imune contra microorganismos intracelulares. A polarização para o perfil Th2 acontece na presença de altos níveis de IL-4, estas células, por sua vez, produzem IL-4, IL-5 e IL-13 e são importantes durante a imunidade humoral, no controle de infecções helmínticas e de outros patógenos extracelulares. A diferenciação em TH17 (em camundongos) ocorre na presença de IL-6 e TGF- $\beta$ . Estas células são responsáveis pela produção de IL-17 e IL-22 e possuem um importante papel na eliminação de infecções por fungos, especialmente em superfícies mucosas. As células Treg, por sua vez, são caracterizadas pela expressão do fator de transcrição Foxp3 e podem ser divididas em duas categorias: as células Treg naturais (nTreg) que surgem no timo, e as células Treg induzidas (iTreg), produzidas na periferia na presença de TGF- $\beta$  (Chen *et al.*, 2007).

Além dos mecanismos que regem a diferenciação e polarização dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, a retração destas diferentes subpopulações efetoras tem um grande impacto no estabelecimento de uma resposta imune focada e eficiente na eliminação dos patógenos e também na manutenção desta resposta dentro de níveis não deletérios para o organismo. Um dos mecanismos responsáveis pela retração populacional dos linfócitos previamente ativados e expandidos durante a fase efetora da resposta imune é denominada AICD. Originalmente descrita em hibridomas de linfócitos T (Bunner *et al.*, 1995), esta via de apoptose logo foi encontrada em células Th1, Th2 (Ramsdell *et al.*, 1994) e mais recentemente em populações de células Th17 (Zhang *et al.*, 2008).

## **1.6 Morte Celular Induzida por Ativação**

A morte celular induzida por ativação (AICD) é um processo de apoptose de linfócitos T desencadeado pela re-estimulação via TCR/CD3, sendo inicialmente descrita em hibridomas de Linfócitos T e posteriormente em linfócitos T maduros pré-ativados e em sub-populações de linfócitos T CD4<sup>+</sup>.

O mecanismo molecular da AICD depende da interação do receptor de morte Fas (CD95) com seu ligante cognato, FasL (CD95L) (Ju *et al.*, 1995; Van Parijs *et al.*, 1996). O receptor Fas é uma proteína transmembrana, membro da superfamília dos receptores de TNF. É constitutivamente expresso em uma variedade de células, incluindo células B e T e pode ainda ter sua expressão aumentada após a ativação celular (Nagata e Golstein, 1995).

Em contraste, FasL é sintetizado como uma proteína transmembrana, cuja expressão é limitada a poucos tipos celulares e pode ser altamente induzida em linfócitos T após a estimulação do TCR (Alderson *et al.*, 1995, Dhein *et al.*, 1995). Sua porção extracelular pode ser clivada da membrana por metaloproteases para se tornar secretada, sendo que a forma solúvel de FasL, parece ser em grande parte inerte como um ligante indutor de apoptose (Tanaka *et al.*, 1998). No entanto, é evidente que na maioria dos casos a ligação de Fas com FasL associado à membrana, seja de maneira autócrina, como parácrina, induz rapidamente uma cascata proteolítica, que resulta na

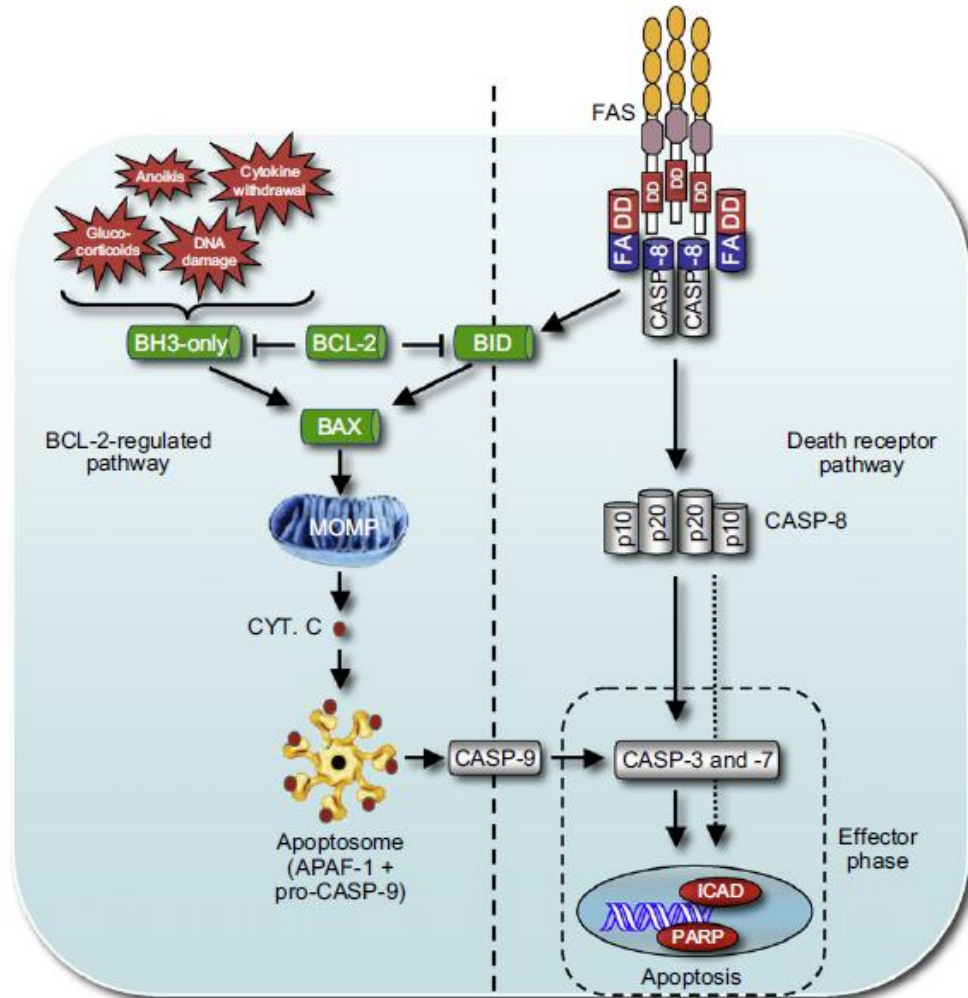
morte celular por apoptose (Ishiwatari-Hayasaka *et al.*, 1997; Oshimi *et al.*, 1996)

Muitos estudos recentes têm demonstrado o papel crítico dos *lipid rafts* na sinalização celular, por meio da organização de proteínas sinalizadoras, moléculas adaptadoras e receptores de superfície em um mesmo ponto da membrana celular. Tem-se mostrado também, que a redistribuição dos receptores de morte para os *lipid rafts* aumenta a susceptibilidade das células à apoptose, sendo que a estimulação do TCR de células T CD4<sup>+</sup> resulta em redistribuição das moléculas de Fas para dentro dos *lipids rafts*. Sendo assim, os *lipids rafts* tem sido apontados como importantes reguladores da apoptose mediada por Fas, uma vez que podem controlar a eficiência dos eventos iniciais da sinalização via Fas/FasL (Dykstra *et al.*, 2003; Muppidi e siegel 2004).

