Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Programa de Pós-Graduação em Genética

Ernna Hérída Domingues de Oliveira

*Vias de regulação da expressão gênica promíscua no timo
envolve Aire e microRNAs*

RIBEIRÃO PRETO
2013

Ernna Hérída Domingues de Oliveira

***Vias de regulação da expressão gênica promíscua no timo
envolve Aire e microRNAs***

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em
Ciências.

Área de Concentração: Genética

Orientador: Prof. Dr. Geraldo A.
S. Passos

RIBEIRÃO PRETO
2013

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.

FICHA CATALOGRÁFICA

Oliveira, Ernna Hérída Domingues

Vias de regulação da expressão gênica promíscua no timo envolve Aire e microRNAs.

Ribeirão Preto, 2013.
149p.

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Área de concentração: Genética.

Orientador: Passos, Geraldo Aleixo

1. Timo. 2. Expressão Gênica Promíscua. 3. *Autoimmune Regulator* (Aire). 3. Diabetes mellitus tipo 1. 4. microRNAs 5. *Microarrays*.

Apoio e suporte financeiro

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Imunogenética Molecular, localizado no Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) – USP com apoio financeiro das seguintes entidades e instituições:

- ❖ Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) por meio da bolsa de Doutorado Processo 2009/54694-8.
 - ❖ Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) por meio do Projeto Temático Processo 08/56594-8.
 - ❖ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-FMRP/USP.
 - ❖ Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por meio da bolsa de Doutorado Sanduíche em Marseille, França, Processo 201207/2012-5.
-

Dedicatória

Aos meus pais, Osório e Ida por terem se dedicado integralmente à minha vida e à vida das minhas irmãs; pelo amor e compreensão fornecidos diariamente; e principalmente por terem me dado forças em todas as etapas que me fizeram chegar até aqui. Pai, mãe todas as vitórias da minha vida serão dedicadas a vocês! Muito obrigada por todo amor, apoio e orações.

Agradecimentos

Meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas que colaboraram e participaram, diretamente ou indiretamente, da realização deste trabalho e da minha formação profissional.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Geraldo Passos, pela orientação e dedicação durante a realização deste trabalho, e por seu exemplo de profissionalismo e amor à ciência. Muito obrigada pelo incentivo e pela conduta diária.

Ao Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, por contribuir com a minha formação profissional e por todos os auxílios concedidos. Em especial agradeço ao Prof. Dr. Ademilson Espencer Egea Soares, e as secretárias Susie e Silvia.

A FAPESP pelo auxílio concedido por meio da bolsa de Doutorado, e pelo apoio de suma importância para o desenvolvimento deste projeto; ao CNPQ pelo auxílio concedido por meio da bolsa de Doutorado Sanduíche.

A prof. Dr. Catherine Nguyen pela orientação durante o meu Doutorado Sanduíche em Marseille, no Institut National de La Santé et de La Recherche Médicale. INSERM U1090.

Aos colegas do grupo de Imunogenética Molecular que estiveram comigo durante esses quatro anos, contribuindo direto ou indiretamente durante a realização do meu trabalho. Principalmente, Amanda Assis por estar sempre disposta a ajudar e Paula Barbim pela colaboração durante os experimentos de clonagem e ensaio de luciferase; e aos novos e queridos integrantes Mikhael Haruo, Maritza Salas e Rafaela Felício, pela alegria, risadas e parceria diária.

A Pós-Doutoranda Cristhianna Collares, muito obrigada pela colaboração, força e amizade durante esses anos de convivência.

Aos meus queridos amigos de Goiânia e Ribeirão Preto, muito obrigada por alegrarem os meus dias.

As minhas irmãs Hágnes e Ertha, muito obrigada pelo amor, amizade e orações. E Aos meus sobrinhos Henrique, Daniel e Luíza por alegrarem as nossas vidas.

Ao meu namorado Gustavo Cruzeiro, por todo amor, apoio e dedicação! Muito obrigada por trazer paz para o meu coração e felicidade para minha vida! Amo você.

E especialmente, gostaria de agradecer a Deus... que me deu forças em todos os momentos, principalmente nos que achei que não era forte o suficiente para aguentar, e lá estava ele segurando as minhas mãos. **“Mas os que esperam no Senhor renovarão as forças, subirão com asas como águias; correrão, e não se cansarão; caminharão, e não se fatigarão” Isaías 40:31.**

RESUMO

O timo é um órgão linfóide primário, no qual ocorre a indução da tolerância imunológica central aos antígenos do próprio que são expressos pelos tecidos periféricos (PTAs). A medula tímica é formada por células tímicas medulares epiteliais (mTECs) que expressam centenas desses PTAs que representam virtualmente todos os órgãos e tecidos do corpo. Esse fenômeno foi denominado de expressão gênica promíscua (PGE) a qual é parcialmente regulada pelo modulador da transcrição *Autoimmune regulator* (Aire). Os precursores de células T oriundos da medula óssea migram para o timo (agora são denominados de timócitos) e na medula desse órgão, passam pela seleção negativa mediada pelas mTECs. As células sobreviventes evoluem para células T maduras e funcionais que migram para a periferia com capacidade de reconhecimento das moléculas de MHC e tolerantes aos PTAs. Além de controlar a transcrição de genes PTAs, Aire também controla a expressão de microRNAs (miRNAs), relacionados com a integridade e funcionalidade do microambiente tímico. A seleção negativa no timo é um processo essencial para a manutenção da autotolerância imunológica e o desbalanço desse processo está associado com o desenvolvimento de doenças autoimunes como, por exemplo, o diabetes mellitus do tipo 1 (DM1). Tendo em vista essas premissas, nosso trabalho se fundamentou em duas hipóteses: 1) Variações na expressão do gene Aire podem perturbar a expressão de genes PTAs e miRNAs no timo, causando alterações na PGE, 2) A expressão balanceada de genes como Aire e/ou PTAs nas mTECs, é fundamental para a integridade da tolerância central. O desbalanço na expressão desses genes, está associado com a emergência do diabetes mellitus tipo 1 no camundongo. Para testar nossa primeira hipótese efetuamos o silenciamento de Aire (Aire knockdown) por meio de eletrotransfecção de RNA interferente (siRNA) anti-Aire *in vivo* no timo de camundongos BALB/c. Análises do transcriptoma (mRNAs) e miRNoma (miRNAs) das mTECs, revelaram que silenciamento parcial e transitório de Aire foi suficiente para afetar a expressão de PTAs Aire dependentes bem como a de miRNAs. Redes de interação miRNA-mRNA, revelaram que o controle pós-transcricional da PGE também é afetado pelo silenciamento de Aire. Os resultados encontrados revelam que Aire e miRNAs podem formar uma via essencial durante a indução da tolerância central. Para testar nossa segunda hipótese comparamos o transcriptoma de mTECs de camundongos BALB/c (linhagem não-autoimune) com mTECs de camundongos *non-obese diabetic* NOD (modelo animal utilizado nos estudos de DM1 autoimune). Nossos resultados revelaram que a expressão transcricional de autoantígenos relacionados ao DM1 está desbalanceada em camundongos NOD já numa fase precoce, quando esses animais ainda não apresentavam a doença clínica (fase pré-diabética). Inesperadamente, os níveis transcripcionais de Aire apresentaram-se equivalentes no timo dessas duas linhagens, porém os níveis da proteína AIRE estavam reduzidos no timo da linhagem NOD. Esses resultados sugerem a participação de algum mecanismo de atenuação pós-transcricional de Aire nessa linhagem provavelmente envolvendo atuação de miRNAs. Isso poderia explicar o desbalanço de PTAs Aire-dependentes e a repressão autoantígenos relacionados ao DM1. Concluímos que nossos resultados, além de abrir novas perspectivas para pesquisas nesta área, contribuem com melhor compreensão dos mecanismos moleculares desencadeados por Aire e por miRNAs no controle da expressão de autoantígenos no timo o que é importante para a tolerância imunológica central.

Palavras-chave: Tolerância imunológica central, expressão gênica promíscua, *Autoimmune Regulator* (Aire), diabetes mellitus tipo 1, microRNAs, *microarrays*.

ABSTRACT

The thymus is a primary lymphoid organ, in which occurs in the induction of central immune tolerance to self peripheral tissue antigens (PTAs). The thymic medulla is formed by medullary thymic epithelial cells (mTECs) expressing hundreds of such PTAs representing virtually all organs and tissues of the body. This phenomenon has been termed promiscuous gene expression (PGE), which is partially regulated by the Autoimmune regulator (Aire) gene. The T cell precursors derived from the bone marrow migrate to the thymus (now termed thymocytes). A part of these thymocytes are eliminated by negative selection mediated mTEC cells. The surviving cells to evolve and functional mature T cells that migrate to the periphery and are capable of recognizing MHC molecules and are tolerant to PTAs. In addition to controlling the transcription of PTA genes, Aire also controls the expression of microRNAs (miRNAs). The negative selection in the thymus is a process essential to the maintenance of immunologic self-tolerance and imbalance of this process is associated with the development of autoimmune diseases such as type 1 diabetes mellitus (DM1). Given these assumptions, our work was based on two hypothesis: 1) Changes in the expression of the Aire gene can disrupt the expression of PTA genes and miRNAs in the thymus, causing changes in PGE, 2) The balanced expression of Aire / or PTA genes in mTECs is fundamental for central tolerance. The imbalance in the expression of these genes is associated with the emergence of type 1 diabetes in mice. To test our first hypothesis we made Aire silencing (Aire knockdown) through electrotransfection of anti - Aire interfering RNA (siRNA) in vivo in the thymus of BALB/c mice. Analysis of the transcriptome (mRNAs) and miRNome (miRNAs) of mTECs revealed that partial and transient silencing of Aire was enough to affect the expression of Aire - dependent PTAs as well as miRNAs. miRNA -mRNA interaction networks revealed that the post-transcriptional control of PGE is also affected by the silencing of Aire. The results show that Aire and can form an miRNA pathway essential for the induction of central tolerance. To test our second hypothesis we compared the transcriptome of mTECs of BALB/c mice (non-autoimmune strain) with mTECs from non - obese diabetic NOD (animal model used in studies of autoimmune DM1). Our results indicate that the transcriptional expression of DM1-related autoantigens are unbalanced in NOD mice in an very early stage, when these animals have not had clinical disease (pre-diabetic period). Unexpectedly, the transcriptional levels of Aire in the thymus was equivalent in these two strains, but the AIRE protein levels were reduced in thymus of NOD strain. These results suggest that some mechanism of post-transcriptional attenuation of Aire is acting in this lineage probably involving action of miRNAs. This could explain the imbalance of Aire - dependent PTAs and repression autoantigens related to DM1. Our results open perspectives for research in this area, contributing to better understanding the molecular mechanisms triggered by Aire and miRNAs in control of the expression of autoantigens in the thymus, which is important for the central immune tolerance.

Keywords: Central immune tolerance, promiscuous gene expression, *Autoimmune Regulator* (Aire), type 1 diabetes, microarrays.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Microambiente celular tímico e maturação das células T.....	19
Figura 2- Aire: da regulação da transcrição a indução da tolerância central.....	20
Figura 3- Biogênese e ação dos miRNAs em células animais.....	27
Figura 4- Fisiologia tímica e disfunção tímica como um evento primário no desenvolvimento de DM1.....	34
Figura 5- Demonstração do processo de eletroporação no timo <i>in vivo</i>	44
Figura 6- Eletroforese microfluídica (A) ou (B) densitometria das amostras de RNA total isoladas de mTECs de timos de camundongos BALB/c ou NOD.....	47
Figura 7- Avaliação histológica do timo de camundongo BALB/c através de microscopia fluorescente após a eletrotransfecção <i>in vivo</i>	61
Figura 8- Avaliação histológica do timo de camundongo BALB/c.....	62
Figura 9- Evolução temporal do silenciamento do gene Aire <i>in vivo</i> no timo.....	63
Figura 10- Análise por qRT-PCR de amostras de RNA de estroma tímico eletrotransfectado com PBS (controle) ou com siRNA irrelevante.....	64
Figura 11- Avaliação dos níveis transcricionais de Aire em mTECs isoladas do estroma tímico 48h após ao processo de eletrotransfecção com PBS ou com siRNA anti-Aire..	65
Figura 12- Detecção da proteína AIRE por imunofluorescência.....	66
Figura 13- Comparação dos perfis de expressão entre mTECs controle e mTECs Aire silenciadas.....	67
Figura 14- Confirmação dos dados de <i>microarrays</i> por qRT-PCR ensaiando os genes de PTAs diferencialmente expressos após o silenciamento do gene Aire.....	69
Figura 15- Comparação entre os perfis de expressão de mTECs controle e Aire silenciadas.....	71
Figura 16- Posicionamento de G-boxes (barras vermelhas) e T-boxes (barras azuis) que representam sítios de ligação da RNA Pol II em genes de miRNAs.....	75
Figura 17- Rede de interação pós-transcricional de miRNAs com os seus respectivos mRNAs alvos em mTECs controle.....	77
Figura 18- Rede de interação pós-transcricional de miRNAs com os seus respectivos mRNAs alvos em mTECs Aire silenciadas.....	78

Figura 19- Representação tecidual dos mRNAs alvos presentes nas redes de interação de mTECs controle ou mTECs Aire silenciadas.....	80
Figura 20- Estrutura molecular de interações entre miRNA-mRNA modulados após o silenciamento de Aire e preditos nos bancos de dados DianaMT, miRanda, miRDB, miRWalk e Targetscan, e suas respectivas energias livres de interação obtidas com o programa RNAhybrid.....	82
Figura 21- Comparação histológica do timo de camundongos BALB/c e NOD.....	83
Figura 22- Comparação dos perfis de expressão transcricional de mTECs de BALB/c e de NOD. Matriz de expressão de autoantígenos específicos de DM1 e de genes PTAs Aire dependentes modulados.....	84
Figura 23- Confirmação dos dados de <i>microarrays</i> por qRT-PCR focando autoantígenos específicos de DM1 em mTECs de camundongo BalB/c e NOD.....	86
Figura 24- Avaliação dos níveis transcricionais do gene Aire em mTECs isoladas de timos de camundongos BALB/c e de NOD por PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR).....	87
Figura 25- Avaliação da modulação da expressão do gene Aire durante o desenvolvimento de DM1 em camundongos NOD.....	88
Figura 26- Análises dos sinais de imunofluorescência da proteína Aire no timo de camundongos BALB/c e NOD.....	89
Figura 27- Número (média) de mTECs AIRE ⁺ no estroma tímico de camundongos BALB/c e NOD.....	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Genes de antígenos de tecidos periféricos (PTA) e suas modulações em mTECs submetidas ao silenciamento do gene Aire *in vivo* no timo.....68

Tabela 2- miRNAs modulados, induzidos ou reprimidos após o silenciamento de Aire *in vivo*.....72

Tabela 3- Análise de interações preditas em bancos dos mRNAs de PTAs Aire dependentes e miRNAs modulados após o silenciamento de Aire.....81

Tabela 4- Representação, regulação transcricional e localização cromossômica de autoantígenos específicos de DM1 em células mTECs de camundongos NOD e BALB/c.....85

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Desenvolvimento das células T e a indução da tolerância central.....	17
1.2 Aire e o seu papel no controle transcricional da PGE.....	21
1.2.1 A descoberta de Aire.....	21
1.2.2 Mecanismo de ação de Aire.....	22
1.3 Biologia dos microRNAs e seu papel no controle pós-transcricional da PGE.....	24
1.3.1 Descoberta, conceitos e características dos microRNAs.....	24
1.3.2 Biogênese dos miRNAs.....	25
1.3.3 O Papel dos miRNAs no timo.....	26
1.4 Diabetes mellitus do tipo 1 e o timo.....	28
1.4.1 O Diabetis mellitus tipo 1 (DM1).....	28
1.4.2 Autoantígenos relacionados com o DM1.....	30
1.4.3 Disfunção tímica como um evento primário no DM1.....	31
1.4.4 Utilização de camundongos <i>Nonobese Diabetic</i> (NOD) como modelo de estudo do DM1.....	32
1.5 Análise de transcriptomas pela tecnologia de <i>microarrays</i>	35
2 HIPÓTESE.....	36
3 OBJETIVOS.....	38
3.1 Objetivo Geral.....	39
3.2 Objetivos Específicos.....	39
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	41
4.1 Linhagem de camundongos BALB/c e <i>Non obese diabetic</i> (NOD).....	42
4.2 Avaliação laboratorial do diabetes autoimune nos camundongos NOD.....	42
4.3 Definição de controle e teste.....	43
4.4 Processo de eletroporação no timo <i>in vivo</i>	43
4.5 Análises por microscopia confocal.....	44
4.6 Avaliação histológica da estrutura tímica.....	44
4.7 Imunolocalização da proteína AIRE no estroma tímico.....	45
4.8 Separação de células mTEC a partir de estroma tímico.....	45
4.9 Extração de RNA total e avaliação de sua integridade.....	46