A ativação do receptor ocorre pela trimerização de moléculas de Fas, induzida pelo ligante, aproximando as porções intracitoplasmáticas. Com isso, há o recrutamento de moléculas adaptadoras FADD (*Fas associated DD*), que se ligam ao Fas por uma interação homodimérica (DD-DD) (Chinnaiyan *et al.*, 1995). A molécula FADD possui outro domínio, o domínio efetor de morte (DED - *death effector domain*), que interage com o mesmo domínio DED presente na procaspase-8, recrutando-a. Este complexo multimolecular é nomeado DISC (*death inducing signalling complex*). A procaspase-8 sofre ativação autocatalítica, desliga-se do DISC e ativa caspases efetoras, como caspase-3, 6 e 7 (Tschopp *et al.*, 1998). Estas caspases ativadas podem então clivar uma variedade de substratos, como enzimas reparadoras de DNA, proteínas estruturais, endonucleases e muitos outros constituintes celulares, promovendo a apoptose da célula (Nagata e Suda, 1995; Rosen e Casciola, 1997; Cohen, 1997).

Entretanto, em alguns casos, a produção de caspase-8 no DISC pode não ser suficiente para ativar a quantidade de caspase-3 necessária para a execução da apoptose. Nessas condições, caspase-8 pode clivar Bid (Luo X. *et al.*, 1998), um membro da família Bcl-2, gerando um fragmento pro-apoptótico chamado tBid (Bid truncado), que cliva Bax ou Bak (Korsmeyer *et al.*, 2000) e promove a liberação do citocromo c da mitocôndria para o citoplasma. O citocromo c liga-se a APAF-1 (*apoptotic-protease-activating factor-1*), que por

sua vez recruta a pró-caspase-9 formando um complexo de proteínas chamado apoptossomo. Este complexo, na presença de ATP, ativa a caspase-9, iniciando uma cascata de ativação de caspases, que culmina na caspase-3, molécula responsável pela indução dos principais fenótipos apoptóticos (Li P. *et al.*, 1997). A Figura 2 apresenta um esquema simplificado das duas vias iniciadas pela ativação do receptor Fas.



**Figura 2.** Via de sinalização de apoptose induzida pela ligação de Fas/FasL.  
 Fonte: Strasser *et al.*, 2009.

A proteína celular c-FLIP (*FLICE-inhibitory protein*) é uma potente inibidora da ativação de caspases no DISC (Thome e Tschopp, 2001). c-FLIP é uma molécula que apresenta alta homologia com a pró-caspase 8, possui um domínio de morte, porém com domínio catalítico inativo. Quando recrutada

pelo receptor, impede a ligação da caspase-8 com este, bloqueando a formação do DISC e a sinalização pró-apoptótica, sendo que a relação entre os níveis de c-FLIP e das caspases no DISC é crucial para determinar se a apoptose será iniciada ou não (Bentele *et al.*, 2004). Após a ativação inicial das células T, os níveis de c-FLIP são fortemente aumentados (Kirchhoff *et al.*, 2000; Schmitz *et al.*, 2003), correlacionando-se com a resistência das células T recém ativadas à apoptose induzida via a ligação Fas / FasL. Em populações de células T expandidas, susceptíveis à AICD, por outro lado, os níveis de c-FLIP encontram-se diminuídos, sugerindo que c-FLIP possa ser uma molécula chave na regulação da morte por AICD (Fas *et al.*, 2006).

A importância da via de sinalização mediada por Fas/FasL pode ser facilmente observada em camundongos MRL/lpr e MRL/gld, que possuem deficiência na expressão de Fas e FasL, respectivamente. Estes animais apresentam linfadenopatia e esplenomegalia causada pelo acúmulo de linfócitos ativados (Andrews *et al.*, 1978; Roths *et al.*, 1984; Watanabe *et al.*, 1991), além de alta incidência de doenças auto-imunes em múltiplos órgãos, indicando que o acúmulo de células T ativadas não é apenas um problema de aumento dos órgãos linfóides, mas trata-se de um distúrbio grave nos processos de tolerância periférica (Nagata e Suda, 1995). De maneira semelhante, em seres humanos, a ALPS (*autoimmune lymphoproliferative syndrome*) é uma doença linfoproliferativa, com alta incidência de linfomas, causada por deficiências na expressão de Fas e/ou FasL ou em moléculas da sua via de sinalização, como caspase-8 e caspase-10 (Poppema *et al.*, 2004, Rieux-Laucat *et al.*, 1995). Estas características fenotípicas encontradas nos animais deficientes em Fas e/ou FasL e nos pacientes com ALPS suportam fortemente a idéia que o mecanismo de AICD é fundamental para a manutenção da homeostasia dos linfócitos T e da auto-tolerância.

Hildeman e colaboradores mostraram com o desenvolvimento de um camundongo nocaute para Bim, uma molécula pró-apoptótica da família Bcl-2, que a deleção de linfócitos T periféricos parece ser mais dependente de Bim do que da via dependente de Fas. O Bim é um gatilho da via de apoptose mediada pela mitocôndria e desempenha um papel central na morte de linfócitos T causada pela deprivação de citocinas (ACAD). Portanto, a contração clonal após a resposta imune parecia ser mais ligada à falta de fatores de



sobrevivência e crescimento do que a um estímulo via receptores de morte (Hildeman *et al.*, 2002).

Recentemente, publicações utilizando camundongos duplo-nocaute para Fas e Bim mostraram que ambas as vias são complementares e sinérgicas, tanto para combater o aparecimento de síndromes auto-imunes como na contração de populações expandidas. Hutcheson e colaboradores demonstraram que estes camundongos desenvolvem uma severa síndrome, semelhante ao Lupus eritematoso sistêmico (SLE), já na 16ª semana de vida, e possuem APCs com alto grau de ativação (Hutcheson *et al.*, 2008). Hughes e colaboradores mostraram diferenças de respostas entre dois tipos de infecções. A contração da população expandida em resposta a uma infecção aguda (vírus HSV-1KOS) era totalmente dependente da via do Bim, enquanto que durante uma infecção crônica (Vírus MHV-68) a morte dos linfócitos T expandidos era dependente das duas vias (Hughes *et al.*, 2008). Weant e colaboradores, entretanto, mostraram que outra infecção relativamente aguda (vírus LCMV Armstrong), levava a uma contração dependente tanto de Bim como de Fas (Weant *et al.*, 2008).