4.10	PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR).....	47
4.11	Oligo microarrays.....	49
4.11.1	mRNAs microarrays.....	49
4.11.2	miRNAs microarrays.....	52
4.12	Análise dos dados de microarrays.....	54
4.13	Identificação dos sítios T-boxes e G-boxes de RNA Polimerase II em genes de miRNAs.....	54
4.14	Localização cromossômica dos genes de mRNAs e de miRNAs.....	55
4.15	Representação tecidual dos genes de PTAs.....	55
4.16	Construção de redes de interação pós-transcricional entre miRNA-mRNA.....	55
4.17	Análise de predições de interações de miRNA-mRNA utilizando bancos de dados públicos.....	57
5	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	58
6	RESULTADOS.....	60
6.1	Monitoramento da entrada de RNA-Cy3 no timo por eletroporação <i>in vivo</i>	61
6.2	Avaliação histológica do timo de camundongo BALB/c por meio de coloração por hematoxilina-eosina.....	61
6.3	Otimização do procedimento de silenciamento do gene Aire por eletrotransfecção <i>in vivo</i> do timo.....	62
6.4	Especificidade do silenciamento do gene Aire.....	63
6.5	Silenciamento do gene Aire em células mTEC.....	64
6.6	Efeito do silenciamento do gênico sobre a expressão da proteína AIRE no timo.....	65
6.7	Efeito do silenciamento de Aire sobre a expressão dos genes de PTAs.....	66
6.8	Análise da expressão transcricional de PTAs de mTECs controle comparada com mTECs Aire silenciadas por PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR).....	69
6.9	miRNAs diferencialmente expressos após o silenciamento do gene Aire.....	70
6.10	Sítios de ligação RNA Pol II nos genes de miRNAs.....	74
6.11	Predição de alvos por meio de redes de interação miRNAs-mRNAs.....	76
6.12	Representação tecidual dos mRNAs alvos presentes nas redes de interação de mTECs controle e mTECs Aire silenciadas.....	79
6.13	Comparação histológica do timo de camundongos BALB/c e NOD.....	82
6.14	Modulação da expressão transcricional de autoantígenos específicos de DM1 em células mTEC de camundongos NOD e de BALB/c.....	83

6.15	Análise da expressão transcricional de autoantígenos específicos de DM1 em mTECs isoladas de timos de camundongos BALB/c comparada com NOD por PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR).....	85
6.16	Comparação da expressão do gene Aire em mTECs de camundongos BALB/c e NOD por PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR).....	86
6.17	Avaliação da modulação do gene Aire durante o desenvolvimento de DM1 em camundongos NOD.....	87
6.18	Imunolocalização da proteína AIRE no estroma tímico de camundongos NOD e BALB/c.....	88
7	DISCUSSÃO.....	90
7.1	Silenciamento do gene Aire.....	91
7.2	Análise da expressão de mRNAs de PTAs diferencialmente expressos sob silenciamento de Aire.....	95
7.3	Influência de Aire na expressão de microRNAs.....	97
7.4	Análise das redes de interação miRNA-mRNA.....	99
7.5	Comparação do perfil transcricional de Aire e de autoantígenos relacionados ao DM1 em mTECs de camundongos BALB/c e NOD.....	102
8	CONCLUSÕES.....	106
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	109
	MANUSCRITO.....	126
	PUBLICAÇÃO.....	141

1. INTRODUÇÃO

1.1 Desenvolvimento das células T e a indução da tolerância central

Ao longo da evolução, o sistema imunológico desenvolveu a capacidade de resposta a antígenos não-próprios, como exemplo microrganismos e células tumorais, e de ser não-responsivo a antígenos próprios, os quais representam os diversos tecidos e órgãos do corpo. Esta última propriedade é a base do conceito de *tolerância imunológica*. Quando há falha nos mecanismos que induzem a tolerância, isso resulta em autoimunidade agressiva, a qual pode levar a destruição de estruturas corpóreas importantes devido à responsividade de células T e B específicas contra os autoantígenos que as representam (GUPTA et al., 2013).

A tolerância imunológica consiste no desenvolvimento da tolerância central e da periférica. Esta última, é mediada pela supressão da resposta inflamatória na periferia, e tem como protagonistas as células T reguladoras (Treg), que podem ser naturais (nTregs), as quais provêm dos processos de seleções tímicas ou as induzidas (iTreg), que são formadas na periferia a partir de células T CD4⁺ (LIN et al., 2013).

Já a tolerância imunológica central, ocorre no timo que é um órgão linfóide primário, envolvido no desenvolvimento e maturação das células T e é considerado de fundamental importância neste processo (MILLER et al., 1961; NOWELL et al., 2007). O repertório nascente de células T no timo determina a diversidade de antígenos próprios e a especificidade da tolerância central (KYEWSKI & DERBINSKI, 2004; MAGALHÃES et al., 2006; DERBINSKI & KYEWSKI, 2010; ALEXANDROPOULOS & DANZL, 2013; YAO & ZHAO, 2013).

O timo possui um ambiente celular altamente dinâmico: as células tímicas epiteliais (TECs) e timócitos são os principais componentes do microambiente tímico no qual as TECs formam uma rede tridimensional na qual se encontram os timócitos em diferentes estágios. Além disso, macrófagos, células dendríticas, fibroblastos e células mesenquimais também estão presentes no timo (NOWELL et al., 2007; BLACKBURN & MANLEY, 2004).

O estroma tímico apresenta duas regiões principais definidas histologicamente: o córtex, formado pelas células tímicas epiteliais corticais (*cortical thymic epithelial cells* – *cTECs*) e a medula, formada pelas células tímicas epiteliais medulares tímicas

(*medullary thymic epithelial cells – mTECs*) que exibem características morfológicas e fenotípicas distintas (NOWELL et al., 2007; BLACKBURN & MANLEY, 2004).

A indução da tolerância imunológica aos antígenos próprios envolve processos de seleção negativa e positiva dos linfócitos T, que têm início quando os precursores das células T (ou linfócitos T) derivados da medula óssea entram no timo na junção cortico-medular e então migram para a junção subcapsular desse órgão através dos vasos sanguíneos. Nessa etapa as células T passam a ser chamadas de timócitos, que inicialmente são duplo negativos (DN) $CD4^- CD8^-$.

A primeira etapa do processo de maturação dos linfócitos T, ocorre no córtex, etapa chamada de seleção positiva, e está relacionada com a indução de sobrevivência de timócitos que acabaram de completar a recombinação das regiões V(D)J dos genes das cadeias α e β do receptor de célula T (TCR). As cTECs são as principais responsáveis por mediar esse processo interagindo com os timócitos através do reconhecimento, com baixa afinidade, pelo MHC próprio. As células que passam com sucesso por essa seleção amadurecem em células T duplo positivas (DP) $CD4^+ CD8^+$ e se acumulam no córtex (TAKAHAMA, 2006).

Finalmente, os timócitos DP migram do córtex para a medula tímica e são submetidos à última etapa de maturação, chamada de seleção negativa que é mediada pelas mTECs. Essas células exibem expressão gênica promíscua (*Promiscuous Gene Expression – PGE*), processo caracterizado pela expressão de um grande grupo de antígenos de tecidos periféricos (PTAs) que representam os diversos tecidos e órgãos do corpo. No camundongo a PGE envolve cerca de 10% do genoma funcional do (KYEWSKI & DERBINSKI, 2004).

A seleção negativa, está diretamente relacionada com a eliminação, por apoptose, de timócitos que reconhecem com alta afinidade os antígenos próprios apresentados via MHC de classe II da própria célula mTEC. Células dendríticas que adquiriram das mTECs os peptídeos de antígenos periféricos também são mediadoras desse processo (FERGUSON et al., 2008). Já os timócitos que reagem fracamente com o complexo MHC-II-peptídeo próprio, amadurecem em células T simples positivas (SP) $CD4^+$ ou $CD8^+$ e são direcionadas para a corrente sanguínea ou vasos linfáticos para desempenharem suas funções efetoras na periferia (TAKAHAMA, 2006) (Figura 1).

Figura 1. Microambiente celular tímico e maturação das células T. O desenvolvimento dos timócitos no interior do timo: Precursores de células T (ou células T imaturas) derivados da medula óssea entram no timo pela junção cortico-medular. Depois migram através do córtex para a região subcapsular como timócitos duplo negativos (DN) $CD4^-CD8^-$. Em seguida, os timócitos DN passam pela seleção positiva mediada pelas cTECs no córtex. Os timócitos DN que passarem com sucesso por essa seleção amadurecem em células T duplo positivas (DP) $CD4^+CD8^+$ as quais se acumulam nessa região. As células DP migram para medula, passam pela seleção negativa mediada pelas células mTECs, e se diferenciam em timócitos simples positivos (SP) $CD4^+CD8^-$ e em seguida deixam o timo através de vasos sanguíneos partindo para a periferia. Por outro lado, cTECs e mTECs maduras são geradas a partir de TECs progenitoras bipotentes que estão presentes no timo. O desenvolvimento de mTECs envolve células indutoras de tecido linfóide (LTi) que auxiliam a diferenciação de mTEC Aire⁻ em mTECs Aire⁺. Setas pontilhadas sugerem os estágios de desenvolvimento das TECs. cMes = células mesenquimais corticais; DC = células dendríticas (Adaptado de Anderson et al., 2007).

A expressão de autoantígenos que representam os diferentes tecidos e órgãos no timo (expressão nas células mTEC) foi denominada “expressão gênica promíscua” (do inglês *promiscuous gene expression* ou PGE) e é um processo chave da auto representação imunológica. Este fenômeno está, em parte, sob o controle do modulador da transcrição *Autoimmune Regulator* (Aire) (DERBINSKI et al., 2001, 2005; TANIGUSHI & ANDERSON, 2001; KYEWSKI et al., 2002; GALLEGOS & BEVAN, 2006; MAGALHÃES et al., 2006; TIKOCINSKI et al., 2008; MATHIS & BENOIST, 2009).

A principal implicação deste tipo de expressão gênica, que é heterogênea e ectópica em mTECs, é a manutenção da homeostase imunológica, controlando a auto reatividade agressiva e prevenindo o desenvolvimento de doenças autoimunes (ANIGUCHI & ANDERSON, 2011) (Figura 2).

Figura 2. Aire: da regulação da transcrição a indução da tolerância central.

Aire promove a transcrição ectópica de um grande número de PTAs cujos genes se encontram em diferentes regiões da cromatina das células mTEC. Devido a sua diversidade, esse processo é chamado de expressão gênica promíscua (PGE). Os PTAs são apresentados para os timócitos diretamente via MHC II das próprias mTECs ou indiretamente pelas células dendríticas que adquiriram peptídeos de antígenos periféricos das mTECs. Timócitos em processo de diferenciação que reconhecem com alta avides esses antígenos próprios são removidos primariamente por deleção clonal apoptótica, embora alguns possam sobreviver através de destinos alternativos com propriedades regulatórias ao invés de propriedades auto reativas. Esse mecanismo está associado com a manutenção da homeostase imunológica prevenindo o ataque autoimune aos tecidos e órgãos periféricos (Adaptado de Mathis & Benoist, 2007).

1.2 Aire e o seu papel no controle transcricional da PGE

1.2.1 A descoberta de Aire

A descoberta de Aire como fator de transcrição se deu em virtude do estudo de uma doença autoimune sistêmica, a poliendocrinopatia autoimune tipo I (*Autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy –APECED*). Essa é uma doença monogênica autossômica recessiva. Apesar de rara na população é uma doença autoimune devastadora nos pacientes (NOTANGELO et al., 2006).

APECED é caracterizada por um conjunto de três características anormais: candidíase mucocutânea crônica, hipoparatiroidismo e insuficiência adrenal (BETTLERLE et al., 1998). Classicamente, um indivíduo deve apresentar duas dessas três anormalidades clínicas para ser diagnosticado com APECED, que frequentemente ocorre antes dos 10 anos de idade. Entretanto, muitos pacientes exibem rotineiramente um número variável de outras manifestações autoimunes, incluindo tireoidite, diabetes mellitus tipo I, insuficiência ovariana, alopecia e hepatite. Essas outras manifestações clínicas, diferem bastante de indivíduo para indivíduo, mesmo entre irmãos com exatamente a mesma lesão genética e exposições ambientais semelhantes (MATHIS & BENOIST, 2009).

Como dito, APECED é uma doença rara, porém há regiões cuja frequência é elevada como a Finlândia, a região da Sardenha na Itália e o Irã, com a frequência de 1:10.000 na população (BJORSES et al., 1996).

Um grande salto no conhecimento sobre APECED, ocorreu em 1997 quando dois grupos utilizaram a estratégia de clonagem posicional para localizar o gene envolvido nesta doença (AALTONEN et al., 1997; NAGAMINE et al., 1997). Em humanos esse gene foi localizado no cromossomo 21q22.3 (AALTONEN et al., 1994), já em camundongos no cromossomo 10 C1 (<http://source.stanford.edu/cgi-bin/source/sourceSearch>). A proteína codificada por esse gene foi denominada de AIRE, a qual na espécie humana compreende 545 resíduos de aminoácidos e apresenta vários motivos tipo “dedos de zinco” (*PHD-finger, Plant Homeodomain zinc finger*) e regiões ricas em prolina, características de um suposto fator de transcrição.

Até agora, mais de 60 mutações foram localizadas no gene Aire de diferentes pacientes com APECED. Essas mutações acarretam a produção de uma proteína AIRE

truncada e inativa (WANG et al., 1998; HEINO et al., 1999; BJORSES et al., 2000). Por outro lado, existem relatos de casos de pacientes com APECED que não apresentaram mutações em Aire, sugerindo que outros fatores possam também estar envolvidos no controle da APECED.

1.2.2 Mecanismo de ação de Aire

O papel funcional de Aire foi demonstrado com o uso de camundongos *knockout* (KO). Neste trabalho, pôde-se verificar que a falta de Aire está intimamente relacionada com o infiltrado de linfócitos em diversos órgãos e aumento no número de mTECs no timo, embora a expressão de MHC classe II e moléculas coestimuladores permaneceram normais. Também foi constatado significativo aumento no número de células T CD4⁺ e CD8⁺, CD44^{hi} CD62^{lo} em órgãos linfoides periféricos desses camundongos (ANDERSON et al., 2002).

Também evidenciaram que o timo é o principal local onde o Aire atua, regulando a expressão de diversos genes que codificam PTAs, que por sua vez, influenciam diretamente o processo de maturação das células T (ANDERSON et al., 2002).

Aire em camundongos e humanos codifica uma proteína com afinidade pelo DNA que funciona como se fosse um fator de transcrição, regulando positivamente a expressão de PTAs em mTECs, mas esse gene/proteína também pode atuar como um regulador negativo de outros genes (KYEWSKI et al., 2002; GALLEGOS & BEVAN, 2006; TIKOCINSKI et al., 2008; MATHIS & BENOIST, 2007, 2010; TANIGUSHI & ANDERSON, 2011).

Nos camundongos Aire-KO, diversos genes de PTA têm sua expressão diminuída ou mesmo anulada e, por isso, são referidos como genes Aire dependentes. Neste conjunto estão incluídos uma lista de 30 genes, entre eles os da insulina (Ins2 e Ins1), proteína salivar-1 (Spt1) e proteína ligante de ácido graxo (Fabp1). Outros genes de PTAs como proteína C reativa, descarboxilase de ácido glutâmico (Gad67) não são influenciados por Aire e são considerados Aire-independentes (ANDERSON et al., 2002).

As mTECs "imaturas" CD80⁻/MHC-II⁻ expressam somente um conjunto limitado de PTAs, enquanto que mTECs "maduras" CD80⁺/MHC-II⁺ apresentam maior

diversidade de PTAs incluindo aqueles genes cuja expressão é Aire-dependente (DERBINSKI et al., 2005).

A proteína AIRE é considerada como um fator de transcrição não clássico, que apesar atuar no núcleo celular e apresentar domínios de ligação com a molécula de DNA idênticos a fatores de transcrição clássicos, tem intrigado os pesquisadores devido a grande abrangência de sua ação controlando a expressão de centenas e mesmo de milhares de genes. Isto posto, fica difícil compreender seu mecanismo de ação como se fosse um fator de transcrição clássico que neste caso teria que se ligar a milhares de regiões promotoras (MATHIS & BENOIST, 2009).

Devido à complexidade acerca dos mecanismos moleculares envolvidos na atuação de Aire, vários trabalhos foram realizados em busca da compreensão desses mecanismos. AIRE é considerada uma proteína altamente colaborativa, sendo encontrada na forma de oligômeros e estruturas puntiformes, conhecidas como corpos nucleares que se encontram em associação com outras proteínas nucleares, conhecidas como parceiras de AIRE (HALONEM et al., 2004).

A primeira proteína parceira de AIRE identificada foi a CREB-binding protein (CBP), a qual está relacionada com a ativação da transcrição e com a acetilação de proteínas histônicas e não- histônicas, favorecendo a transcrição pela abertura da cromatina e consequente ação de fatores de transcrição. Nas mTECs, esta proteína parceira de AIRE está diretamente relacionada com a diferenciação de mTECs AIRE⁻ em mTECs AIRE⁺ (PITKANEN et al., 2000; PETERSON et al., 2008)

A segunda parceira de AIRE, é a DNA-PK uma serina/treonina kinase (*DNA-dependent Protein Kinase*) que tem a função de fosforilar proteínas implicadas na transcrição, em particular da RNA polimerase II (RNA Pol II) (JU et al., 2006). A terceira parceira de AIRE é a P-TEFB, elemento chave responsável pela promoção da fase de elongação da transcrição (BRES et al., 2008; WADE et al., 2008).

Finalmente Giraud et al (2012), mostrou que AIRE ativa a transcrição ectópica de PTAs através da liberação da RNA Pol II ligada e bloqueada nos sítios específicos T-boxes (TTATTA) e G-boxes (ATTGGTTA) que se encontram nas regiões promotoras dos PTAs. Dessa forma segundo a visão mais atual, AIRE não deve ser considerado um fator de transcrição clássico, mas sim um controlador transcricional que atua junto a RNA Pol II na regulação da PGE.