Dessa maneira, a teoria mais aceita atualmente sobre a participação de Fas e Bim na contração de populações de linfócitos T expandidas considera a forma e a duração da apresentação dos antígenos patogênicos. Se a infecção é rapidamente eliminada e a função das APCs fica rapidamente restringida, a concentração de fatores de sobrevivência se torna limitante e a via preferencial de morte é a via mediada por Bim. Quando o antígeno é persistente devido a uma infecção crônica, os linfócitos T recebem estímulos contínuos, evitando assim, a ativação da via dependente de Bim. Nesta situação, o estímulo crônico pelo antígeno leva a expressão de FasL que pode matar a própria célula por AICD. A expressão de FasL pelos linfócitos T também pode matar as APCs, o que limitaria a estimulação pelo antígeno, diminuindo a quantidade de sinais de sobrevivência, desencadeando nos linfócitos T uma morte dependente da via de Bim (Green, 2008).

## 1.7 Regulação do FasL

Por ser um evento central na regulação de vida e morte de diversos tipos celulares, inclusive linfócitos T maduros, a modulação da expressão do FasL foi extensamente estudada. Vários sítios de ligação consenso para diferentes fatores de transcrição foram descritos e posteriormente validados. Dentre os fatores de transcrição envolvidos neste processo, destacam-se: NFAT (*nuclear factor of activated T-cells*), NF- $\kappa$ B (*nuclear factor kappa B*), Egr (*early growth response genes*), IRFs (*interferon regulatory factors*), AP-1 (*activator protein-1*), c-Myc, FKHRL1 (*Forkhead transcription factor 1*) e SP-1 (*secretory protein1*).

NFAT é ativado pela estimulação do complexo TCR/CD3 e parece ser o regulador chave da expressão de FasL. Camundongos mutantes para NFAT apresentam expressão deficiente de FasL e em alguns modelos desenvolvem doenças linfoproliferativas (Hodge *et al.*, 1996; Latinis *et al.*, 1997). A indução de FasL por NFAT requer a cooperação com AP-1 e pode ser potencializada por SP-1 (Peterson *et al.*, 1996).

NF- $\kappa$ B corresponde a outro fator de transcrição envolvido na expressão de FasL. Apesar do promotor de FasL apresentar um único sítio de ligação com este fator, o NF- $\kappa$ B parece mediar diversos estímulos apoptóticos que usam a via de Fas/FasL (Baldwin, 1996; Kasibhatla *et al.*, 1999). Através da ação de PKC- $\theta$  (*Protein Kinase C theta*), a estimulação do TCR leva à ativação de NF- $\kappa$ B que pode sinergizar com NFAT na indução de FasL (Villalba *et al.*, 1999; Villunger *et al.*, 1999).

No promotor do FasL existem ainda sítios de ligação consenso para Egr, membros da família IRF, AP-1, c-Myc, FKHRL1 e SP-1. A família dos fatores de transcrição Egr é induzida por NFAT e se liga a um domínio no promotor de FasL que, em conjunto com o sítio de ligação com o NFAT, é necessário para a correta expressão de FasL em células T ativadas (Norian *et al.*, 1998; Dzialo-Hatton *et al.*, 2001). IRFs, uma família de fatores de transcrição que induz a expressão de Interferons em resposta às infecções virais, pode cooperar com outros fatores de transcrição para maximizar a indução de FasL frente a estimulação do TCR (Chow *et al.*, 2000). Homólogos dos IRFs, provenientes do

herpevírus humano 8 (HHV8), interferem na ligação de IRF-1 e regulam negativamente a expressão de FasL, podendo representar um escape das células T infectadas contra a apoptose mediada por FasL (Kirchhoff *et al.*, 2002). AP-1, o qual é ativado pela sinalização de MAP kinases, também participa na expressão de FasL (Matsui *et al.*, 2000). Interessantemente, indutores de óxido nítrico (NO) inibem a expressão de FasL por bloquearem a atividade de AP-1 (Melino *et al.*, 2000). Além disso, a expressão ectópica do dominante-negativo de AP1 diminui drasticamente a expressão de FasL durante o estímulo de AICD (Baumann *et al.*, 2003). c-Myc se liga a um sítio separado no promotor de FasL e parece ser importante para sua indução, uma vez que seqüências anti-senso para o gene do c-myc abolem a expressão deste fator de transcrição, bloqueando a AICD em diversos hibridomas de linfócitos T (Shi *et al.*, 1992; Brunner *et al.*, 2000). FKHRL1 é mantido fosforilado e, portanto, inativo pela ação da quinase AKT, Assim, quando há ausência da atividade desta quinase, FKHRL1 é desfosforilado, dirige-se ao núcleo e participa na expressão de FasL. Ainda, SP-1 trabalha em colaboração com NFAT durante a transcrição de IL-2 dependente de FasL, em resposta à estimulação de linfócitos T via CD3 (Suhara *et al.*, 2002).

A expressão de FasL, induzida pela estimulação do TCR, pode ainda ser negativamente regulada através de diversos mecanismos. Um deles é o GILZ (Glucocorticoids-induced leucine zipper), um gene regulado por glicocorticóides, capaz de bloquear o aumento de FasL em hibridomas, interferindo com o processo de apoptose por AICD (D'adamio *et al.*, 1997). O repressor transcripcional ICER (*Inducible cAMP early repressor*) é induzido rápida e fortemente pelo aumento nos níveis de AMPc e pode ocupar sítios de ligação consenso que são utilizados por diversos fatores de transcrição, impedindo a correta transcrição gênica mediada por estes fatores transcripcionais (Molina *et al.*, 1993). O fator de transcrição CIITA (*MHC class II transactivator*), bem como o ácido retinóico, podem bloquear a função de NFAT e inibir a transcrição de FasL (Gourley e Chang 2001; Lee *et al.*, 2002). Finalmente, TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor-beta*) pode igualmente inibir a expressão de FasL via re-estimulação do TCR, através da modulação negativa da expressão de c-Myc (Genestier *et al.*, 1999).

Em resumo, a expressão de FasL é um mecanismo extremamente regulado e complexo, onde diversos fatores de transcrição agem de forma aditiva, antagônica e/ou sinérgica, fazendo com que a somatória de todas estas influências seja realmente importante para o resultado final.