1.3 Biologia dos microRNAs e seu papel no controle pós-transcricional da PGE

1.3.1 Descoberta, conceitos e características dos microRNAs

Os microRNAs (miRNAs) maduros são pequenas moléculas de RNA simples fita compostas de 19 a 22 nucleotídeos. Essas moléculas são encontradas nas células eucarióticas e sua função está associada ao controle negativo e pós-transcricional da expressão gênica. O primeiro miRNA descrito na literatura foi o lin-4. Em 1993, Lee e colaboradores (LEE et al., 1993) ao estudarem o verme *Caenorhabditis elegans*, descobriram que o miRNA lin-4 estava localizado em uma região intrônica de um gene de função desconhecida, e que, ao invés de dar origem a uma proteína, codificavam dois pequenos RNAs. Um deles era composto por 22 e o outro por 61 nucleotídeos (nt). Além disso, descobriram que o RNA maior formava uma estrutura em forma de grampo e que esse RNA era precursor do primeiro com 22 nt. Observaram também que esses RNAs apresentavam complementaridade com vários sítios da região 3'UTR do mRNA do gene lin-4, regulando sua tradução e influenciando o desenvolvimento de *C.elegans*, promovendo a progressão do primeiro estágio larval para o segundo (Lee et al., 2003; Wightman et al., 1993).

Após um ano da descoberta do gene lin-4, foi descoberto o gene let-7 que codifica um RNA de 21 nt com sequência regulatória. O RNA let-7, atua no último estágio larval de *C.elegans* durante a mudança para o estágio adulto (REINHART et al., 2000). Esses RNAs ficaram conhecidos como pequenos RNAs “temporais”, devido a função comum associada ao processo de desenvolvimento desse verme (*stRNAs-small temporal RNAs*) (PASQUINELLI et al., 2000).

Um ano após a descoberta do RNA let-7, homólogos desses RNAs foram encontrados em células humanas além de outras espécies. Uma observação interessante é que essas moléculas também estão presentes em tipos celulares específicos. Dessa forma, o termo microRNA (miRNA) foi introduzido para se referir aos stRNAs e todos os outros RNAs com características semelhantes embora, com suas funções ainda desconhecidas (LAGOS-QUINTANA et al., 2001; LAU et al., 2001; LEE & AMBROS, 2001; BARTEL et al., 2004)

A partir de então a existência dos miRNAs foi relatada numa grande variedade de organismos eucarióticos, ou seja, desde algas unicelulares aos seres humanos,

sugerindo que esses RNAs representam um elemento regulatório essencial e antigo na evolução (BARTEL & CHEEN, 2004; ZHAO et al., 2007)

Atualmente, os miRNAs são definidos como pequenas moléculas de RNA não codificadoras com aproximadamente 21 nucleotídeos que estão envolvidos na regulação pós-transcricional de mRNAs. Tal regulação ocorre através da hibridação entre a região *seed* do miRNA (que corresponde a uma sequência localizada na região 5' do miRNA, que compreende os nucleotídeos da posição 2-7) e o mRNA alvo na sua região 3'UTR. Isso pode acarretar na clivagem do mRNA (aqui considerado alvo), sua deadenilação ou ainda a repressão da tradução do mesmo (BARTEL, 2004; LEWIS et al., 2003; WINTER et al., 2009).

Devido a curta sequência, a chance de pareamento é grande e, portanto, um único miRNA pode regular centenas de mRNAs alvos.

Vários miRNAs demonstraram desempenhar importantes papéis no desenvolvimento, homeostase celular e também em condições patológicas. Várias doenças autoimunes, câncer e inflamação já foram associadas com expressão aberrante de miRNAs. No caso de doenças autoimunes e inflamação o descontrole da expressão de miRNAs provavelmente conduz a hiperativação de células imunes efectoras (CERIBELLI et al., 2012)

Por esses motivos, os miRNAs são hoje considerados reguladores fundamentais no controle da expressão gênica, apresentando funções cruciais nas células dos mais variados organismos. Grande parte da pesquisa atual em biologia molecular e biomedicina está focada nos miRNAs.

1.3.2 Biogênese dos miRNAs

A biogênese dos miRNAs é um processo complexo, que inicia no núcleo, o qual concentra os precursores pri e pre-miRNA mas seu término ocorre no citoplasma, onde se concentra a forma madura dos mesmos (LEE et al., 2002).

Dois mecanismos distintos para biogênese dos miRNAs foram descritos: A via canônica e a via não-canônica (LEE et al., 2002; FILIPOWICZ et al., 2008).

A via canônica envolve primariamente a participação da RNA polimerase II, a qual transcreve genes de miRNAs, gerando transcritos primários denominados de pri-miRNA que, assim como mRNA, possui uma longa sequência de nucleotídeos com sua porção 5' ligada a 7-metil guanosina e cauda poli-A na sua região 3' (LEE et al., 2002).

Como característica singular, o precursor primário de miRNA já abriga uma sequência que se encontra pareada entre si, formando uma estrutura em forma de grampo (*hairpin*). Os pri-miRNAs, são primeiramente clivados no núcleo por um complexo que envolve a Drosha, esta enzima possui como cofator o DGCR8 (*DiGeorge syndrome critical region 8*), a qual reconhece ssRNA (*Single strain RNA*) e orienta a clivagem realizada pela Drosha a ~11 pares de base da junção dsRNA-ssRNA, produzindo uma sequência de aproximadamente 70 nt de comprimento (HAN et al., 2006; ZENG et al., 2005).

Na via não canônica, os miRNAs são denominados de *mirtrons*. Os mesmos estão inseridos em íntrons de mRNA, também apresentam estruturas na forma de grampo e são processados em pre-miRNA por meio de *splicing* (RUBY et al., 2007; OKAMURA et al., 2007; BEREZILOV et al., 2007).

Esses pre-miRNAs são exportados para o citoplasma por meio da exportina 5, e lá é processado pela ribonuclease Dicer. Nessa etapa, o pre-miRNA perde a sua estrutura em forma de grampo, dando origem a uma sequência madura de miRNA cujo comprimento é de ~22nt (LEE et al., 2002). A sequência madura do miRNA é composta de uma fita guia e uma fita de passagem (IORIO et al., 2012). Os miRNAs são processados, com o auxílio de TRBP (*trans-activator RNA binding protein*), por riboproteínas da família Argonata, a qual seleciona uma fita simples para sua retenção em complexos regulatórios maduros, denominados RISC (*RNA-induced silencing complex*) (IORIO et al., 2012). Tanto a fita “guia” quanto a fita de passagem possuem junto ao RISC a atividade repressora da tradução (BHAYANI et al., 2012) (Figura 3).

1.3.3 O Papel dos miRNAs no timo

Estudos recentes revelam que os miRNAs estão intimamente relacionados com a integridade e funcionalidade do microambiente tímico, a via de miRNA mostra-se indispensável para o desenvolvimento de células T (BAUMJOHANN & ANSEL, 2013). A falta de Dicer compromete a sobrevivência de células T $\alpha\beta$ e causa a produção aberrante de citocinas (XIAO et al., 2008; COBB et al., 2005).

Células epiteliais tímicas de camundongos *knockout* condicionais de Dicer, apresentam-se com um elevado índice de apoptose, proliferação e formação de células imaturas, acarretando degeneração da arquitetura tecidual e involução precoce do timo. Esses camundongos *knockout* de Dicer, também apresentam alterações nos processos de

seleção tímica, resultando na redução no número de células T encontradas na periferia e redução no número de mTECs que expressam o gene Autoimmune regulator (Aire), reduzindo a eficiência da seleção negativa e aumento da susceptibilidade ao desenvolvimento de artrite reumatóide (ZUKLYS et al., 2012; PAPADOPOULOU et al., 2012).

Figura 3 Biogênese e ação dos miRNAs em células animais. Na via da biogênese o pri-miRNA é processado pela DGCR8/Drosha gerando o pré-miRNA. A exportina 5 transporta o pré-miRNA do núcleo para o citoplasma que é processado por Dicer gerando o duplex. Somente a fita madura de miRNA se mantém no complexo RISC juntamente com a Dicer e a proteína Ago. Finalmente o anelamento entre o miRNA e seu mRNA alvo resulta na diminuição da expressão ou na clivagem deste último (Adaptado de DAI & AHMED, 2011).

Liston et al (2008), mostrou que a deleção condicional de Dicer em células Treg, que são essenciais no controle da autoimunidade, suprimindo a resposta inflamatória, resulta em drástica redução da funcionalidade dessas células e acarreta o desenvolvimento da síndrome linfoproliferativa autoimune.

Como um exemplo, o miR-181, tem sido relacionado com o o desenvolvimento de linfócitos B e T, tendo papel regulatório na maturação de células T, regulando a intensidade de sinalização do receptor de células T (TCR), durante a seleção positiva e negativa no timo (LI et al., 2007).

Ucar et al (2013), demonstrou através de *knockout* condicional de Dicer, que a ausência específica de miRNAs em células TEC, resulta em uma progressiva redução da expressão de Aire e de PGE, afetando tanto a expressão de genes Aire dependentes como Aire independentes.

Nosso grupo de pesquisa também contribuiu nessa área demonstrando pela primeira vez que Aire controla a expressão de miRNAs em células tímicas epiteliais medulares (mTECs) de camundongos (MACEDO et al., 2013).

Em conjunto, esses resultados revelam a mútua interdependência de miRNA e Aire.

Embora já se tenha o conhecimento de que miRNAs participam nos processos de integridade e funcionalidade do timo, e que o grau de maturação de TECs está diretamente relacionado com a expressão de desses reguladores pós-transcricionais, ainda existem muitas questões importantes que devem ser respondidas para o melhor entendimento sobre a relação existente entre Aire e miRNAs.

Assim a nossa visão é estudar os mecanismos regulatórios envolvidos no controle da PGE, tanto a nível transcricional quanto a nível pós-transcricional, procurando estabelecer uma relação entre miRNAs e mRNAs (miRNA-mRNA), diferencialmente expressos sob a influência de Aire.

1.4 Diabetes mellitus do tipo 1 e o timo

1.4.1 O Diabetis mellitus tipo 1 (DM1)

No sistema imune a ausência ou o desbalanço da tolerância imunológica, acarreta o desenvolvimento de doenças autoimunes crônicas, como o diabetes mellitus do tipo 1 (DM1) (ZUCHELLI et al., 2005). O DM1 é uma doença metabólica

multissistêmica, multifatorial e multigênica, que acomete principalmente crianças e adolescentes (ADA, 2011).

Desde a descoberta em 1965 de infiltrados de células mononucleares nas ilhotas de *Langerhans* de pacientes diabéticos (GEPTS et al., 1965), estudos têm demonstrado que o DM1 resulta de um processo autoimune altamente seletivo, que gera primeiramente uma inflamação (insulite) envolvendo células dendríticas, macrófagos, células T CD4⁺ e CD8⁺ e células B e por fim a destruição das células β do pâncreas que secretam a insulina. As células β funcionam como “termostatos” distintos que agem como sensores de glicose para liberar insulina, a fim de manter sua homeostase no sangue (BLUESTONE et al., 2010).

A carência na produção de insulina acarreta perda de controle dos níveis de glicose no sangue, exigindo a administração exógena do hormônio para sobrevivência do indivíduo (POLYCHRONAKOS & LI, 2011). Mesmo com os tratamentos para reposição de insulina, complicações vasculares, neurológicas e visuais podem se desenvolver a longo prazo, levando a perda na qualidade de vida e incapacidade significativa (BLUESTONE et al., 2010; PLANAS et al., 2010).

Além da quebra da tolerância central, inúmeros processos celulares e moleculares têm sido propostos como importantes para o desenvolvimento do DM1, expressão alterada do complexo principal de histocompatibilidade (MHC); mimetismo molecular (ROEP et al., 2006); proliferação homeostática exagerada de células T autoreativas (KING et al., 2004); migração deletéria de células dendríticas para os linfonodos pancreáticos promovendo a ativação de células T diabetogênicas (TURLEY et al., 2003).

Tanto em humanos como em camundongos, um enorme número de regiões gênicas é associado ao DM1, mas, apenas alguns genes tiveram seus papéis coligados à patogenia do DM1, com a maior contribuição genética atribuída a alelos do MHC no homem no cromossomo 6p21. Cerca de 20 regiões não-MHC também têm sido associadas ao risco da doença, dentre os principais estão os genes da insulina, o PTPN22 e CTLA4 (DURINOVIC-BELLÓ et al., 2010; WALTER et al., 2003; POCIOT et al., 2010; QU et al., 2009a; QU et al., 2009b).

Em relação ao diagnóstico do DM1, além das características clínicas, marcadores da destruição autoimune das células β , como autoanticorpos têm sido muito utilizados no diagnóstico dessa doença (PATEL & MACEROLLO, 2010).

1.4.2 Autoantígenos relacionados com o DM1

As células β pancreáticas, são as únicas células do organismo que sintetizam e secretam insulina, por isso a insulina foi por muito tempo considerada como sendo o principal alvo do DM1. Esse fato se deve a descoberta de autoanticorpos contra esse hormônio e em seguida, dois estudos independentes revelaram que a insulina e o seu epítopo dominante Ins B9-23 desempenham um papel primordial no desenvolvimento dessa doença, tanto em camundongos quanto em no homem (NAKAYAMA et al., 2005; KENT et al., 2005; BREZAR et al., 2011).

Além de autoanticorpos contra a insulina, autoanticorpos contra a descarboxilase do ácido glutâmico 1 e 2 (GAD1 e GAD2), células das ilhotas pancreáticas (ICA) e a tirosina fosfatase 2 (IA-2A) são os mais conhecidos e detectados (HALLER et al., 2005). Recentemente foram identificados anticorpos contra o transportador de zinco 8 (ZnT8A) (WENZLAU et al., 2007).

Os autoanticorpos anti-insulina, anti-Gad2 e anti-IA-2A, são os marcadores mais confiáveis da resposta autoimune contra as células β . No soro de mais de 90% de crianças na fase inicial do desenvolvimento de DM1 existem autoanticorpos contra um ou mais desses antígenos. Esses autoanticorpos também tem um valor preditivo, uma vez que são detectados vários anos antes dos sinais clínicos de deficiência de insulina, que aparecem quando cerca de 80% da massa de células β são destruídas. A predição de DM1 é aumentada quando a detecção de autoanticorpos está associada com a presença de alelos do complexo do MHC de classe II e classe I (CONCANNON et al., 2009; BLUESTONE et al., 2010; GEENEN, 2012).

No entanto, o significado patogênico real do DM1, se deve aos reais efetores da destruição autoimune das células β , as células T $CD4^+$ e $CD8^+$ autoreativas (ROEP, 2003). Considerando o fato de que todos os membros da família do gene da insulina são expressos no timo (PANSKY et al., 1965; GEENEN et al., 1993; JOLICOEUR et al., 1994), bem como o IA-2 (LIEBERMAN & DILORENZO, 2003), e o GAD1 (FORNARI, et al., 2010) uma questão lógica a ser investigada é a educação dos precursores de células T, no que se refere à capacidade de reconhecer e tolerar antígenos relacionados ao DM1 durante o seu processo de maturação que ocorre no timo.

1.4.3 Disfunção tímica como um evento primário no DM1

O timo é o principal sítio de desenvolvimento das células T e é considerado de fundamental importância para a tolerância do sistema imune ao próprio. Estudos têm demonstrado que a susceptibilidade ao DM1 está correlacionada com os níveis de transcrição do gene *Ins2* no timo murino (CHENTOUFI & POLYCHONAKOS, 2002). O papel da insulina tímica mediando a autotolerância aos autoantígenos específicos de células β , foi finalmente demonstrado pelo rápido desenvolvimento de DM1 após a deleção dos genes *Ins1* e *Ins2* no timo (FAN et al., 2009)

Essas evidências revelaram que as células T podem ser educadas para reconhecer e tolerar membros da família do gene insulina, durante a sua maturação no timo. Dessa forma perturbações na função tímica podem levar à perda de tolerância e um defeito nesse processo pode ser um fator potente no desenvolvimento de DM1.

Em 1973, Burnet levantou a hipótese que o aparecimento de células T autoreativas na periferia é um fator primordial para o desenvolvimento de doenças autoimunes. Mesmo antes da disponibilidade dos camundongos transgênicos, alguns estudos já forneciam argumentos experimentais sólidos que suportavam essa hipótese, dentre eles, um estudo revelou que a timectomia neonatal previne o aparecimento de DM1 em um animal modelo, o rato bio-breeding (BB) (like et al., 1982). O benefício da timectomia, agora é visto como a remoção de um órgão defeituoso, responsável pela liberação contínua e enriquecimento periférico de células T autoreativas (GEENEN, 2012).

Por outro lado, a ocorrência de DM1 foi prevenida em ratos BB após o transplante de timos obtidos de rato bio-breeding resistente ao DM1 (BBDR) (GEORGIOU & BELLGRAU, 1989). O transplante de timo de camundongos NOD (*Non obese diabetic*) que desenvolvem DM1 espontaneamente em linhagens de camundongos resistentes ao DM1 induziu o desenvolvimento da doença nos camundongos receptores (GEORGIOU & MANDEL, 1995).