## 1. 8 Prostaglandina E<sub>2</sub>

Prostaglandinas (PG) são moléculas derivadas de lipídios geradas pelo metabolismo do ácido araquidônico pela ação de ciclooxigenases e prostaglandina-sintases. O ácido araquidônico é um ácido graxo insaturado presente em membranas celulares. Após sua liberação da membrana pela ação de fosfolipase A<sub>2</sub>, entra em um ciclo oxidativo, que culmina na produção de PGH<sub>2</sub> (Smith *et al.*, 2000). Esta prostaglandina inicial é bastante instável e é rapidamente convertida nas cinco principais prostaglandinas com efeitos fisiológico relevantes. São elas: PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub> e tromboxano. O padrão de produção de prostaglandinas de uma determinada célula depende muito do perfil das enzimas expressas envolvidas na síntese de cada uma das prostaglandinas.

As ciclooxigenases, enzimas essenciais na produção de PGs, possuem duas isoformas principais. A ciclooxigenase-1 (Cox-1) é descrita, raras exceções, como sendo constitutivamente expressa, participando na manutenção dos níveis basais das PGs, exercendo funções de homeostase fisiológica (Dubois *et al.*, 1998). Já a expressão de Cox-2 é indutível por diversos mecanismos, especialmente pelas citocinas e estímulos pró-inflamatórios (Martin *et al.*, 1994).

A prostaglandina E<sub>2</sub> é a principal prostaglandina produzida em diversas condições, especialmente durante a resposta imune. O macrófago, por exemplo, produz uma quantidade basal de tromboxano maior que PGE<sub>2</sub>. Porém, após estímulo com LPS, a razão entre estes dois prostanóides é invertida e os macrófagos passam a produzir grandes quantidades de PGE<sub>2</sub> (Tiilley *et al.*, 2001). Sua influência no sistema imune é complexa, tendo ação em diversos tipos celulares, como macrófagos, células dendríticas, linfócitos B e T, agindo de forma tanto anti- como pró-inflamatória. A diversidade destes

efeitos é devida, em parte, à existência de quatro receptores do subtipo EP capazes de interagir com PGE<sub>2</sub>. A sinalização destes receptores é mediada pelas diferentes proteínas G acopladas, sendo que cada uma delas tem a capacidade de ativar diferentes vias bioquímicas (Kobayashi e Narumiya, 2002).

A PGE<sub>2</sub> pode atuar em diferentes momentos da vida dos linfócitos T, desde o desenvolvimento, maturação e até durante a realização de suas funções efetoras. Por exemplo, o aumento de AMPc via receptor EP2 e EP4 parece mediar a proteção de timócitos duplo-positivos da morte por seleção negativa (Goetzl *et al.*, 1995). O receptor EP2 também está envolvido na inibição da proliferação de linfócitos T causada pela PGE<sub>2</sub> (Chemnitz *et al.*, 2006). Por fim, nosso grupo demonstrou o envolvimento de EP2 e EP4 na proteção de linfócitos T contra a morte induzida por anticorpos anti-CD3 (Weinlich *et al.*, 2008).

## **1.9 Considerações Finais**

A interação entre a imunidade inata e adaptativa acontece durante todo o processo da resposta imune, incluindo a maturação, a polarização e a expansão dos linfócitos T, ocorrendo pelo contato célula-célula e pela secreção de fatores solúveis como as citocinas.

Sendo assim, resta saber se as APCs e seus produtos solúveis produzidos após a percepção de ligantes de TLRs possuem a capacidade de não somente mediar a correta ativação e diferenciação dos linfócitos T, mas se também são capazes de modular a sobrevivência destas células durante e após uma resposta imune.

## 2 CONCLUSÕES

- A linhagem macrófagica J774 expressa RNAm de todos os Toll-like receptors, com excessão do TLR11, sendo que TLR2 foi o receptor que apresentou maior expressão, seguido do TLR7 e dos TLRs 1, 3, 4, 5 e 6
- Macrófagos derivados de medula óssea (BMDM) expressam RNAm de todos os Toll-like receptors, com excessão do TLR11, sendo que TLR7 é o mais expresso, seguido dos TLRs1, 2, 4, 6 e 8 que são estatisticamente semelhantes.
- A linhagem macrófagica J774 e os macrófagos derivados de medula óssea (BMDM) expressam as proteínas TLR1/2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7 e TLR9 funcionalmente, uma vez que NF- $\kappa$ B é ativado quando os macrófagos são estimulados por agonistas de TLRs;
- O sobrenadante de cultura da linhagem macrófagica J774 possui capacidade de inibir a morte de hibridomas DO11.10 induzida por anticorpos anti-CD3;
- A adição de Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>, Poly(I:C), LPS, flagelina, imiquimod e CpG DNA na cultura de J774 aumenta a produção do fator inibidor, potencializando os efeitos dos sobrenadantes sobre a AICD em hibridomas DO11.10;
- O sobrenadante de cultura de macrófagos derivados de medula óssea (BMDM) estimulados com Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>, Poly I:C, LPS e imiquimod possui capacidade de inibir a morte de hibridomas DO11.10 induzida por anticorpos anti-CD3;
- A prostaglandina E<sub>2</sub> é um dos fatores relacionados com a inibição da morte conferida pelo sobrenadante de J774 estimuladas com agonistas de TLRs.

- Outros fatores solúveis estão presentes no sobrenadante de BMDM, e possivelmente no de J774, estimuladas com ligantes de TLRs, uma vez que a PGE<sub>2</sub> não foi detectada em cultura de BMDMs.
- Os sobrenadantes de J774 estimuladas com todos agonistas de TLRs e BMDMs estimuladas com Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>, Poly I:C, LPS e imiquimod não alteram significativamente os níveis de expressão de FLIP e Fas, porém inibem transcripcionalmente a expressão de FasL.
- Os sobrenadantes de J774 e BMDMs estimuladas com LPS e Imiquimod também desempenham efeito regulador da expressão dos níveis de RNAm de TNF.
- Os sobrenadantes de J774 e BMDMs estimuladas com todos agonistas de TLRs reduzem significativamente a expressão protéica de FasL em linfócitos T CD4<sup>+</sup> primários estimulados com anticorpos anti-CD3.

## REFERÊNCIAS\*

Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006 Feb 24;124(4):783-801.

Alderson MR, Tough TW, Davis-Smith T, Braddy S, Falk B, Schooley KA, Goodwin RG, Smith CA, Ramsdell F, Lynch DH. Fas ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes. *J Exp Med*. 1995 Jan 1;181(1):71-7.

Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*. 2001 Oct 18;413(6857):732-8.

Andrews BS, Eisenberg RA, Theofilopoulos AN, Izui S, Wilson CB, McConahey PJ, Murphy ED, Roths JB, Dixon FJ. Spontaneous murine lupus-like syndromes. Clinical and immunopathological manifestations in several strains. *J Exp Med*. 1978 Nov 1;148(5):1198-215.