Estudos também têm demonstrado que o processo de tolerância central e apoptose de células T autoreativas são defeituosos em timos de camundongos NOD (KISHIMOTO & SPRENT, 2001; ZUCHELLI et al., 2005). Além disso, foi demonstrado que durante a transição do estado pré-autoimune (pré-diabético) para autoimune (diabéticos), os camundongos NOD apresentam alteração da PGE no

estroma tímico envolvendo a expressão de PTAs relacionados com DM1 durante o desenvolvimento dessa doença (FORNARI, et al., 2010).

Todas essas evidências revelam que a disfunção tímica acarreta a diminuição da expressão/apresentação de antígenos relacionados ao DM1, promovendo um contínuo enriquecimento do repertório de células T autoreativas na periferia, assim como a diminuição da seleção de células específicas nTreg. É importante ressaltar que a disfunção tímica é uma condição necessária, mas não suficiente para que ocorra o desenvolvimento do DM1. Muitos autores destacam a importância de fatores ambientais como a dieta (KNIP et al., 2010), fornecimento de vitamina D (MATHIEU et al., 2005) ou até infecções virais (OLDSTONE et al., 1991; VON-HERRATH, 2009) (Figura 4).

1.4.4 Utilização de camundongos *Nonobese Diabetic* (NOD) como modelo de estudo do DM1

A linhagem de camundongo *nonobese diabetic* (NOD) é um importante modelo para o estudo da emergência de DM1. Isso se deve ao fato de que as características do desenvolvimento do diabetes autoimune nesse camundongo são mais próximas ao DM1 humano. Essa linhagem é isogênica e foi desenvolvida no Laboratório Shionogi (Japão), durante um programa de cruzamento endogâmico para estabelecer uma sublinhagem susceptível à catarata (*Cataract and small eyes – CTS*) a partir de camundongos *outbred* JCl:ICR, uma colônia derivada de camundongos *Swiss* (TANIGUCHI et al., 2007; MAKINO et al., 1980).

Durante a seleção da linhagem CTS, foi observado o primeiro caso de diabetes dependente de insulina (*Insulin-dependent diabetes – Idd*) em uma fêmea da vigésima geração de cruzamentos, sem susceptibilidade à catarata. Tal sublinhagem foi submetida a uma série de endocruzamentos até que camundongos desenvolvendo a doença espontaneamente foram estabelecidos – linhagem *nonobese diabetic* (NOD) (TANIGUCHI et al., 2007; LEITER et al., 1987).

Os camundongos NOD representam um excelente modelo de DM1, assim como no DM1 humano, os camundongos NOD diabéticos apresentam polidipsia, poliúria, perda de peso, glicosúria, hiperglicemia e deficiência de insulina (KIKUTANI & MAKINO, 1992).

A incidência do DM1 em NOD é de 60-80 % em fêmeas e de 20-30% em machos. A incidência da doença aumenta quando esse camundongo é mantido em

ambientes livres de patógenos específicos (*Specific pathogen-free – SPF*) e decresce em condições normais de manutenção (SINGH & RABINOVITCH, 1993; BOWMAN et al., 1994). O início do DM1 ocorre entre 12 a 14 semanas de idade em fêmeas e um pouco depois em machos. Estudos histológicos mostram que os infiltrados celulares são notados nas ilhotas por volta de 4 semanas de idade, quando os animais começam a demonstrar a peri-insulite (ANDERSON & BLUESTONE, 2005; KODOMA et al., 2008).

Vários mecanismos patogênicos envolvidos no DM1 foram mais bem compreendidos devido à utilização dessa linhagem e suas variações, como por exemplo, a importância das células dendríticas e dos macrófagos no início da doença, e a contribuição dos linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ na destruição das células β produtoras de insulina, sendo observado uma infiltração gradual de tais células no pâncreas, com surgimento de peri-insulite e progressão para insulite severa, culminando no diabetes clínico (LEHUEN et al., 2010; DELOVITCH & SINGH, 1997).

Além disso, assim como em humanos, os camundongos NOD, apresentam linfócitos T autoreativos à insulina, GAD2, IA-2, entre outros, exibindo também anticorpos contra tais proteínas (ANDERSON & BLUESTONE, 2005).

Dessa forma, o camundongo NOD representa um excelente modelo de estudo de doença autoimune, sendo muito úteis para melhor entendermos os mecanismos envolvidos no processo de tolerância central. Assim, a nossa visão é compararmos perfis de expressão gênica transcricional de mTECs camundongos NOD com mTECs camundongos BALB/c (linhagem não autoimune) para melhor compreendermos o controle genético molecular que ocorre no timo durante a emergência da autoimunidade agressiva.

Figura 4 Fisiologia tímica e disfunção tímica como um evento primário no desenvolvimento de DM1. Ao longo da vida, o timo seleciona células T efectoras (Teff) que são tolerantes aos antígenos próprios, e responsivos aos antígenos não-próprios assim como as células nTregs autoespecíficas. Sobre o controle de Aire as células mTECs transcrevem centenas de PTAs, incluindo autoantígenos relacionados com DM1. Assim, como observado em animais modelo de DM1, a ausência ou diminuição da apresentação de antígenos tímicos relacionados com o DM1 conduz a um enriquecimento contínuo de células T autoreativas na periferia que são direcionadas à epítomos relacionados ao DM1, enquanto a seleção de células nTreg epecíficas é severamente prejudicada. Essa disfunção tímica contribui para que haja a quebra da tolerância central. Fatores genéticos e ambientais estão envolvidos no estabelecimento de uma ponte molecular entre células efectoras autoreativas anti-células β e autoantígenos das mesmas. Uma vez que essa ponte é formada é desencadeada uma resposta autoimune que leva a progressiva destruição em massa das células β pancreáticas (Adaptado de GEENEN, 2012).

1.5 Análise de transcriptomas pela tecnologia de *microarrays*

Em analogia ao termo genoma que se refere ao conjunto de genes de uma determinada espécie, criou-se o termo transcriptoma que compreende o conjunto completo de RNAs expressos em uma célula ou tecido em uma dada situação, incluindo transcritos alternativos e não-codificantes, cujas alterações refletem as condições fisiológicas ou patológicas em que o organismo se encontra (RUAN et al., 2004). Mesmo com a inclusão dos miRNAs no transcriptoma, criou-se o termo miRNoma seguindo a mesma analogia.

O transcriptoma é variável entre os diferentes tipos de células, tecidos e órgãos de um determinado organismo, sendo que as próprias condições fisiológicas normais, como as diferentes fases do ciclo celular, ou patológicas, como por exemplo, infecções ou neoplasias, influenciam no chamado perfil do transcriptoma (PASSOS et al., 2000)

A tecnologia de *microarrays* permite a análise simultânea de milhares de transcritos em um único experimento, viabilizando a comparação de diferentes dados de expressão gênica entre duas amostras de RNA, como por exemplo, de uma célula controle e de uma célula que teve um determinado gene silenciado. Os *microarrays* se baseiam na ligação por complementaridade de bases de RNAs fita simples aos fragmentos de DNA, RNA ou oligonucleotídeos depositados em uma lâmina, (BRAZMA & VILO, 2001).

Através do conhecimento do perfil de expressão gênica, é possível responder questões importantes, tais como quais genes estão envolvidos em uma determinada condição específica. Dessa forma, a tecnologia de *microarrays* é uma estratégia relevante que permite identificar genes associados e modulados em determinados processos biológicos.

Hipótese

2. HIPÓTESE DO TRABALHO

Considerando que Aire desempenha um papel importante como controlador transcricional na PGE e que esse processo está associado com a manutenção da homeostase imunológica, formulamos **a primeira hipótese** de que variações na expressão desse gene no timo conduz a desregulação da expressão de mRNAs que codificam PTAs e também de miRNAs.

Considerando a seleção negativa dos timócitos autoreativos que ocorre na medula tímica como um processo importante para prevenção do desenvolvimento de ataques autoimunes a antígenos próprios, formulamos **a segunda hipótese** de que alterações na expressão de Aire, e/ou alterações na expressão de genes de PTAs em mTECs podem contribuir com a suscetibilidade ao diabetes mellitus tipo 1.

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

- 1) Avaliar os perfis de expressão de mRNAs e de miRNAs em mTECs de camundongos BALB/c.
- 2) Avaliar o papel do gene Aire nas interações entre miRNAs e os seus respectivos mRNAs alvos.
- 2) Comparar os perfis de expressão transcricional de Aire e da PGE em mTECs de camundongos NOD e de camundongos BALB/c.

3.2 Objetivos Específicos

- Silenciar o gene Aire por meio de eletrotransfecção de siRNA anti-Aire *in vivo* no timo de camundongos BALB/c.
- Avaliar o silenciamento do transcrito do gene Aire em células mTEC por meio de qRT-PCR.
- Avaliar a expressão da proteína Aire após o silenciamento de Aire em células mTEC por meio de imunofluorescência.
- Avaliar os perfis de expressão de mRNAs que codificam PTAs (transcriptoma) modulados após o silenciamento do gene Aire *in vivo* no timo, focando aqueles Aire dependentes fazendo uso da tecnologia de *microarrays*.
- Avaliar os perfis de expressão de miRNAs (miRnoma) modulados após o silenciamento do gene Aire *in vivo* no timo, fazendo do uso da tecnologia de *microarrays*.
- Identificar sítios T-boxes e G-boxes de RNA Polimerase II em genes de

miRNAs modulados após o silenciamento de Aire, utilizando o programa *Regulatory Sequence Analysis Tools (RSAT)*.

- Reconstruir redes de interação entre miRNAs e mRNAs alvos expressos em mTECs Aire silenciadas ou não, tentando identificar o controle pós-transcricional exercido pelos miRNAs na PGE.
- Avaliar os perfis de expressão de mRNAs que codificam PTAs em mTECs de camundongos BALB/c e NOD, focando em autoantígenos relacionados com DM1 fazendo uso da tecnologia de *microarrays*.
- Avaliar os níveis de expressão transcricionais do gene Aire em mTECs de camundongos BALB/c e NOD por meio de qRT-PCR.
- Avaliar e comparar a expressão da proteína Aire no timo de camundongos BALB/c e NOD por meio de imunofluorescência.

Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Linhagem de camundongos BALB/c e *Non obese diabetic* (NOD)

Fêmeas de camundongos da linhagem BALB/c com 5-6 semanas de idade foram adquiridas no biotério de camundongos isogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Enquanto fêmeas de camundongos da linhagem *non obese diabetic* (NOD) com 2-3 semanas ou com 5-6 semanas de idade, foram adquiridos no biotério de camundongos especiais dessa mesma Faculdade. Os animais foram transferidos para o Laboratório de Imunogenética Molecular no Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto em mini-isoladores Alesco com entrada de ar filtrado (filtro de 0,45 μ), temperatura constante de $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, ciclo de iluminação de 12 horas, água e ração *ad libitum*.

Para os camundongos NOD, o suplemento polivitamínico Glicopan Pet (Vetnil, São Paulo, Brasil) previamente esterilizado por filtração (filtro de 0,45 μ) foi fornecido juntamente com a água para compensar as perdas nutricionais ocorridas durante a autoclavagem da ração.

O presente projeto foi realizado mediante aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal da FMRP-USP (Aprovação no. 117/2008).

4.2 Avaliação laboratorial do diabetes autoimune nos camundongos NOD

Os animais foram avaliados por determinações de glicemia utilizando-se o aparelho *Accu Check - Active Kit* (Roche Diagnóstica Brasil Ltda, São Paulo, Brasil). A leitura do valor foi realizada após a aplicação de uma gota de sangue periférico em papel reativo que era inserido no leitor óptico do aparelho. O resultado era expresso em concentração de glicose no sangue em mg/dL.

Os animais cujos valores de glicemia excederam 250 mg/dL foram considerados diabéticos. Fêmeas com 2-3 semanas e 5-6 semanas de idade foram consideradas pré-diabéticas, uma vez que seu índice glicêmico era inferior a 250 mg/dL.

4.3 Definição de controle e teste

Para os experimentos de eletroporação, foram considerados controle o grupo de camundongos BALB/c que foram eletrotransfectados com tampão PBS 1X, e como teste o grupo de camundongos que foram eletrotransfectados com siRNA-anti Aire.

Para os experimentos de comparação entre os camundongos BALB/c e NOD, consideramos como controle o grupo de camundongos BALB/c (não autoimune) e como teste o grupo de camundongos NOD (autoimune e suscetível a desenvolver DM1).

4.4 Processo de eletroporação no timo *in vivo*

O processo de eletroporação *in vivo* no timo (também conhecido como eletrotransfecção) foi realizado com base no protocolo previamente publicado por (Irla et al. 2008), mas nesta Tese, ao invés de vetor plasmidial, nós utilizamos siRNA.

Fêmeas BALB/c com 5-6 semanas de idade foram anestesiadas por injeção intraperitoneal de solução de ketamina (100mg/kg do peso corporal) com xilazina (10mg/kg do peso corporal). Uma vez anestesiado, o animal foi disposto de decúbito ventral para que o processo de eletroporação fosse iniciado.

O eletrôdo correspondente ao cátodo foi utilizado para estabelecer contato com a pele na pata oposta ao local da injeção. Em seguida uma agulha de 0,33 mm de diâmetro acoplada a uma seringa de 1 ml foi conectada ao eletrôdo do ânodo. A agulha foi então transpassada no couro do animal entre a primeira e a segunda costela (região do torax) em um ângulo de 45° graus a partir do eixo longitudinal, bem onde o timo é localizado. Observamos que inserindo apenas 5 mm da agulha já é necessário e suficiente para atingir o timo sem afetar os órgãos vitais próximos como coração e pulmão. Então 5µl de tampão PBS 1X estéril ou PBS 1X estéril contendo siRNA a ser transfectado (5µl de de PBS contendo 5mM de siRNA anti-Aire ou 5mM de siRNA irrelevante) foi injetado lentamente em cada lóbulo tímico (5 mM de RNA por lóbulo tímico). Em seguida aplicamos uma corrente elétrica de 5 pulsos de 300 V (duração de 20 ms cada pulso, ou seja, 5 x 20 ms de 300 V), utilizando um eletroporador (BTX[®] SQUARE ELECTROPORATOR, HARVARD APPARATUS, USA) (Figura 5).

Os animais foram sacrificados em câmara de CO₂ para remoção cirúrgica do timo 24, 48 ou 72 horas após as eletrotransfecções.

Figura 5 Demonstração do processo de eletroporação no timo *in vivo*

4.5 Análises por microscopia confocal

Para monitorar a eficiência de eletrotransfecção, 5 mM de siRNA irrelevante marcado com Cy3 diluído em 5 µl de tampão PBS ou apenas tampão PBS foi injetado em cada lóbulo tímico, e os camundongos foram submetidos a eletroporação (n = 3 animais por grupo). Os animais foram sacrificados em câmara de CO₂ 1 hora após a eletrotransfecção, os timos foram removidos e imersos em uma solução de PBS1X contendo o corante DAPI.

Em seguida os timos foram imersos em Freezing Medium (TBSTM Triangle Biomedical Sciences), congelados e submetidos a cortes de 20, 30 ou 40 µm utilizando um criostato (Microtome Cryostat HM 505E) para confecção das lâminas histológicas. As lâminas histológicas foram analisadas com auxílio de um *Laser Scanning Spectral Confocal Microscope* (Leica TCS-SP2).

4.6 Avaliação histológica da estrutura tímica

Para as análises histológicas do tecido tímico, timos controle ou timos eletrotransfectados (48 horas após a eletrotransfecção) ou timos de camundongos BALB/c e NOD com 5-6 semanas de idade (n = 3 animais por grupo), foram removidos após o sacrifício e embebidos em Tissue-Tek[®] (Sakura Finetek, USA, Inc.). Em seguida os timos foram seccionados em cortes de 5 µm.

As lâminas histológicas foram coradas com hematoxilina-eosina e 10 imagens de campos histológicos de cada timo foram selecionadas aleatoriamente. As imagens foram capturadas utilizando um microcópio Leica DM 6000 M em conjunto com o microscópio Leica AF6000 (Leica Microsystems).

4.7 Imunolocalização da proteína AIRE no estroma tímico

Para as análises de imunofluorescência da proteína AIRE no estroma tímico, timos controle ou timos Aire-silenciados foram removidos 48 horas após a electrotransfecção; ou timos de camundongos BALB/c ou NOD com 5-6 semanas de idade, foram removidos e imediatamente seccionados em fragmentos de 5 µm de espessura, mergulhados em isopentano gelado, congelados em nitrogênio líquido e depois mantidos a - 80° C.

As imunomarcações foram realizadas utilizando o anticorpo primário para AIRE (anticorpo IgG policlonal de cabra anti-AIRE de camundongo, na diluição de 1:100) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) e o anticorpo secundário de coelho anti-IgG de cabra acoplado com fluoresceína (Vector Laboratories), na diluição de 1:200. A omissão de anticorpo primário serviu como controle negativo. Os núcleos celulares foram corados com DAPI.

Para as análises de imunofluorescência, 10 imagens de cada timo foram aleatoriamente selecionadas (aumento de 40x), possibilitando a visualização de aproximadamente 70% de medula e 30% de córtex tímico. Essas imagens foram utilizadas para a determinação do número de células Aire⁺ por campo. As imagens foram capturadas utilizando um microcópio Leica DM 6000 M em conjunto com o microscópio Leica AF6000 (Leica Microsystems). Os dados foram analisados utilizando o software estatístico GraphPad Prisma.

4.8 Separação de células mTEC a partir de estroma tímico

Para separação das células mTEC a partir de estroma de timos de camundongos BALB/c submetidos aos procedimentos de eletrotransfecção ou de NOD, aplicamos o método descrito por Gray et al (2002) com modificações. Resumidamente, processamos três timos em cada separação, os órgãos recém-removidos dos animais foram

seccionados com tesoura cirúrgica em pequenas porções e colocados em 3 ml de meio de cultura RPMI 1640 numa placa de petri estéril.

Os timócitos foram removidos por agitação do meio com auxílio de pipetagens suaves e posterior passagem por uma peneira de náilon de 10 μ m. Os fragmentos de estroma tímico foram então incubados a 37°C por 10 minutos em 2 x 500 μ l de meio RPMI 1640 contendo 0,125% colagenase tipo II e 0,1% DNase I (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e depois em 2 x 500 μ l de meio RPMI 1640 contendo 0,125% colagenase/dispase e 0,1% DNase I.

Para separação das mTECs utilizamos uma versão modificada do protocolo descrito por Kont et al. (2008). Resumidamente, as células estromais foram ressuspensas a uma densidade de 1×10^8 / 98 μ l RPMI 1640, incubadas com 2 μ l de anticorpo rat anti-mouse IgG2a BP-1 (e-Bioscience, San Diego, CA, USA) por 15 minutos e misturados com anti-rat IgG *magnetic micro beads* (MACs Miltenyi Biotec Inc., Auburn, CA, USA) para remover as células epiteliais tímicas corticais CD45⁻ (cTECs). A fração contendo mTECs foi obtida por seleção positiva usando anticorpo rat anti-mouse EpcamBP-1(CD326, EGP40). Após a incubação com este anticorpo, as células foram misturadas com anti-rat IgG *magnetic micro beads* e separadas em colunas com coluna magnética (MACs MiltenyiBiotec).

As células foram marcadas com um anticorpo anti-CD80 marcado com ficoeritrina (PE) e um anticorpo anti-MHC classe II marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) e analisados usando um citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences). A pureza das mTECs CD80⁺ foi $\geq 68\%$, e $\geq 27\%$ dessas células eram CD80⁺ MHC classe II⁺. Essas células foram então utilizadas na extração de RNA total.

4.9 Extração de RNA total e avaliação de sua integridade

Para a extração de RNA total do estroma tímico ou das células mTEC utilizamos o kit mirVana PARIS ® (Ambion, USA) seguindo as instruções do fabricante e que permite a separação simultânea de RNAs de alto peso molecular (≥ 200 nt incluindo os RNAs mensageiros) e de RNAs de baixo peso molecular (≤ 200 nt incluindo os microRNAs de ~ 23 nt).

O RNA foi suspenso em água tratada com DEPC (Sigma-Aldrich Brasil Ltda, São Paulo, Brasil) e armazenado em freezer a -80°C. A quantificação e avaliação da pureza das preparações foram por espectrofotometria UV num espectrofotômetro

NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Products, Wilmington, DE, USA). Foram utilizadas apenas preparações livres de fenol ($A_{260}/A_{230} \sim 1,8$) e de proteínas ($A_{260}/A_{280} \sim 1,8-2,0$).

A integridade das amostras foi avaliada por meio de eletroforese microfluídica utilizando-se o chip *RNA 6000 Nano* do aparelho *Agilent 2100 Bioanalyzer* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) seguindo as instruções do fabricante. Este sistema calcula o índice (*RNA Integrity Number* – *RIN*) com escala de 0 a 10 baseado na qualidade da preparação de RNA. Só foram incluídas neste estudo as amostras com índice *RIN* superior ou igual a 8,0. Segue abaixo um exemplo de uma corrida eletroforética típica (eletroforese microfluídica) de RNA total de células mTEC de camundongo (Figura 6a) e da densitometria desta eletroforese microfluídica (Figura 6b).

Figura 6 Eletroforese microfluídica (A) ou (B) densitometria das amostras de RNA total isoladas de mTECs de timos de camundongos BALB/c ou NOD. A figura A, mostra as frações de rRNA 28 S, 18 S e 4-5 S, L= RNA ladder. A figura B, mostra as frações de rRNA 28 S, 18 S e 4-5 S. *RNA integrity number* (RIN) de BALB/c = 10 e de NOD = 9,8.

4.10 PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR)

As reações de PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR), foram utilizadas para avaliação dos níveis de transcrição de Aire em células mTEC controle de BALB/c, mTEC Aire silenciadas, mTEC de NOD e mTEC de BALB/c. Além de Aire os níveis

transcricionais dos seguintes genes: Ins1, Ins2, Gad1, Gad2 e Col2a1 também foram avaliados por meio de qRT-PCR.

As reações de qRT-PCR foram preparadas utilizando o reagente *SYBR GREEN* (Applied Biosystems) em placas de 48 poços com ciclagem padrão de aproximadamente 2 horas. O aparelho utilizado foi Applied Biosystems Stepone One juntamente com o software de leitura de mesmo nome (Stepone versão 2.1 Applied Biosystems).

O processo constituiu-se de duas etapas, a primeira delas consiste na avaliação da especificidade dos produtos de PCR por meio da análise de uma curva de dissociação. Para isso foi realizada uma quantificação absoluta de cada par de *primers*, inclusive do gene constitutivo, utilizando diluições seriadas 1:10 a 1:1000 de cDNA para calcular a eficiência da reação e, conseqüentemente, dos *primers*. A reação consiste de amplificação seguida de dissociação.

A segunda etapa consiste da reação de PCR quantitativa propriamente dita. Para tal, foi realizada a quantificação relativa para avaliar a expressão gênica em cada amostra e compará-las entre si. O volume final da reação era de 20 µl : 7,4 µl de água livre de nucleases; 0,8 µl de cada primer na concentração de 10 µM ; 10 µl de solução de *Syber Green* e 1 µl de cDNA sintetizado a partir de 2 µg de RNA total.

A ferramenta web Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) foi utilizada para selecionar os pares dos primers que abrangiam regiões de junções intron/exon com uma temperatura de melting de 60° C.

A sequência dos cDNAs desses genes foram recuperadas do banco de dados NCBI GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=nucleotide&itool=toolbar>). As sequências forward e reverse (apresentadas na orientação 5' para 3') foram as seguintes: Aire (GenBank acc NM 009646.1), GCAACTCTGGCCTCAAAGAG GGTCTGAATTCCGTTTCCAA e Ins1 (GenBank acc NM 008386.3), GCAAGCAGGTCATTGTTTCA e GGGACCACAAAGATGCTGCTGTT; Ins2 (GenBank acc NM 008387.3) ACCTTCAGACCTTGGCACTG e GCTGGGGTAGTGGTGGGTCTA; Gad1 (GenBank acc NM 008077.3) TCACCCTCGATTTTCAACC e AACAAACACGGGTGCAATTT; Gad2 (GeneBank acc NM 008078.2) CGCACTCTGGAAGACAATGA e CTTGTCCCCTAAGGGTTGGT; Col2a1 (GeneBank acc NM_031163.2) AACACTTTCCAACCGCAGTC e TCTGCCCAGTTCAGGTCTCT).

Foi utilizado como controle endógeno o gene GAPDH (GenBank acc NM 008084.2) cujos primers foram GGGTGTGAACCACGAGAAAT e CCTTCCACAATGCCAAAGTT).

A quantificação relativa da expressão gênica foi determinada utilizando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak, 2001). Para análise estatística dos dados, foram utilizados os testes *t-student* e One-way ANOVA, de acordo com a necessidade por meio do software estatístico *GraphPad Prism*.

4.11 Oligo microarrays

4.11.1 mRNAs microarrays

Os *microarrays* Agilent 4x44k são preparados através do processo *SurePrint* (sistema de impressão), no qual 44.000 oligos são sintetizados na superfície de lâminas de vidro da dimensão de lâminas de microscópio previamente preparadas. Este processo de síntese *in situ* possibilita a montagem de oligonucleotídeos de 60-mer de comprimento, base a base, com extrema precisão utilizando arquivos de sequências de RNA mensageiros baseado em bancos de dados. Nesses *microarrays* também estão presentes oligos que representam as isoformas de RNAs mensageiros.

A amplificação e a marcação das amostras de RNA foram feitas com a utilização do Quick Amp Labeling Kit One-Color (cianina 3, cy3, verde) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). O primeiro passo envolveu a diluição do Agilent One-Color Spike-Mix. A solução foi aquecida a 37°C em banho-maria por 5 minutos, homogeneizada por meio de agitação em vórtex e depois centrifugada brevemente antes do uso.

Em seguida, foram feitas diluições seriadas segundo recomendação do fabricante levando em consideração a quantidade inicial de RNA total. Para as amostras em questão optou-se pela massa de 500 ng de RNA total. A primeira diluição (1:20) foi feita a partir de 2 µL do Agilent One-Color Spike-Mix adicionados a 38 µL do Dilution Buffer proveniente do kit. Após homogeneização no vórtex, retirou-se 2 µL da primeira diluição e adicionou-se 48 µL do Dilution Buffer obtendo-se assim a segunda diluição (1:25). A terceira diluição (1:10) foi preparada a partir de 4 µL da segunda diluição adicionados a 36 µL do Dilution Buffer.

Feitas as diluições, iniciou-se o protocolo de marcação das amostras adicionando 500 ng de RNA total a um tubo de 1,5 mL e depois 1,2 µL de T7 Promoter Primer em cada uma das amostras a serem marcadas. Em seguida, 5 µL da terceira diluição do Agilent One-Color Spike-Mix foram adicionados com adição de água livre de nucleases para um volume final de 11,5 µL. As amostras foram então incubadas em banho-maria a 65°C por 10 minutos e posteriormente em gelo por 5 minutos.

Durante o período de incubação um cDNA Master Mix (por lâmina) foi preparado a partir de 18µL do 5X First Strand Buffer (pré-aquecido a 80°C por 4 minutos), sendo adicionados 9µL de 0,1M DTT; 4,5µL de 10mM dNTP mix; 4,5µL MMLV-RT e 2,3µL de RNaseOut sendo distribuído um volume de 8,5µL do mix em cada tubo de amostra. Após homogeneização as amostras foram incubadas a 40°C em um banho-maria por 2 horas.

Ao final deste período de incubação, as amostras foram removidas para banho-maria a 65°C, incubadas por 15 minutos e posteriormente removidas para o gelo permanecendo incubadas por mais 5 minutos.

Imediatamente antes do uso foi preparado um Transcription Master Mix (por lâmina) a partir de 68,9µL de água livre de nucleases; 90µL de 4X Transcription Buffer; 27µL de 0,1M DTT; 36µL de NTP mix; 28,8µL de 50% PEG (pré-aquecido a 40°C por 1 minuto); 2,3µL de RNaseOut; 2,7µL de Inorganic pyrophosphatase; 3,6µL de T7 RNA Polymerase e 10,8µL de Cyanine 3-CTP. Cada tubo de amostra recebeu 60µL Transcription Master Mix e após homogeneização foram incubados a 40°C em um banho-maria por 2 horas.

O passo que sucede a incubação envolve a purificação do RNA amplificado e marcado. Para tal procedimento foi utilizado o Illustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). Um passo inicial de limpeza do RNA foi realizado adicionando 3,5X o volume da reação (280µL) do tampão RA1 em cada amostra. Em seguida a cada tubo foram adicionados 280µL de etanol 100% (equivalente também a 3,5X o volume da reação) com posterior homogeneização.

A purificação do RNA foi realizada através de colunas RNAspin Mini aplicando o volume total de cada amostra na coluna seguida de centrifugação de 30 segundos a 8000 xg. Cada coluna foi então transferida para outro tubo coletor. Os passos de dessalinização da membrana sílica, digestão do DNA, lavagem e secagem da membrana sílica recomendados pelo kit não foram utilizados. A purificação foi retomada a partir

da segunda lavagem aplicando-se o tampão RA3 em cada coluna seguida de uma centrifugação de 1 minuto. O líquido foi descartado e a coluna foi posta novamente no tubo para uma terceira lavagem aplicando-se 250µL do tampão RA3, seguida de centrifugação por 2 minutos.

O último passo do kit envolveu a eluição do RNA em alta concentração adicionando-se 40 µL de água livre de nucleases seguido de centrifugação por 1 minuto a 11.000 xg.

Em seguida o RNA foi quantificado num espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 UV-VIS espectrofotômetro (NanoDrop Technologies. Além disso, foi detectada a incorporação do fluorocromo cianina (Cy3) nas amostras expressando sua concentração em pmol/µL. O valor da incorporação total dividido pela massa total fornece um valor que serve como referência para o prosseguimento do passo de hibridação. Somente as amostras que obtiveram os valores acima de 9 foram utilizadas.

Anterior ao passo de hibridação, as amostras passaram por um processo de fragmentação utilizando o Fragmentation mix para 4x44K microarrays. Cada amostra contendo 1,65 µg de RNA marcado e amplificado (cRNA) recebeu 11 µL de 10X Blocking Agent (preparado com a adição de 500µL de água livre de nucleases e aquecido a 37°C por 4 minutos). Nesse momento o volume da reação não deve ser superior a 52,8 µL sendo necessário completar cada amostra com o volume de água livre de nucleases correspondente. Por último adicionou-se 2,2 µL de 25X Fragmentation Buffer em cada tubo sendo o volume final da reação de 55µL. Em seguida as amostras foram incubadas em banho-maria a 60°C por 30 minutos.

Após a incubação, seguindo a recomendação do kit para lâminas de microarrays 4x44K, adicionou-se 55µL do 2X GEx Hybridization Buffer HI-RPM em cada tubo e após homogeneização as amostras foram centrifugadas por 1 minuto a 13000 xg. Um volume de 100µL de cada amostra foi utilizada imediatamente para o processo de hibridação no forno a 65°C em rotação durante 17 horas.

Após a hibridação, as lâminas passaram por um processo de lavagem na seguinte ordem: tampão 1 (GE Wash Buffer 1 - 0,005% Triton X-102) por 1 minuto à temperatura ambiente, tampão 2 (GE Wash Buffer 2 - 0,005% Triton X-102) por 1 minuto a 37°C. Ambas as lavagens foram feitas em um agitador com o uso de barras magnéticas. Em seguida as lâminas foram colocadas em solução de acetonitrila por 10 segundos à temperatura ambiente e por último na solução Stabilization and Drying por 30 segundos a temperatura ambiente capaz de prevenir a degradação da Cianina 3 (Cy3)

pelo ozônio. Após serem retiradas da solução, as lâminas foram escaneadas imediatamente evitando o impacto dos oxidantes ambientais na intensidade dos sinais utilizando o DNA Microarray Scanner (Agilent Technologies) e os dados foram extraídos através do Agilent Feature Extraction Software.

4.11.2 miRNAs microarrays

Os microarrays de miRNA Agilent 8x15k (G4471A, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), foram preparados pelo processo *SurePrint* (sistema de impressão), no qual aproximadamente 15.000 oligos são sintetizados *in situ* base a base na superfície de lâminas de vidro previamente preparadas de maneira análoga ao que foi explicado para os microarrays de mRNA.

O processo de marcação das amostras foi feito com o *miRNA Complete Labeling and Hyb kit* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) e para isto utilizamos 100 ng de RNA total. O primeiro passo envolveu a diluição do RNA total em água livre de nucleases. Posteriormente adicionou-se 2 µl dessa diluição em um tubo de 0.5 ml e conservou-se no gele enquanto foi preparado o CIP (*Calf Intestinal Alkaline Phosphatase*) *Master Mix*, que foi feito em marcação no *Spike-In*. A reação por amostra do CIP Master Mix continha: 0,4 µl de 10x *Calf Intestinal Alkaline Phosphatase*, sendo o volume final em cada amostra de 4 µl.

O passo seguinte envolveu a defosforilação das amostras. Todos os tubos foram colocadas a 37°C em um banho-maria por 30 minutos. Em seguida, para a desnaturação das amostras, foram adicionados 2,8 µl de DMSO 100% deixando a 100°C em um banho-maria por 8 minutos. Após esse tempo, os tubos foram colocados imediatamente em um banho frio feito de uma mistura de água e gelo.

Após esse processo de desnaturação, o *Ligation Master Mix* foi preparado. Nesse mix utilizou-se amostra: 1 µl de 10x *T4 RNA Ligase Buffer* (aquecido previamente a 37°C para dissolução de precipitado); 3 µl de *Cyanine3-pCp* e 0,5 µl de *T4 RNA Ligase* (mantida a temperatura ambiente durante o preparo da reação). Após a adição do mix, os tubos contendo um volume final de 11,3 µl passaram por rápida centrifugação, e foram levados para a incubação a 16°C em termociclador por 2 horas.

Decorrido o tempo da incubação, as amostras foram submetidas à secagem a vácuo a uma temperatura entre 45 °C e 55°C, no aparelho SC110A SpeedVAc Plus

concentrator (Savant Instrument, Holbrook, NY, USA) por aproximadamente 30 minutos, sendo fundamental que estivessem totalmente secas e sem resíduos de DMSO.

Na etapa que antecede a hibridação, as amostras foram ressuspensas em 18 µl de água livre de nucleases e em seguida, pipetou-se 4,5 µl de 10x *Blocking Agilent* (preparado com a adição de 125 µl de água livre de nucleases e aquecidos a 37 °C por 4 minutos) e 22,5 µl de 2x *Hi-RPM Hybridization Buffer*, resultando num volume de 45 µl. Após serem misturadas gentilmente, as amostras foram incubadas a 100°C por 5 minutos e imediatamente transferidas para o gelo por 5 minutos.