Armitage RJ, Tough TW, Macduff BM, Fanslow WC, Spriggs MK, Ramsdell F, Alderson MR. CD40 ligand is a T cell growth factor. *Eur J Immunol*. 1993 Sep;23(9):2326-31.

Baldwin AS Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol*. 1996;14:649-83.

Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998 Mar 19;392(6673):245-52.

Baumann S, Hess J, Eichhorst ST, Krueger A, Angel P, Krammer PH, Kirchhoff S. An unexpected role for FosB in activation-induced cell death of T cells. *Oncogene*. 2003 Mar 6;22(9):1333-9.



Bentele M, Lavrik I, Ulrich M, Stösser S, Heermann DW, Kalthoff H, Krammer PH, Eils R. Mathematical modeling reveals threshold mechanism in CD95-induced apoptosis. *J Cell Biol.* 2004 Sep 13;166(6):839-51.

Beutler BA. TLRs and innate immunity. *Blood.* 2009 Feb 12;113(7):1399-407.  
Boyton RJ, Altmann DM. Is selection for TCR affinity a factor in cytokine polarization? *Trends Immunol.* 2002 Nov;23(11):526-9.

Brown GD. Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nat Rev Immunol.* 2006 Jan;6(1):33-43.

Brunner T, Mogil RJ, LaFace D, Yoo NJ, Mahboubi A, Echeverri F, Martin SJ, Force WR, Lynch DH, Ware CF, et al. Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas. *Nature.* 1995 Feb 2;373(6513):441-4.

Carty M, Goodbody R, Schröder M, Stack J, Moynagh PN, Bowie AG. The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF-dependent Toll-like receptor signaling. *Nat Immunol.* 2006 Oct;7(10):1074-81.

Chemnitz JM, Driesen J, Classen S, Riley JL, Debey S, Beyer M, Popov A, Zander T, Schultze JL. Prostaglandin E2 impairs CD4+ T cell activation by inhibition of I $\kappa$ B: implications in Hodgkin's lymphoma. *Cancer Res.* 2006 Jan 15;66(2):1114-22.

Chen M, Huang L, Wang J. Deficiency of Bim in dendritic cells contributes to overactivation of lymphocytes and autoimmunity. *Blood.* 2007 May 15;109(10):4360-7.

Chen Z, Laurence A, O'Shea JJ. Signal transduction pathways and transcriptional regulation in the control of Th17 differentiation. *Semin Immunol.* 2007 Dec;19(6):400-8.

Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell*. 1995 May 19;81(4):505-12.

Chow WA, Fang JJ, Yee JK. The IFN regulatory factor family participates in regulation of Fas ligand gene expression in T cells. *J Immunol*. 2000 Apr 1;164(7):3512-8.

Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J*. 1997 Aug 15;326 (1):1-16.

D'Adamio F, Zollo O, Moraca R, Ayroldi E, Bruscoli S, Bartoli A, Cannarile L, Migliorati G, Riccardi C. A new dexamethasone-induced gene of the leucine zipper family protects T lymphocytes from TCR/CD3-activated cell death. *Immunity*. 1997 Dec;7(6):803-12.

Dhein J, Walczak H, Bäuml C, Debatin KM, Krammer PH. Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95) *Nature*. 1995 Feb 2;373(6513):438-41.

Doyle SL, O'Neill LA. Toll-like receptors: from the discovery of NFkappaB to new insights into transcriptional regulations in innate immunity. *Biochem Pharmacol*. 2006 Oct 30;72(9):1102-13.

Drexler HG, Uphoff CC. Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. *Cytotechnology*. 2002 Jul;39(2):75-90.

Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte LB, Lipsky PE. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J*. 1998 Sep;12(12):1063-73.

Dykstra M, Cherukuri A, Sohn HW, Tzeng SJ, Pierce SK. Location is everything: lipid rafts and immune cell signaling. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:457-81.

Dzialo-Hatton R, Milbrandt J, Hockett RD Jr, Weaver CT. Differential expression of Fas ligand in Th1 and Th2 cells is regulated by early growth response gene and NF-AT family members. *J Immunol.* 2001 Apr 1;166(7):4534-42.

Fas SC, Baumann S, Krueger A, Frey CR, Schulze-Bergkamen H, Brenner D, Stumpf C, Kappes K, Krammer PH. In vitro generated human memory-like T cells are CD95 type II cells and resistant towards CD95-mediated apoptosis. *Eur J Immunol.* 2006 Nov;36(11):2894-903.

Feng L, Sun W, Xia Y, Tang WW, Chanmugam P, Soyoola E, Wilson CB, Hwang D. Cloning two isoforms of rat cyclooxygenase: differential regulation of their expression. *Arch Biochem Biophys.* 1993 Dec;307(2):361-8.

Gazzinelli RT, Ropert C, Campos MA. Role of the Toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in host resistance and pathogenesis during infection with protozoan parasites. *Immunol Rev.* 2004 Oct;201:9-25.

Gelman AE, Zhang J, Choi Y, Turka LA. Toll-like receptor ligands directly promote activated CD4+ T cell survival. *J Immunol.* 2004 May 15;172(10):6065-73.

Genestier L, Kasibhatla S, Brunner T, Green DR. Transforming growth factor beta1 inhibits Fas ligand expression and subsequent activation-induced cell death in T cells via downregulation of c-Myc. *J Exp Med.* 1999 Jan 18;189(2):231-9.

Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol.* 1998;16:225-60.

Gimmi CD, Freeman GJ, Gribben JG, Gray G, Nadler LM. Human T-cell clonal anergy is induced by antigen presentation in the absence of B7 costimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Jul 15;90(14):6586-90.

Gourley TS, Chang CH. Cutting edge: the class II transactivator prevents activation-induced cell death by inhibiting Fas ligand gene expression. *J Immunol.* 2001 Mar 1;166(5):2917-21.

Han EH, Kim JY, Kim HG, Choi JH, Im JH, Woo ER, Jeong HG. Dihydro-N-caffeoyltyramine down-regulates cyclooxygenase-2 expression by inhibiting the activities of C/EBP and AP-1 transcription factors. *Food Chem Toxicol.* 2010 Feb;48(2):579-86.

Han EH, Park JH, Kang KW, Jeong TC, Kim HS, Jeong HG. Risk assessment of tetrabromobisphenol A on cyclooxygenase-2 expression via MAP kinase/NF-kappaB/AP-1 signaling pathways in murine macrophages. *J Toxicol Environ Health A.* 2009;72(21-22):1431-8.