Para o processo de hibridação foram adicionados 50 µl de cada amostra, e as lâminas foram hibridadas em forno a 55°C com 20 rpm de rotação por 20 horas

Após a hibridação as lâminas de miRNAs passaram por um processo de lavagem na seguinte ordem: tampão 1 (GE Wash Buffer 1 - 0,005% Triton X-102) por 1 minuto à temperatura ambiente, tampão 2 (GE Wash Buffer 2 - 0,005% Triton X-102) por 1 minuto a 37°C. Ambas as lavagens foram feitas em um agitador com o uso de barras magnéticas. Em seguida as lâminas foram colocadas em solução de acetonitrila por 10 segundos à temperatura ambiente e por último na solução Stabilization and Drying por 30 segundos a temperatura ambiente capaz de prevenir a degradação da Cianina 3 (Cy3) pelo ozônio. Após serem retiradas da solução, as lâminas foram escaneadas imediatamente evitando o impacto dos oxidantes ambientais na intensidade dos sinais utilizando o DNA Microarray Scanner (Agilent Technologies) e os dados foram extraídos através do programa Feature Extraction (Agilent Technologies).

Todos os resultados (dados brutos) dos experimentos de *microarray* deste trabalho foram depositados no banco de dados público ArrayExpress do European Molecular Biology Laboratory (EMBL-EBI) disponível online (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>). Portanto, esses dados poderão ser recuperados livremente para uso em outras análises ou projetos. São estes os números de acesso de cada um dos conjuntos de dados: E-MEXP 3343 (expressão de mRNAs de mTECs Aire silenciadas de BALB/c), E-MEXP 3665 (expressão de microRNAs de mTECs Aire silenciadas de BALB/c), E-MEXP 3881 (expressão de mRNAs de mTECs de BALB/c e de NOD).

4.12 Análise dos dados de microarrays

Para a análise dos dados de *microarrays* utilizamos a plataforma de bioinformática *GeneSpring GX* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), que fornece ferramentas estatísticas acessíveis e eficazes para a rápida visualização e análise de dados de transcriptomas, genomas, proteomas e metabolomas. A licença adquirida para este projeto junto a Agilent foi apenas para análise de transcriptomas.

Nesta etapa do trabalho foram realizadas três análises de dados de microarrays independentes: 1) mRNAs diferencialmente expressos em mTECs após o silenciamento de Aire, comparando mTECs controle *versus* mTECs Aire-silenciadas, 2) miRNAs diferencialmente expressos em mTECs após o silenciamento de Aire, comparando mTECs controle *versus* mTECs Aire-silenciadas, 3) mRNAs diferencialmente expressos entre mTECs de BALB/c *versus* mTECs NOD.

A normalização dos dados foi feita por quantil, e os dados de expressão foram avaliados segundo o *fold change* cuja função é identificar genes com diferenças de expressão entre duas condições levando-se em consideração um dado ponto de corte (*cut-off*) ou limiar. O valor de *fold change* considerado foi ≥ 1.5 para as análises 1 e 2 e ≥ 1.4 para análise 3. A etapa subsequente foi a construção do agrupamento hierárquico dos mRNAs e dos miRNAs diferencialmente expressos utilizando a correlação de Pearson como distância métrica. Nesse tipo de agrupamento a relação entre genes ou entre amostras é representada por uma árvore (dendrograma) cujos comprimentos dos ramos refletem os graus de similaridade entre os mesmos.

4.13 Identificação dos sítios T-boxes e G-boxes de RNA Polimerase II em genes de miRNAs

Nós utilizamos o programa *Regulatory Sequence Analysis Tools (RSAT)* disponível online (<http://rsat.ulb.ac.be/rsat>) que é baseado em uma ferramenta de busca de determinados sítios de ligação específicos nas sequências de DNA de interesse (Kumar et al. 2001). Dessa forma nós localizamos os possíveis sítios de ligação T-box (TTATTA) e G-box (ATTGGTTA) da RNA Pol II *upstream* aos genes de miRNAs. As sequências dos genes de miRNAs foram recuperadas a partir do banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>).

4.14 Localização cromossômica dos genes de mRNAs e de miRNAs

A localização cromossômica dos genes de mRNA e miRNAs foram obtidas no banco de dados público do NCBI Map Viewer, disponível online (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/>)

4.15 Representação tecidual dos genes de PTAs

As informações da representação tecidual dos genes de PTAs Aire dependentes, dos genes PTAs presentes nas redes de interação miRNAs-mRNAs de mTECs controle e mTECs Aire silenciadas e dos autoantígenos específicos de DM1, foram obtidas no banco de dados público *BioGPS* (<http://biogps.org>) (WU et al., 2009). Esse banco de dados fornece anotações enriquecidas de genes e análises funcionais dos dados de microarrays incluindo sequências de clones de cDNA de diferentes órgãos/tecidos, permitindo-nos agrupar os genes de acordo o tecidos que eles representam.

4.16 Construção de redes de interação pós-transcricional entre miRNA-mRNA

GenMiR⁺⁺: Para o estudo das interações entre miRNAs e mRNAs utilizamos o algoritmo de estatística Bayesiana GenMiR⁺⁺ (Generative model for miRNA regulation) (disponível online em <http://www.psi.toronto.edu/genmir/>) com intuito de reconstruirmos redes de interação gerando figuras do tipo *pathways* pelo pareamento dos perfis de expressão de miRNAs e mRNAs (Huang et al., 2007). O algoritmo calcula, com alta sensibilidade, miRNA reguladores de mRNAs considerados “alvos” equilibrando as diferentes fontes de incerteza no cálculo.

MATLAB: A plataforma MATLAB (MATrix LABoratory disponível online em <http://www.mathworks.com/matlabcentral/>) é um programa interativo de alta performance voltado para o cálculo numérico e que também contém o algoritmo GenMiR⁺⁺.

O MATLAB integra análise numérica, cálculo com matrizes, processamento de sinais e construção de gráficos em ambiente fácil de usar onde problemas e soluções são expressos somente como eles são escritos matematicamente, ao contrário da programação tradicional em linguagem Fortran, Basic ou C.

CYTOSCAPE: A partir da matriz de dados gerados no GenMiR⁺⁺ dentro de um programa MATLAB arquivos no formato texto foram utilizados para input do programa cytoscape (<http://www.cytoscape.org>) que tornou possível a visualização gráfica das interações miRNA-mRNA calculadas. Tal programa oferece funcionalidade para integração de dados arbitrários no gráfico, uma representação visual e dados integrados, ferramentas de seleção e filtragem, e uma interface para métodos externos aplicados com *plugins* (Shannon et al., 2003)

O programa cytoscape foi desenvolvido baseando-se na biologia de sistemas e, embora aplicável a qualquer sistema de componentes e interações moleculares, o programa torna-se mais eficiente usado em conjunto com grandes bases de dados de expressão gênica.

A organização central do cytoscape é uma rede gráfica, com genes, proteínas ou outras moléculas representadas como “nós” e as interações com ligações entre os mesmos. Sendo assim, é possível analisar de maneira comparativa, as variações nos perfis de expressão de mRNAs e de seus mRNAs alvos.

RNA-HYBRID: O RNAhybrid é uma ferramenta de bioinformática que analisa a estrutura secundária, e determina o sítio de hibridação mais favorável entre um determinado miRNA e seu mRNA alvo (Rehmsmeier et al., 2004; Kruger & Rehmsmeier, 2006) O algoritmo é disponível online em (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid/submission.html>).

A metodologia envolve um algoritmo de programação dinâmica que calcula o local para a hibridação mais favorável em termos de energia. Essa metodologia é baseada no princípio da propriedade termodinâmica de interação mRNA-mRNA, na qual a fita dupla de RNA é mais estável, ou seja, a ligação entre miRNA-mRNA é mais forte, quando a energia é menor (Lewis et al., 2005). A significância estatística da interação é determinada pela mínima energia livre, ou mfe (*minimum free energy*), normalizada pelo comprimento do mRNA alvo. Além disso, o programa oferece ao usuário uma série de opções, como por exemplo, determinar a região do miRNA que deve apresentar complementaridade perfeita com o seu alvo, filtrar as interações com menor mfe, e escolher a inclusão ou não de regiões de desapareamentos.

No presente trabalho, nós fizemos uso dessa ferramenta para a confirmação *in silico* e obtenção da estrutura molecular de interações miRNA-mRNA selecionadas previamente definidas pelo uso do modelo bayesiano GenMiR⁺⁺ descrito anteriormente.

4.17 Análise de predições de interações de miRNA-mRNA utilizando bancos de dados públicos

Para a análise de possíveis miRNAs que regulam genes PTAs Aire dependentes, nós realizamos uma busca nos bancos públicos de predição de interação de miRNA-mRNA: DianaMT, miRanda, miRDB e Targetscan. Tal busca nos diferentes bancos de dados foi facilitada pela utilização da plataforma MirWalk disponível online em (<http://www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/predictedmirnagene.html>).

Delineamento Experimental

5. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Resultados

6. RESULTADOS

6.1 Monitoramento da entrada de RNA-Cy3 no timo por eletroporação *in vivo*

Para o monitoramento do método de eletrotransfecção de RNA no timo, realizamos um ensaio de eletroporação *in vivo* utilizando tampão PBS (controle) ou PBS + RNA irrelevante marcado com o fluorocromo Cy3 (RNA-Cy3). Os tecidos de timo foram corados com DAPI para evidenciar o núcleo celular em azul. A Figura 7a mostra um corte histológico de timo submetido à eletroporação de tampão PBS. A microscopia fluorescente revelou que a eletroporação do timo permite o *uptake* de moléculas de RNA-Cy3 (coloração vermelho brilhante) tanto no citoplasma quanto no núcleo celular do estroma deste órgão (Figura 7b).

Figura 7 Avaliação histológica do timo de camundongo BALB/c através de microscopia fluorescente após a eletrotransfecção *in vivo*. (A) Timo eletrotransfectado com tampão PBS (controle) ou (B) timo eletrotransfectado com PBS + siRNA irrelevante-Cy3. Moléculas de siRNA-Cy3 (vermelho) foram localizadas tanto no citoplasma como no núcleo das células estromais. O núcleo foi corado com DAPI (azul). Aumento de 63x.

6.2 Avaliação histológica do timo de camundongo BALB/c por meio de coloração por hematoxilina-eosina.

Visando avaliar se a estrutura tímica é alterada pelo processo de eletrotransfecção *in vivo*, timos eletrotransfectados com PBS foram comparados com timos de camundongos controle, ou seja, não submetidos ao processo de eletroporação.

Os timos desses dois grupos foram utilizados na confecção de lâminas histológicas e submetidos à coloração hematoxilina-eosina (H&E).

As imagens de H&E revelaram que o processo de eletroporação *in vivo*, não causa alteração observável na estrutura tímica, uma vez que ambos os compartimentos o cortical e o medular encontravam-se preservados quando observados uma hora após o processo da eletroporação (Figura 8).

Figura 8 Avaliação histológica do timo de camundongo BALB/c. Timo controle ou timo eletroporado com tampão PBS. Nota-se que os compartimentos corticais e medulares ainda estão preservados uma hora após o processo de eletroporação. Coloração H&E, aumento 40x (c = córtex, m = medula).

6.3 Otimização do procedimento de silenciamento do gene Aire por eletrotransfecção *in vivo* do timo

Tendo confirmado que a eletroporação *in vivo* no timo além de ser eficiente possibilitando o *uptake* de siRNA não provoca alteração na estrutura histológica do órgão, passamos às análises funcionais com amostras de RNA extraídas de timos eletrotransfectados com siRNA anti Aire. As reações de qRT-PCR foram utilizadas para medir os níveis de mRNA de Aire em diferentes tempos (horas) após a eletrotransfecção (Figura 9). Notamos que como esperado e por se tratar de siRNA, o efeito inibitório foi parcial e transitório, atingindo níveis máximos e significantes (59% de silenciamento) após 48 horas da eletrotransfecção. A restauração dos níveis de mRNA de Aire ocorreu em 72 horas após a eletrotransfecção (Figura 9).

6.4 Especificidade do silenciamento do gene Aire

Para demonstrar que o processo de eletrotransfecção tímica por si só não afeta a expressão de Aire, um grupo de camundongos foi eletrotransfectado com siRNA irrelevante. Análises de qRT-PCR mostraram que 48 h após a eletrotransfecção com siRNA irrelevante, os níveis de mRNA de Aire foi comparável com o grupo controle eletrotransfectado apenas com PBS (Figura 10).

Figura 9 Evolução temporal do silenciamento do gene Aire *in vivo* no timo. Avaliação dos níveis transcricionais de Aire por meio de qRT-PCR nos tempos de 24, 48 e 72h após a eletrotransfecção de siRNA anti-Aire *in vivo* no timo. As análises de qRT-PCR revelaram que o ponto máximo de silenciamento deste gene ocorreu em 48 h (59% de silenciamento) após a eletrotransfecção. O nível transcricional de Aire foi restaurado 72 h após a eletrotransfecção (Student's t test, $p < 0.05$).

Figura 10 Análise por qRT-PCR de amostras de RNA de estroma tímico eletrotransfectado com PBS (controle) ou com siRNA irrelevante. Este resultado revelou que processo de eletrotransfecção por si só não afeta a expressão do gene Aire. Não observamos diferença significativa entre os níveis transcricionais de Aire comparando o timo controle e o eletrotransfectado com siRNA irrelevante (Student's t test, $p < 0.05$).

6.5 Silenciamento do gene Aire em células mTE

Para avaliar se o processo de eletrotransfecção com siRNA anti-Aire atinge as células mTEC e é suficiente para degradar o mRNA deste gene, as células mTEC foram isoladas do estroma tímico 48 h após a electrotransfecção. A Figura 11, mostra que a sequencia de siRNA anti Aire foi efetiva no silenciamento deste gene atingindo cerca de 63% de inibição. No gráfico vemos que a expressão transcricional do gene Aire nas células mTEC controle atingiu cerca de 90% e nas células silenciadas este nível abaixou para menos de 40%.

O RNA total proveniente destas células foi utilizado nos ensaios de qRT-PCRs e *microarrays* de mRNA e de miRNA.

Figura 11 Avaliação dos níveis transcricionais de Aire em mTECs isoladas do estroma tímico 48h após ao processo de eletrotransfecção com PBS ou com siRNA anti-Aire. A expressão de Aire foi reduzida em aproximadamente 63% em amostras electrotransfectadas com siRNA anti-Aire quando comparadas com o controle (Student's t test, $p < 0.05$).

6.6 Efeito do silenciamento do gênico sobre a expressão da proteína AIRE no timo

Uma vez demonstrada a eficiência do silenciamento gênico de Aire no aspecto transcricional (mRNA) partimos para as avaliações dos níveis da proteína AIRE, na tentativa de responder a questão se a diminuição dos níveis do mRNA também afeta, neste caso, os níveis da proteína AIRE. A técnica escolhida para avaliar esta questão foi a imunofluorescência (imunolocalização) em cortes histológicos de timos controle ou timos eletrotransfectados com siRNA anti Aire.

A Figura 12 mostra essas imagens de imunofluorescência e, por comparação, fica claro que o silenciamento gênico também influencia os níveis da proteína AIRE. Os sinais de imunofluorescência da proteína AIRE (em verde), foram notavelmente reduzidos nos núcleos das células mTEC dos timos submetidos ao silenciamento gênico.

Controle

Aire silenciado

Figura 12 Detecção da proteína AIRE por imunofluorescência. A intensidade do sinal de imunofluorescência, assim como o número de células AIRE⁺ foi ensaiada em timo controle ou em timo eletrotransfectado com siRNA anti-Aire (48 h após a eletrotransfecção). Note que os sinais de imunofluorescência da proteína AIRE (verde) foram notavelmente reduzidos nos núcleos das células mTEC do timo silenciado em relação ao controle. O núcleo foi corado com DAPI (azul). Aumento 40x (c = córtex, m = medula).

6.7 Efeito do silenciamento de Aire sobre a expressão dos genes de PTAs

Dendrogramas e heat-maps gerados a partir das análises de *micrarrays* indicam que o silenciamento parcial do gene Aire (63 % de silenciamento), afetou a modulação de 4.394 genes (Figura 13).

Desse conjunto de genes modulados, focamos inicialmente no conjunto de 30 que codifica os PTAs Aire dependentes segundo Anderson e colaboradores (2002). Desse grupo de genes, 10 foram modulados (9 induzidos e 1 reprimido) após o silenciamento de Aire *in vivo* (Tabela 1).

Figura 13 Comparação dos perfis de expressão entre mTECs controle e mTECs Aire silenciadas. Matriz de expressão de 4.394 genes modulados após o silenciamento do gene Aire no timo *in vivo*. A correlação de Pearson foi utilizada como medida de similaridade. O valor de expressão normalizado para cada gene é representado pelas cores: vermelho que indica indução; verde que indica repressão e preto indica não modulação (Fold-change = $\geq 1,6$).

Tabela 1. Genes de antígenos de tecidos periféricos (PTA) e suas modulações em mTECs submetidas ao silenciamento do gene Aire *in vivo* no timo. Os dados foram coletados de hibridizações com microarrays. (modulação gênica com fold-change ≥ 1.6).

Gene PTA (símbolo)	Representação tecidual	Modulação
<i>Collagen, type II, alpha 1</i> (Col2a1)	Osteoblastos e osso	induzido
<i>Cytochrome P450 1a2</i> (Cyp1a2)	Pulmão e fígado	induzido
<i>Insulin-like growth factor II</i> (Igf2)	Placenta, cordão umbilical, glândula mamária e salivar, osteoblastos e cérebro	induzido
<i>Insulin I</i> (Ins1)	Pâncreas	induzido
<i>Insulin II</i> (Ins2)	Pâncreas	induzido
<i>Major urinary protein 1</i> (Mup1)	Glândula mamária, pulmão, placenta, útero, ovário, epiderme, estômago, fígado, tecido adiposo, bexiga, glândula adrenal, coração, músculo esquelético, cérebro, linfonodos, timócitos DP e SP	induzido
<i>Major urinary protein 3</i> (Mup3)	Glândula mamária, pulmão, tecido adiposo, fígado e glândula adrenal	induzido
<i>Major urinary protein 4</i> (Mup4)	Glândula salivar e glândula lacrimal	induzido
<i>Salivary protein 1</i> (Spt1)	Glândula salivar	induzido
<i>Neutrophilic granule protein</i> (Ngp)	Timócitos DP, mastócitos, granulócitos, osteoblastos, linfonodos, granulócitos, osteoblastos, linfonodos, medula óssea e osso	reprimido

6.8 Análise da expressão transcricional de PTAs de mTECs controle comparada com mTECs Aire silenciadas por PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR)

Os dados de *microarrays* controle ou após o silenciamento do gene Aire e correspondentes a quatro genes de PTAs foram confirmados por meio de qRT-PCR: Ins1, Ins2, Col2a1 e Gad1. Todos os genes avaliados são considerados como Aire dependentes (Ins1, Ins2, Col2a1) exceto Gad1.

O perfil de modulação obtido por qRT-PCR, foi comparável com os dados obtidos com *microarrays*. O resultado mostrado na Figura 14, confirmam que os genes Ins1, Ins2, Col2a1 e Gad1 foram induzidos após o silenciamento de Aire.

Figura 14 Confirmação dos dados de *microarrays* por qRT-PCR ensaiando os genes de PTAs diferencialmente expressos após o silenciamento do gene Aire. Os resultados obtidos pela análise de qRT-PCR mostraram que esses genes foram induzidos após o silenciamento de Aire (Student's t test, $p < 0.05$).

6.9 miRNAs diferencialmente expressos após o silenciamento do gene Aire

Além de avaliarmos o efeito do silenciamento do gene Aire sobre a expressão de genes (mRNAs) que codificam PTAs, nós também avaliamos a expressão de miRNAs modulados após o silenciamento deste gene.

Dendrogramas e heat-maps gerados a partir das análises de microarrays revelaram que 87 miRNAs foram diferencialmente expressos entre as amostras de mTECs controle e mTECs Aire silenciadas (Figura 15).

A Tabela 2, mostra a modulação e a localização cromossômica desses 87 miRNAs modulados, sendo, 44 induzidos e 43 reprimidos após o silenciamento do gene Aire.

Figura 15 Comparação entre os perfis de expressão de mTECs controle e Aire silenciadas. Matriz de expressão de 87 miRNAs modulados após o silenciamento do gene Aire *in vivo* no timo. A correlação de Pearson foi utilizada como medida de similaridade. O valor de expressão normalizada para cada miRNA é representado pelas cores: vermelho indica indução; verde indica repressão e preto indica não modulação.

Tabela 2. miRNAs modulados, induzidos ou reprimidos após o silenciamento de Aire *in vivo*. Os dados foram coletados de microarrays (modulação com fold-change ≥ 1.6). A localização cromossômica dos miRNAs regulados por Aire foi conferida no banco de dados NCBI Map Viewer. Os miRNAs destacados em cinza são aqueles cujas sequências não foram encontradas no NCBI.

Nome	Cromossomo/citobanda	Regulação
miR- let-7g*	9 F1	Induzido
miR-206	1 A4	Induzido
miR-877	17 B1	Induzido
miR-130a*	2 C	Induzido
miR-188-5p	6 A1.1	Induzido
miR-494	12 F1	Induzido
miR-150*	7 B4	Induzido
miR-300	12 F1	Induzido
miR-195	11 B3	Induzido
miR-199a-3p	9 A3	Induzido
miR-10b	2 C3	Induzido
miR-194	1 H5	Induzido
miR-370	12 F1	Induzido
miR-1306	16 A3	Induzido
miR-210	7 F5	Induzido
miR-193b*	16 A1	Induzido
miR-138-1*	9 F4	Induzido
miR-223	X C3	Induzido
miR-15b*	3 E1	Induzido
miR-185	16 A3	Induzido
miR-21	11 C	Induzido
miR-31*	4 C4	Induzido
miR-134	12 F1	Induzido
miR-147	2 E5	Induzido
miR-28-5p	16 B1	Induzido
miR-539	12 F1	Induzido
miR-32*	4 B3	Induzido
miR-92b	3 F3	Induzido
miR-135a*	9 F1	Induzido
miR-125a-5p	17 A3.2	Induzido
miR-877*	17 B1	Induzido
miR-574-3p	5 C3.1	Induzido
miR-342-5p	12 F1	Induzido
miR-196b	6 B3	Induzido
miR-99b*	17 A3.2	Induzido
miR-297	7 A1	Induzido
miR-195*	11 B3	Induzido
miR-671-5p	5 A3	Induzido
miR-483-3p	7 F5	Induzido
miR-432	12 F1	Induzido
miR-215	1 H5	Induzido

miR-15a*	14 D1	Induzido
miR-500	X A1.1	Induzido
miR-17*	14 E4	Induzido
miR-143	18 E1	Reprimido
miR-484	16 A1	Reprimido
miR-296-5p	2 H4	Reprimido
miR-338-5p	11 E2	Reprimido
miR-148b	15 F3	Reprimido
miR-324-3p	11 E2	Reprimido
miR-19b-1*	11 E4	Reprimido
miR-205	1 H6	Reprimido
miR-130b*	16 A3	Reprimido
miR-378*	18 E1	Reprimido
miR-98	X F3	Reprimido
miR-142-3p	11 C	Reprimido
miR-149	1 D	Reprimido
miR-361-5p	X E1	Reprimido
miR-30e*	4 D2.2	Reprimido
miR-181a*	1 E4	Reprimido
miR-106b*	5 G2	Reprimido
miR-1249	15 E2	Reprimido
miR-let-7e*	17 A3.2	Reprimido
miR-let-7d*	13 A5	Reprimido
miR-449b	13 D22	Reprimido
miR-424	X A5	Reprimido
miR-212	11 B5	Reprimido
miR-425	9 F2	Reprimido
miR-338-3p	11 E2	Reprimido
miR-363	X A5	Reprimido
miR-18a	14 E4	Reprimido
miR-181c	8 C3	Reprimido
miR-1224-5p	16 B1	Reprimido
miR-let-7b*	15 E2	Reprimido
miR-423-5p	11 B5	Reprimido
miR-301b	16 A3	Reprimido
miR-615-3p	15 F3	Reprimido
miR-378	18 E1	Reprimido
miR-139-3p	7 E3	Reprimido
miR-652	X F2	Reprimido
miR-181a-2*	2 B	Reprimido
miR-18b*	X A5	Reprimido
miR-151-5p	15 D3	Reprimido
miR-186	3 H4	Reprimido
miR-770	12 F1	Reprimido
miR-362-3p	X A1.1	Reprimido
miR-211	7 C	Reprimido

6.10 Sítios de ligação RNA Pol II nos genes de miRNAs

Os dados de microarrays revelaram que 87 miRNAs foram modulados em mTECs após o silenciamento de Aire. Baseados neste resultado nós localizamos nos genes de miRNAs os sítios de ligação da RNA Pol II, T-boxes (TTATTA) e G-boxes (ATTGGTTA).

A Figura 16 representa o posicionamento desses sítios, as barras azuis correspondem aos sítios T-boxes e as barras vermelhas correspondem aos sítios G-boxes. Dos 87 miRNAs modulados, 73 foram incluídos nessa análise, os demais genes de miRNAs não foram incluídos porque as suas sequências genômicas não foram encontradas no NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide>).

Todos os 73 genes de miRNAs analisados apresentaram em suas sequências um ou ambos sítios de ligação da RNA Pol II.

Figura 16 Posionamento de G-boxes (barras vermelhas) e T-boxes (barras azuis) que representam sítios de ligação da RNA Pol II em genes de miRNAs.

6.11 Predição de alvos por meio de redes de interação miRNAs-mRNAs

Procurando estudar o controle pós-transcricional que os miRNAs exercem sobre os mRNAs regulados por Aire em mTECs, utilizamos o programa GenMIR⁺⁺, que calcula a probabilidade de interação entre um determinado miRNA e um mRNA baseados nos dados de expressão gênica oriundos de hibridizações com microarrays. Esse programa, aliado ao programa gráfico Cytoscape, possibilitou a construção de redes de interações de mTECs controle e mTECs Aire-silenciadas.

Para este tipo de análise consideramos o conjunto dos 87 miRNAs e dos 4.394 mRNAs diferencialmente expressos.

A Figura 17 mostra a rede de interação miRNA-mRNA de mTECs controle. Essa rede de interação, revelou que 6 membros da família let-7 (miR-let-7a, miR-let-7b, miR-let-7c, miR-let-7d, miR-let-7f e miR-let-7g) interagem com os seus respectivos mRNAs alvos (72 mRNAs).

As interações presentes nas redes foram validadas *in silico* utilizando o programa RNAhybrid (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid/submission.html>), que analisa a estrutura secundária e determina o sítio de hibridização mais favorável entre um determinado miRNA e o seu mRNA alvo.

Abaixo da figura da rede de interação, incluímos um exemplo de como foi feita a validação *in silico* da interação miRNA-mRNA pelo programa RNAhybrid que envolve a interação entre a região seed do miRNA let-7a e a região 3'UTR do mRNA Hmga2, (mfe $\geq$ 20 kcal/mol).

A Figura 18 representa a rede de interação de miRNAs-mRNAs nas mTECs Aire silenciadas. Os resultados obtidos nesta rede de interação, mostraram que 15 miRNAs (miR-let-7e*, miR-15a*, miR-19b-1*, miR-30e*, miR-130b*, miR-149, miR-296-5p, miR-362-5p, miR-378, miR-425, miR-432, miR-484, miR-574-3p, miR-671-5p, miR-1249), estabelecem interação com um restrito grupo de 19 mRNAs alvos.

Abaixo da rede de interação, segue mais um exemplo de como foi feita a validação *in silico* pelo programa RNA hybrid mostrando a interação entre a região seed do miR378 e a região 3'UTR do mRNA Prpsap1, (mfe $\geq$ 20 kcal/mol). Todas as demais interações presentes nestas redes passaram por esse mesmo tipo de validação.

Figura 17 Rede de interação pós-transcricional de miRNAs com os seus respectivos mRNAs alvos em mTECs controle. Em destaque mostramos um exemplo de como foi feita a validação *in silico* pelo programa RNAhybrid da interação entre a região seed do miRNA let-7a e a região 3'UTR do mRNA Hmga2 (mfe -27.1 kcal/mol).

Figura 18 Rede de interação pós-transcricional de miRNAs com os seus respectivos mRNAs alvos em mTECs Aire silenciadas. Em destaque mostramos um exemplo de como foi feita a validação *in silico* pelo programa RNAhybrid da interação entre a região seed do miR-378 e a região 3'UTR do mRNA Prpsap1 (mfe - 27 kcal/mol).

6.12 Representação tecidual dos mRNAs alvos presentes nas redes de interação de mTECs controle e mTECs Aire silenciadas

Os 72 mRNAs presentes na rede de interação de mTECs controle (Figura 17) e os 19 mRNAs presentes na rede de interação de mTECs Aire silenciadas (Figura 18), foram agrupados em 13 sistemas anatômicos e funcionais do corpo, nos quais foram distribuídos nos seguintes sistemas: linfóide, muscular, reprodutivo, respiratório, urinário, circulatório, nervoso central, digestório, epiderme, ocular, tecido gordo, glandular e locomotor (Figura 19). Este tipo de representação é reflexo da expressão gênica promíscua (PGE) das células mTEC.

Nota-se que o perfil de representação tecidual em mTECs é alterado após o silenciamento de Aire, sendo a mudança mais significativa no sistema digestório onde ocorre diferença maior de representação tecidual, a representação em mTECs controle é de 14% e após o silenciamento de Aire aumenta para 24%. Por outro lado, a representação tecidual no sistema urinário permanece a mesma em mTECs antes e após o silenciamento de Aire.

Os resultados obtidos com base em experimentos de microarrays e utilização do programa GenMir++ para reconstrução (predição) de redes de interação miRNAs-mRNAs revelaram um fato intrigante, determinados PTAs descritos como Aire dependentes (Anderson et al 2002), como por exemplo *Ins2*, *Igf2* ou *Spt1*, entre outros, quando expressos em mTECs, não se associam com miRNAs nas redes de interação miRNA-mRNA *in silico*. Entretanto, outros mRNAs que codificam PTAs participam normalmente das redes de interação com miRNAs.

Baseados nesses resultados, pesquisamos em bancos de dados de predição de interação de miRNA-mRNA possíveis miRNAs modulados por Aire que atuam no controle pós-transcricional desses PTAs Aire dependentes que não estiveram presentes nas redes de interação deste trabalho.

Os dados obtidos nos bancos de predição de interação miRNA-mRNA DianaMT, miRanda, miRDB, miRWalk e Targetscan revelaram que entre os 10 mRNAs de PTAs Aire dependentes modulados após o silenciamento de Aire, 8 podem ser regulados pós-transcricionalmente por miRNAs também regulados por Aire (Tabela 3).

mTECs controle

mTECs Aire silenciadas

Figura 19 Representação tecidual dos mRNAs alvos presentes nas redes de interação de mTECs controle ou mTECs Aire silenciadas. Os mRNAs alvos presentes nas duas redes de interação foram distribuídos em 13 sistemas anatômicos e funcionais de acordo os dados disponíveis no banco BioGPS.

A Tabela 3 mostra os miRNAs preditos que atuam na regulação de mRNAs de PTAs Aire dependentes e os respectivos bancos de dados nos quais a predição foi encontrada (cinza). Note que Mup3 foi o mRNA alvo que mostrou o maior número de interações envolvendo 6 diferentes miRNAs, ou seja, (miR-539, miR-134, miR-185, miR-301b, miR-363, miR-15a*).

Por outro lado, alguns mRNAs de PTAs, por exemplo, miR-XX ou miR-XX, apresentaram somente uma interação em nosso estudo, mas aparecem em 4 dos 5 bancos de dados consultados.

A Figura 20 mostra a estrutura molecular de interações entre miRNA-mRNA modulados após o silenciamento de Aire e preditos nos bancos de dados e suas respectivas energias livre de interação obtidas com o programa RNAhybrid.

Tabela 3. Análise de interações preditas em bancos dos mRNAs de PTAs Aire dependentes e miRNAs modulados após o silenciamento de Aire. Os quadrantes destacados em cinza representam interação predita nos determinados bancos. Os quadrantes em branco representam interações não preditas nos determinados bancos.

Símbolo do gene	miRNA	DianaMT	miRanda	miRDB	miRWalk	Targetscan
Cyp1a1	186					
Cyp1a2	186					
Igf2	134					
	296-5p					
Ins1	134					
Ins2	142-3p					
Mup4	539					
Mup3	539					
	134					
	185					
	301b					
	363					
	15a*					
Ngp	149					
	671-5p					

<p>Cyp1a1 5' U GAAUG GACAG A 3'</p> <p>miR-186 3' U GCGGA GAGGGAGAA CUU GAA AC 5'</p> <p>mfe: -26.8</p>	<p>Cyp1a2 5' C UUUUUUUUUU A UACA C 3'</p> <p>miR-186 3' U AGCUU G GAGA AUUCUUU C 5'</p> <p>mfe: -15.9</p>
<p>Igf2 5' U UG CCU CUUU C 3'</p> <p>miR-134 3' U CCCCUCU GGUC CC GUCAU GGGGAGA CCAG CC CAGUG UU U 5'</p> <p>mfe: -30</p>	<p>Igf2 5' G GG U A 3'</p> <p>miR-296-5p 3' UG UA mfe: -34.2 GGA 5'</p>
<p>Ins1 5' U UUCUCUGG CA UUUUUU G 3'</p> <p>miR-134 3' G GGGAGACC GU UGGU CAGUG U 5'</p> <p>mfe: -23.3</p>	<p>Ins2 5' A UU U A 3'</p> <p>miR-142-3p 3' A U CAUCC AUGU 5'</p> <p>mfe: -12</p>
<p>Mup4 5' G CAU C A 3'</p> <p>miR-539 3' ACAUACC GA AA UUCUCC UGUGUGG CU UU AAGAGG UUC A A mfe: -22.3 5'</p>	<p>Mup3 5' A C UCC U UC G 3'</p> <p>miR-134 3' GGGG C U U mfe: -19.4 5'</p>
<p>Mup3 5' A A G AAUCCCG G 3'</p> <p>miR-185 3' A CAG GAA UGC UUCUCUCCA AAGAGAGGU GUC CUU ACG AAGAGAGGU mfe: -30.6 5'</p>	<p>Mup3 5' G A CC CUCUCC A 3'</p> <p>miR-301b 3' A AG AGUGCAAUC GUU AGC UC UCACGUUGG CAG UCG AU UC mfe: -21.8 5'</p>
<p>Mup3 5' C UCU CUGC A 3'</p> <p>miR-539 3' U CAUGCCAAGG GUGAU UCUCUCC GUGUGGUUCC UAUUA AGAGG A mfe: -27.7 5'</p>	<p>Mup3 5' A CAAG GAUCUGCUC U 3'</p> <p>miR-363 3' UUUU UGC GUC UGU UCCACCUAG AGC UAG ACA AGGUGGAC C mfe: -22.7 5'</p>
<p>Mup3 5' A A A 3'</p> <p>miR-15 a 3' ACUCCGUCGUG A mfe: -20.5 5'</p>	<p>Ngp 5' G U C GUGU U 3'</p> <p>miR-149 3' GGGG GUGG AGG UGG GGUCAGA CCCU CACU UCU GCC UCGGUCU GU mfe: -25.8 5'</p>
<p>Ngp 5' U AAA U GC AAG C 3'</p> <p>miR-671-5p 3' G G AG CCCCUCCA GGG CCU AG UC GGGGAGGU CCC GGA GAA 5'</p> <p>mfe: -33.6</p>	

Figura 20 Estrutura molecular de interações entre miRNA-mRNA modulados após o silenciamento de Aire e preditos nos bancos de dados DianaMT, miRanda, miRDB, miRWalk e Targetscan, e suas respectivas energias livres de interação obtidas com o programa RNAhybrid.