Haskins K, Kubo R, White J, Pigeon M, Kappler J, Marrack P. The major histocompatibility complex-restricted antigen receptor on T cells. I. Isolation with a monoclonal antibody. *J Exp Med.* 1983 Apr 1;157(4):1149-69.

Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature.* 2000 Dec 7;408(6813):740-5.

Hildeman DA, Zhu Y, Mitchell TC, Bouillet P, Strasser A, Kappler J, Marrack P. Activated T cell death in vivo mediated by proapoptotic bcl-2 family member bim. *Immunity.* 2002 Jun;16(6):759-67.

Hildeman DA, Zhu Y, Mitchell TC, Kappler J, Marrack P. Molecular mechanisms of activated T cell death in vivo. *Curr Opin Immunol.* 2002 Jun;14(3):354-9.

Hodge MR, Ranger AM, Charles de la Brousse F, Hoey T, Grusby MJ, Glimcher LH. Hyperproliferation and dysregulation of IL-4 expression in NF-ATp-deficient mice. *Immunity.* 1996 Apr;4(4):397-405.

Huang AY, Qi H, Germain RN. Illuminating the landscape of in vivo immunity: insights from dynamic in situ imaging of secondary lymphoid tissues. *Immunity*. 2004 Sep;21(3):331-9.

Hughes PD, Belz GT, Fortner KA, Budd RC, Strasser A, Bouillet P. Apoptosis regulators Fas and Bim cooperate in shutdown of chronic immune responses and prevention of autoimmunity. *Immunity*. 2008 Feb;28(2):197-205.

Hutcheson J, Scatizzi JC, Siddiqui AM, Haines GK 3rd, Wu T, Li QZ, Davis LS, Mohan C, Perlman H. Combined deficiency of proapoptotic regulators Bim and Fas results in the early onset of systemic autoimmunity. *Immunity*. 2008 Feb;28(2):206-17.

Irmeler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, Bodmer JL, Schröter M, Burns K, Mattmann C, Rimoldi D, French LE, Tschopp J. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature*. 1997 Jul 10;388(6638):190-5.

Ishiwatari-Hayasaka H, Kawashima H, Osawa T, Nagata S, Miyasaka M. Induction of cell death by chimeric L-selectin-Fas receptors. *Int Immunol*. 1997 Apr;9(4):627-35.

Iwamoto S, Iwai S, Tsujiyama K, Kurahashi C, Takeshita K, Naoe M, Masunaga A, Ogawa Y, Oguchi K, Miyazaki A. TNF-alpha drives human CD14+ monocytes to differentiate into CD70+ dendritic cells evoking Th1 and Th17 responses. *J Immunol*. 2007 Aug 1;179(3):1449-57.

Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol*. 2004 Oct;5(10):987-95.

Ju ST, Panka DJ, Cui H, Ettinger R, el-Khatib M, Sherr DH, Stanger BZ, Marshak-Rothstein A. Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. *Nature*. 1995 Feb 2;373(6513):444-8.

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

Kappler JW, Skidmore B, White J, Marrack P. Antigen-inducible, H-2-restricted, interleukin-2-producing T cell hybridomas. Lack of independent antigen and H-2 recognition. *J Exp Med.* 1981 May 1;153(5):1198-214.

Kasibhatla S, Genestier L, Green DR. Regulation of fas-ligand expression during activation-induced cell death in T lymphocytes via nuclear factor kappaB. *J Biol Chem.* 1999 Jan 8;274(2):987-92.

Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Semin Immunol.* 2007 Feb;19(1):24-32.

Kawai T, Takeuchi O, Fujita T, Inoue J, Mühlradt PF, Sato S, Hoshino K, Akira S. Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. *J Immunol.* 2001 Nov 15;167(10):5887-94.

Kirchhoff S, Müller WW, Krueger A, Schmitz I, Krammer PH. TCR-mediated up-regulation of c-FLIPshort correlates with resistance toward CD95-mediated apoptosis by blocking death-inducing signaling complex activity. *J Immunol.* 2000 Dec 1;165(11):6293-300.

Kirchhoff S, Sebens T, Baumann S, Krueger A, Zawatzky R, Li-Weber M, Meinel E, Neipel F, Fleckenstein B, Krammer PH. Viral IFN-regulatory factors inhibit activation-induced cell death via two positive regulatory IFN-regulatory factor 1-dependent domains in the CD95 ligand promoter. *J Immunol.* 2002 Feb 1;168(3):1226-34.

Kobayashi T, Narumiya S. Function of prostanoid receptors: studies on knockout mice. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2002 Aug;68-69:557-73.

Kopp E, Medzhitov R. Recognition of microbial infection by Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol.* 2003 Aug;15(4):396-401.

Kopp EB, Medzhitov R. The Toll-receptor family and control of innate immunity. *Curr Opin Immunol.* 1999 Feb;11(1):13-8.

Korsmeyer SJ, Wei MC, Saito M, Weiler S, Oh KJ, Schlesinger PH. Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death Differ.* 2000 Dec;7(12):1166-73.

Krammer PH. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature.* 2000 Oct 12;407(6805):789-95.

Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* 2009 Jan;16(1):3-11.

Krug A, Rothenfusser S, Hornung V, Jahrsdörfer B, Blackwell S, Ballas ZK, Endres S, Krieg AM, Hartmann G. Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN- $\alpha$ / $\beta$  in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol.* 2001 Jul;31(7):2154-63.

Kumar H, Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 Oct 30;388(4):621-5. Epub 2009 Aug 15.

Kurt-Jones EA, Popova L, Kwinn L, Haynes LM, Jones LP, Tripp RA, Walsh EE, Freeman MW, Golenbock DT, Anderson LJ, Finberg RW. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol.* 2000 Nov;1(5):398-401.

Latinis KM, Carr LL, Peterson EJ, Norian LA, Eliason SL, Koretzky GA. Regulation of CD95 (Fas) ligand expression by TCR-mediated signaling events. *J Immunol.* 1997 May 15;158(10):4602-11.

Lee MO, Kang HJ, Kim YM, Oum JH, Park J. Repression of FasL expression by retinoic acid involves a novel mechanism of inhibition of transactivation function

of the nuclear factors of activated T-cells. *Eur J Biochem.* 2002 Feb;269(4):1162-70.

Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell.* 1996 Sep 20;86(6):973-83.

Leo O, Foo M, Sachs DH, Samelson LE, Bluestone JA. Identification of a monoclonal antibody specific for a murine T3 polypeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987 Mar;84(5):1374-8.

Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell.* 1997 Nov 14;91(4):479-89.

Lien E, Sellati TJ, Yoshimura A, Flo TH, Rawadi G, Finberg RW, Carroll JD, Espevik T, Ingalls RR, Radolf JD, Golenbock DT. Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products. *J Biol Chem.* 1999 Nov 19;274(47):33419-25.

Liu Y, Janeway CA Jr. Cells that present both specific ligand and costimulatory activity are the most efficient inducers of clonal expansion of normal CD4 T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 May 1;89(9):3845-9.

Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell.* 1998 Aug 21;94(4):481-90.

Martin M, Neumann D, Hoff T, Resch K, DeWitt DL, Goppelt-Struebe M. Interleukin-1-induced cyclooxygenase 2 expression is suppressed by cyclosporin A in rat mesangial cells. *Kidney Int.* 1994 Jan;45(1):150-8.

Matsui K, Xiao S, Fine A, Ju ST. Role of activator protein-1 in TCR-mediated regulation of the murine *fasl* promoter. *J Immunol.* 2000 Mar 15;164(6):3002-8.



Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. 1997 Jul 24;388(6640):394-7.

Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*. 2007 Oct 18;449(7164):819-26.

Melino G, Bernassola F, Catani MV, Rossi A, Corazzari M, Sabatini S, Vilbois F, Green DR. Nitric oxide inhibits apoptosis via AP-1-dependent CD95L transactivation. *Cancer Res*. 2000 May 1;60(9):2377-83.

Meyers JH, Chakravarti S, Schlesinger D, Illes Z, Waldner H, Umetsu SE, Kenny J, Zheng XX, Umetsu DT, DeKruyff RH, Strom TB, Kuchroo VK. TIM-4 is the ligand for TIM-1, and the TIM-1-TIM-4 interaction regulates T cell proliferation. *Nat Immunol*. 2005 May;6(5):455-64.

Molina CA, Foulkes NS, Lalli E, Sassone-Corsi P. Inducibility and negative autoregulation of CREM: an alternative promoter directs the expression of ICER, an early response repressor. *Cell*. 1993 Dec 3;75(5):875-86.

Moser M, Murphy KM. Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. *Nat Immunol*. 2000 Sep;1(3):199-205.

Moynagh PN. TLR signalling and activation of IRFs: revisiting old friends from the NF-kappaB pathway. *Trends Immunol*. 2005 Sep;26(9):469-76.

Muppidi JR, Siegel RM. Ligand-independent redistribution of Fas (CD95) into lipid rafts mediates clonotypic T cell death. *Nat Immunol*. 2004 Feb;5(2):182-9.

Muzio M, Ni J, Feng P, Dixit VM. IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. *Science*. 1997 Nov 28;278(5343):1612-5.

Nagata S, Suda T. Fas and Fas ligand: lpr and gld mutations. *Immunol Today*. 1995 Jan;16(1):39-43.

Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science*. 1995 Mar 10;267(5203):1449-56.

Netea MG, Van der Graaf C, Van der Meer JW, Kullberg BJ. Recognition of fungal pathogens by Toll-like receptors. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2004 Sep;23(9):672-6.

Norian LA, Latinis KM, Koretzky GA. A newly identified response element in the CD95 ligand promoter contributes to optimal inducibility in activated T lymphocytes. *J Immunol*. 1998 Aug 1;161(3):1078-82.

Okusawa T, Fujita M, Nakamura J, Into T, Yasuda M, Yoshimura A, Hara Y, Hasebe A, Golenbock DT, Morita M, Kuroki Y, Ogawa T, Shibata K. Relationship between structures and biological activities of mycoplasmal diacylated lipopeptides and their recognition by toll-like receptors 2 and 6. *Infect Immun*. 2004 Mar;72(3):1657-65.

Oshimi Y, Oda S, Honda Y, Nagata S, Miyazaki S. Involvement of Fas ligand and Fas-mediated pathway in the cytotoxicity of human natural killer cells. *J Immunol*. 1996 Oct 1;157(7):2909-15.

Pasare C, Medzhitov R. Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Adv Exp Med Biol*. 2005;560:11-8.

Peter ME, Krammer PH. Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis. *Curr Opin Immunol*. 1998 Oct;10(5):545-51.

Peterson BR, Sun LJ, Verdine GL. A critical arginine residue mediates cooperativity in the contact interface between transcription factors NFAT and AP-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Nov 26;93(24):13671-6.

Pichlmair A, Reis e Sousa C. Innate recognition of viruses. *Immunity*. 2007 Sep;27(3):370-83.

Poppema S, Maggio E, van den Berg A. Development of lymphoma in Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome (ALPS) and its relationship to Fas gene mutations. *Leuk Lymphoma*. 2004 Mar;45(3):423-31.

Ralph P, Moore MA, Nilsson K. Lysozyme synthesis by established human and murine histiocytic lymphoma cell lines. *J Exp Med*. 1976 Jun 1;143(6):1528-33.

Rieux-Laucat F, Le Deist F, Hivroz C, Roberts IA, Debatin KM, Fischer A, de Villartay JP. Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science*. 1995 Jun 2;268(5215):1347-9.

Ritter M, Mennerich D, Weith A, Seither P. Characterization of Toll-like receptors in primary lung epithelial cells: strong impact of the TLR3 ligand poly(I:C) on the regulation of Toll-like receptors, adaptor proteins and inflammatory response. *J Inflamm (Lond)*. 2005 Nov 29;2:16.

Robinson MJ, Osorio F, Rosas M, Freitas RP, Schweighoffer E, Gross O, Verbeek JS, Ruland J, Tybulewicz V, Brown GD, Moita LF, Taylor PR, Reis e Sousa C. Dectin-2 is a Syk-coupled pattern recognition receptor crucial for Th17 responses to fungal infection. *J Exp Med*. 2009 Aug 31;206(9):2037-51.

Rosen A, Casciola-Rosen L. Macromolecular substrates for the ICE-like proteases during apoptosis. *J Cell Biochem*. 1997 Jan;64(1):50-4.

Roths JB, Murphy ED, Eicher EM. A new mutation, *gld*, that produces lymphoproliferation and autoimmunity in C3H/HeJ mice. *J Exp Med*. 1984 Jan 1;159(1):1-20.

Ruckdeschel K, Pfaffinger G, Haase R, Sing A, Weighardt H, Häcker G, Holzmann B, Heesemann J. Signaling of apoptosis through TLRs critically involves toll/IL-1 receptor domain-containing adapter inducing IFN-beta, but not

MyD88, in bacteria-infected murine macrophages *J Immunol.* 2004 Sep 1;173(5):3320-8.

Schmitz I, Krueger A, Baumann S, Schulze-Bergkamen H, Krammer PH, Kirchhoff S. An IL-2-dependent switch between CD95 signaling pathways sensitizes primary human T cells toward CD95-mediated activation-induced cell death. *J Immunol.* 2003 Sep 15;171(6):2930-6.

Schnare M, Barton GM, Holt AC, Takeda K, Akira S, Medzhitov R. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nat Immunol.* 2001 Oct;2(10):947-50.

Selvaraj P, Plunkett ML, Dustin M, Sanders ME, Shaw S, Springer TA. The T lymphocyte glycoprotein CD2 binds the cell surface ligand LFA-3. *Nature.* 1987 Mar 26-Apr 1;326(6111):400-3.

Shi Y, Glynn JM, Guilbert LJ, Cotter TG, Bissonnette RP, Green DR. Role for c-myc in activation-induced apoptotic cell death in T cell hybridomas. *Science.* 1992 Jul 10;257(5067):212-4.

Shimazu R, Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukudome K, Miyake K, Kimoto M. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med.* 1999 Jun 7;189(11):1777-82.

Shimizu T, Kida Y, Kuwano K. Triacylated lipoproteins derived from *Mycoplasma pneumoniae* activate nuclear factor-kappaB through toll-like receptors 1 and 2. *Immunology.* 2007 Aug;121(4):473-83.

Skaug B, Jiang X, Chen ZJ. The role of ubiquitin in NF-kappaB regulatory pathways. *Annu Rev Biochem.* 2009;78:769-96.

Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem.* 2000;69:145-82.

Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:685-711.

Stranges PB, Watson J, Cooper CJ, Choisy-Rossi CM, Stonebraker AC, Beighton RA, Hartig H, Sundberg JP, Servick S, Kaufmann G, Fink PJ, Chervonsky AV. Elimination of antigen-presenting cells and autoreactive T cells by Fas contributes to prevention of autoimmunity. *Immunity.* 2007 May;26(5):629-41.

Strasser A, Jost PJ, Nagata S. The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. *Immunity.* 2009 Feb 20;30(2):180-92.

Strasser A, Pellegrini M. T-lymphocyte death during shutdown of an immune response. *Trends Immunol.* 2004 Nov;25(11):610-5.

Suhara T, Kim HS, Kirshenbaum LA, Walsh K. Suppression of Akt signaling induces Fas ligand expression: involvement of caspase and Jun kinase activation in Akt-mediated Fas ligand regulation. *Mol Cell Biol.* 2002 Jan;22(2):680-91.

Sutmuller RP, Morgan ME, Netea MG, Grauer O, Adema GJ. Toll-like receptors on regulatory T cells: expanding immune regulation. *Trends Immunol.* 2006 Aug;27(8):387-93.

Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:335-76. Epub 2001 Dec 19.

Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol.* 2005 Jan;17(1):1-14.

Takeuchi O, Kaufmann A, Grote K, Kawai T, Hoshino K, Morr M, Mühlradt PF, Akira S. Cutting edge: preferentially the R-stereoisomer of the mycoplasmal lipopeptide macrophage-activating lipopeptide-2 activates immune cells through

a toll-like receptor 2- and MyD88-dependent signaling pathway. *J Immunol.* 2000 Jan 15;164(2):554-7.

Tanaka M, Itai T, Adachi M, Nagata S. Downregulation of Fas ligand by shedding. *Nat Med.* 1998 Jan;4(1):31-6.

Thome M, Tschopp J. Regulation of lymphocyte proliferation and death by FLIP. *Nat Rev Immunol.* 2001 Oct;1(1):50-8.

Tilley SL, Coffman TM, Koller BH. Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. *J Clin Invest.* 2001 Jul;108(1):15-23.

Tschopp J, Irmeler M, Thome M. Inhibition of fas death signals by FLIPs. *Curr Opin Immunol.* 1998 Oct;10(5):552-8.

Van Parijs L, Ibraghimov A, Abbas AK. The roles of costimulation and Fas in T cell apoptosis and peripheral tolerance. *Immunity.* 1996 Mar;4(3):321-8.

Villalba M, Kasibhatla S, Genestier L, Mahboubi A, Green DR, Altman A. Protein kinase ctheta cooperates with calcineurin to induce Fas ligand expression during activation-induced T cell death. *J Immunol.* 1999 Dec 1;163(11):5813-9.

Villunger A, Ghaffari-Tabrizi N, Tinhofer I, Krumböck N, Bauer B, Schneider T, Kasibhatla S, Greil R, Baier-Bitterlich G, Uberall F, Green DR, Baier G. Synergistic action of protein kinase C theta and calcineurin is sufficient for Fas ligand expression and induction of a crmA-sensitive apoptosis pathway in Jurkat T cells. *Eur J Immunol.* 1999 Nov;29(11):3549-61.

Watanabe T, Sakai Y, Miyawaki S, Shimizu A, Koiwai O, Ohno K. A molecular genetic linkage map of mouse chromosome 19, including the *Ipr*, *Ly-44*, and *Tdt* genes. *Biochem Genet.* 1991 Aug;29(7-8):325-35.

Weant AE, Michalek RD, Khan IU, Holbrook BC, Willingham MC, Grayson JM. Apoptosis regulators Bim and Fas function concurrently to control autoimmunity and CD8+ T cell contraction. *Immunity*. 2008 Feb;28(2):218-30.

Weinlich R, Bortoluci KR, Chehab CF, Serezani CH, Ulbrich AG, Peters-Golden M, Russo M, Amarante-Mendes GP. TLR4/MYD88-dependent, LPS-induced synthesis of PGE2 by macrophages or dendritic cells prevents anti-CD3-mediated CD95L upregulation in T cells. *Cell Death Differ*. 2008 Dec;15(12):1901-9.

Werts C, Girardin SE, Philpott DJ. TIR, CARD and PYRIN: three domains for an antimicrobial triad. *Cell Death Differ*. 2006 May;13(5):798-815.

Yamamoto M, Sato S, Mori K, Hoshino K, Takeuchi O, Takeda K, Akira S. Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol*. 2002 Dec 15;169(12):6668-72.

Yonekura K, Maki-Yonekura S, Namba K. Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy. *Nature*. 2003 Aug 7;424(6949):643-50.

Lee YJ, Park SY, Kim SG, Park da J, Kang JS, Lee SJ, Yoon S, Kim YH, Bae YS, Choi YW. Identification of a novel compound that inhibits iNOS and COX-2 expression in LPS-stimulated macrophages from *Schisandra chinensis*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Jan 22;391(4):1687-92.

Zhang Y, Xu G, Zhang L, Roberts AI, Shi Y. Th17 cells undergo Fas-mediated activation-induced cell death independent of IFN-gamma. *J Immunol*. 2008 Jul 1;181(1):190-6.

Zhang D, Zhang G, Hayden MS, Greenblatt MB, Bussey C, Flavell RA, Ghosh S. A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science*. 2004 Mar 5;303(5663):1522-6.