6.13 Comparação histológica do timo de camundongos BALB/c e NOD

Visando avaliar se há alteração na organização da estrutura tímica de camundongos não autoimunes (BALB/c) e camundongos autoimunes (NOD), timos de fêmeas desses animais com aproximadamente 5 semanas de idade, foram utilizados na confecção de lâminas histológicas coradas com hematoxilina-eosina.

As imagens de H&E revelam que aparentemente não há alteração na organização da estrutura tímica, ambos os compartimentos, o cortical e o medular, estão preservados nessas duas linhagens (Figura 21).

Figura 21 Comparação histológica do timo de camundongos BALB/c e NOD. Timo de camundongos fêmeas BALB/c ou NOD com 5 semanas de idade. Nota-se que a organização dos compartimentos cortical e medular estão preservados em ambas as linhagens. Coloração H&E, aumento 20 x (c = córtex, m = medula). As barras indicam 100 μ m.

6.14 Modulação da expressão transcricional de autoantígenos específicos de DM1 em células mTEC de camundongos NOD e de BALB/c.

Para avaliar o perfil de expressão gênica em mTECs de camundongos BALB/c e NOD, nós utilizamos RNA provenientes de mTECs dos timos desses animais e posterior hibridizações com *microarrays*.

Dendogramas e heat-maps gerados a partir das análises de *micrarrays* (fold-change $\geq 1,4$) indicam que 15.247 genes de PTAs foram modulados comparando essas duas linhagens. Desses, nós focamos inicialmente no grupo de genes PTAs considerados autoantígenos específicos de DM1 e também aqueles Aire dependentes. Encontramos 6 autoantígenos específicos de DM1 e 14 genes PTAs Aire dependentes (Figura 17).

A Tabela 4 mostra os 6 autoantígenos específicos de DM1 que foram modulados entre mTECs de BALB/c e NOD, dentre eles os genes: *Ins1*, *Ins2*, *Gad1*, *Gad 2* e *Ica1* foram reprimidos, enquanto o gene *IA-2* foi induzido. A Tabela 4 mostra também a localização cromossômica desses autoantígenos e as suas representações teciduais de acordo o banco de dados *BioGPS*.

Em relação aos genes PTAs Aire dependentes, nossos resultados revelaram que que dos 30 PTAs descritos, não apenas o genes *Ins1* e *Ins2* foram diferencialmente expressos, outros 10 genes PTAs foram modulados: três genes foram induzidos, sendo eles: *Casein alpha* (*Csn1s1*), *Casein alpha s2-like A* (*Csn1s2a*) e *Insulin-like growth*

factor II (Igf2); e os outros sete genes incluindo o *Major urinary protein 4* (Mup4), *Cytochrome P450 1a2* (Cyp1a2), *Lactotransferrin* (Ltf), *Prostaglandin D2 synthase* (Ptgds), *Neutrophilic granule protein* (Ngp), *Major urinary protein1*(Mup1), *Major urinary protein1* (Mup3) e *Oxytocin* (Oxt) foram reprimidos (Figura 22).

Figura 22 Comparação dos perfis de expressão transcricional de mTECs de BALB/c e de NOD. Matriz de expressão de autoantígenos específicos de DM1 e de genes PTAs Aire dependentes modulados. A correlação de Pearson foi utilizada como medida de similaridade. O valor de expressão normalizada para cada gene é representado pelas cores: vermelho que indica indução; verde que indica repressão.

Tabela 4. Representação, regulação transcricional e localização cromossômica de autoantígenos específicos de DM1 em células mTECs de camundongos NOD e BALB/c. Os dados foram coletados de hibridizações com *microarrays* (fold-change ≥ 1.4).

Nome (símbolo)	Chr	Representação tecidual	Regulação NOD x BALB/c
<i>Insulin I</i> (Ins1)	19	Pâncreas	reprimido
<i>Insulin II</i> (Ins2)	7	Pâncreas	reprimido
<i>Glutamic acid</i> (Gad1) <i>descaboxilase 1</i>	2	Retina, amígdala, cordão espinhal, cérebro, ilhotas pancreáticas	reprimido
<i>Glutamic acid</i> (Gad2) <i>descarboxilase 2</i>	2	Amígdala, cordão espinhal, cérebro, ilhotas pancreáticas	reprimido
<i>Islet cell</i> (Ica1) <i>autoantigen 1</i>	6	Pâncreas, testículo, cérebro, amígdala, intestino grosso, glândula adrenal, pulmão, glândula lacrimal e glândula salivar	reprimido
<i>Tyrosine</i> (IA-2) <i>phosphatase 1</i>	1	Cérebro, amígdala, hipófise, cordão espinhal	induzido

6.15 Análise da expressão transcricional de autoantígenos específicos de DM1 em mTECs isoladas de timos de camundongos BALB/c comparada com NOD por PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR).

Os dados de *microarrays* foram confirmados por meio de qRT-PCR focando quatro autoantígenos envolvidos no desenvolvimento de DM1 que foram modulados em mTECs de camundongos BALB/c comparadas com mTECs camundongos NOD que são: Ins1, Ins2, Gad1 e Gad2. Entre esses genes avaliados, dois são considerados como Aire dependentes (Ins1 e Ins2).

O perfil de modulação obtido por qRT-PCR, foi comparável com os dados obtidos das análises de microarrays. O resultado mostrado na Figura 23, indica que todos os autoantígenos específicos de DM1 avaliados (Ins1, Ins2, Gad1 e Gad2) foram reprimidos nas mTECs da linhagem autoimune NOD em comparação com as mTECs da linhagem não autoimune, BALB/c.

Figura 23 Confirmação dos dados de *microarrays* por qRT-PCR focando autoantígenos específicos de DM1 em mTECs de camundongo BalB/c e NOD. (Student's t test, $p < 0.05$).

6.16 Comparação da expressão do gene Aire em mTECs de camundongos BALB/c e NOD por PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR).

Observamos que o gene Aire não foi modulado comparando células mTEC das duas linhagens de camundongo estudadas quando utilizamos hibridizações com *microarrays*. Análises por qRT-PCR confirmaram esse resultado (Figura 24).

Figura 24 Avaliação dos níveis transcricionais do gene Aire em mTECs isoladas de timos de camundongos BALB/c e de NOD por PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR). A diferença no nível de expressão não foi significativa entre as duas linhagens de camundongo (Student's t test, $p < 0.05$).

6.17 Avaliação da modulação do gene Aire durante o desenvolvimento de DM1 em camundongos NOD.

Além da análises dos níveis transcricionais de Aire entre mTECs isoladas de timos de camundongos BALB/c e de NOD, avaliamos também os níveis de expressão desse gene durante o processo de desenvolvimento de DM1 na linhagem autoimune NOD.

Comparamos mTECs de camundongos NOD em dois períodos distintos; pré-diabético e diabético. Nossos resultados revelaram que a expressão do gene Aire é modulada entre os períodos avaliados. Durante o período inicial de vida do camundongo NOD, quando ainda estão na fase pré-diabética, com 2-3 semanas de idade, a expressão do gene Aire é mais baixa, aumentando significativamente ainda no período pré-diabético quando atingem 5-6 semanas de idade. Entretanto, durante o período em que esses camundongos já estão diabéticos a expressão de Aire é significativamente reduzida (Figura 25).

Figura 25 Avaliação da modulação da expressão do gene Aire durante o desenvolvimento de DM1 em camundongos NOD. Análises por qRT-PCR revelaram que durante o período inicial de vida do camundongo NOD (pré-diabéticos) a expressão do gene Aire é significativamente baixa, mas durante o período de 5-6 semanas de idade, mas ainda durante o período pré-diabético a expressão desse gene aumenta significativamente. Finalmente, há redução durante o período em que esse camundongo encontra-se diabético (one-way ANOVA, $p < 0.05$)

6.18 Imunolocalização da proteína AIRE no estroma tímico de camundongos NOD e BALB/c

Com a demonstração de que a expressão do gene Aire não se alterou quando comparamos mTECs isoladas de camundongos BALB/c e de NOD, passamos para a avaliação, agora por imunofluorescência, dos níveis da proteína AIRE no timo desses camundongos.

A Figura 26 mostra que os sinais de imunofluorescência da proteína AIRE (em verde) foram notavelmente reduzidos nos núcleos das células mTECs do timo de NOD em comparação com as células mTECs do timo de BALB/c. Além disso, a Figura 27 mostra que a média do número de células mTEC Aire⁺ é aproximadamente três vezes menor no camundongo NOD em relação a BALB/c.

Em conjunto, esses resultados revelam que apesar dos níveis de expressão transcricional do gene Aire em mTECs de camundongos BALB/c e NOD serem equivalentes, a expressão da proteína de AIRE difere entre essas linhagens.

Figura 26 Análises dos sinais de imunofluorescência da proteína Aire no timo de camundongos BALB/c e NOD. Os sinais de imunofluorescência da proteína AIRE foram notavelmente reduzidos nos núcleos das células mTECs do timo de camundongo BALB/c em relação ao timo de camundongo NOD. O núcleo foi corado com DAPI (azul). Aumento 40 x (c = córtex, m = medula).

Figura 27 Número (média) de mTECs AIRE⁺ no estroma tímico de camundongos BALB/c e NOD. A média do número de células mTEC Aire⁺ é aproximadamente três vezes menor no camundongo NOD em relação ao camundongo BALB/c (Student's t test, $p < 0.05$).

Discussão

7. DISCUSSÃO

7.1 Silenciamento do gene Aire

O gene Autoimmune regulator (Aire) o qual no homem é localizado no cromossomo 21q22.3 e no camundongo no cromossomo 10 C1 foi descoberto em 1997, quando evidenciaram que ele representava o locus de suscetibilidade a uma doença autoimune humana multiorgânica; a poliendocrinopatia autoimune tipo I (APECED), que é desencadeada principalmente por mutações nesse gene (AALTONEN et al., 1997; NAGAMINE et al., 1997). Nesse intervalo de 16 anos, tornou-se cada vez mais evidente que o estudo da APECED proporcionou o aumento do conhecimento em um dos processos mais fundamentais do sistema imune, a estabilidade e manutenção da tolerância imunológica aos antígenos próprios.

Estudos utilizando animais modelos de APECED revelaram que Aire, tem um papel importante na indução da tolerância de células T no timo, principalmente promovendo nas células tímicas epiteliais medulares (mTECs) a expressão ectópica de uma grande variedade de transcritos que codificam proteínas, que normalmente são expressas em diferentes tecidos e órgãos periféricos, chamados de antígenos de tecidos periféricos (PTAs). Essa expressão ectópica de PTAs nas mTECS é chamada de expressão gênica promíscua (PGE) e é parcialmente controlada por Aire (KYEWSKI & DERBINSKI, 2004).

Com isso, ficou ainda mais claro que uma das propriedades mais notáveis do sistema imunológico é a capacidade de distinguir antígenos próprios de antígenos não-próprios, estabelecendo a tolerância imunológica. Muitas doenças autoimunes são relacionadas à falhas na tolerância central, que envolve o processo de seleção tímica das células T, onde o desbalanço na expressão de antígenos e/ou a resposta das células T a eles podem afetar esse mecanismo, culminando com respostas autoimunes agressivas na periferia. A tolerância do repertório de células T ao próprio é adquirida durante a seleção negativa dos mesmos no timo, onde ocorre à interação dos receptores de antígenos (TCR) das células T aos peptídeos ligados ao complexo maior de histocompatibilidade (MHC) e, por isso a diversidade de PTAs expressos no timo é de grande importância (TAKAHAMA, 2006; FERGUSON et al., 2008; ANIGUCHI & ANDERSON, 2011).

Os timócitos que reagem fracamente com o complexo MHC-II-peptídeo próprio, amadurecem em células T simples positivas (SP) CD4⁺ ou CD8⁺ e são direcionadas para a corrente sanguínea ou vasos linfáticos para desempenharem suas funções efetoras na periferia (GOLDRATH & BEVAN, 1999; MATHIS & BENOIST, 2009).

Estudos utilizando camundongos têm permitido uma vasta dissecação dos mecanismos de ação de Aire. Primeiramente foi demonstrado que esse gene é expresso principalmente nos órgãos linfoides, especialmente no timo, e dentro do timo principalmente pelas células mTEC mas também nas células dendríticas em baixos níveis (ANDERSON et al., 2002; ANDERSON et al., 2005).

O papel funcional de Aire foi demonstrado por estudos realizados utilizando camundongos modelos que são Aire *knock-out* (KO) e/ou Aire-deficientes, esses camundongos desenvolvem uma síndrome autoimune relativamente suave com uma hiperatividade de células T, produção de autoanticorpos órgão-específicos, infiltrado linfocítico, além de outras anomalias. Tais observações foram importantes para se deduzir a função de Aire na regulação da homeostase imunológica prevenindo reações autoimunes agressivas e o aparecimento de doenças autoimunes (ANDERSON et al., 2002; RAMSEY et al., 2002; KURODA et al., 2005).

Anderson et al (2002), demonstraram também que nos camundongos Aire-KO, diversos genes de PTAs tiveram sua expressão modulada e, por isso, são referidos como genes Aire dependentes. Outros genes de PTAs como não foram influenciados por Aire e são considerados Aire-independentes. Além disso, Aire pode controlar tanto positivamente como negativamente a expressão de PTAs em mTECs (KYEWSKI et al., 2002; GALLEGOS & BEVAN, 2006; TIKOCINSKI et al., 2008; MATHIS & BENOIST, 2007, 2009; TANIGUSHI & ANDERSON, 2011)

Além disso, estudos utilizando camundongos heterozigotos com Aire-KO (Aire^{+/}) demonstraram a dependência da expressão dos genes PTAs com a dosagem de Aire (LISTON et al., 2004; KONT et al., 2008). A expressão de Aire e manifestação de doenças autoimunes em camundongos também pode ser afetada pelo *background* genético; onde camundongos NOD deficientes de Aire desenvolvem pancreatite exócrina grave, a qual não é observada em camundongos C57BL/6 ou BALB/c mice deficientes de Aire. Mecanismos epigenéticos ou estocásticos podem implicar nessa variabilidade (JIANG et al., 2005; TYKOCINSKI et al., 2008).

Nosso grupo de pesquisa demonstrou que a expressão do gene Aire no estroma tímico de camundongos NOD varia com a idade e com a emergência do DM1. A

diminuição da expressão desse gene em animais jovens, considerados pré-diabéticos precede o aparecimento posterior de DM1 nesses animais adultos. Além disso, PTAs relacionados com o DM1, incluindo *Ins2* e o *Gad1*, no qual estão envolvidos na seleção negativa de timócitos autoreativos que reconhecem antígenos pancreáticos no timo, foram reprimidos ao longo do desenvolvimento dessa doença (FORNARI et al., 2010).

Apesar destes resultados, mostrarem a importância da expressão de Aire na indução da tolerância central, a relação entre as variações transitórias da expressão de Aire sobre a expressão dos níveis transcricionais dos genes PTAs continua sendo mal compreendida. Camundongos Aire-KO não expressam Aire no timo em nenhum momento da vida, assim esse modelo não pode representar adequadamente as consequências de alterações leves ou transitórias de Aire (FORNARI et al., 2010, OLIVEIRA et al., 2013).

Dessa forma, os dados relatados anteriormente nos levaram a formular a nossa primeira hipótese de que não só as mutações no gene Aire ou o sistema modelo Aire-KO, suprimem totalmente a função de Aire, mas também variações na expressão desse gene podem perturbar a expressão de genes PTAs e miRNAs no timo.

Para avaliar a nossa hipótese, utilizamos o processo de eletrotransfecção de siRNA anti-Aire *in vivo* no timo, para induzir alterações transitórias nos níveis do mRNA do gene Aire em camundongos BALB/c e em seguida avaliamos as consequências de alterações transitórias desse gene na expressão de genes PTAs e miRNAs no timo.

A interferência por RNAi é conhecida como uma ferramenta poderosa de *knock-down* gênico, isto é, permite elevado grau de inativação dos alvos (90 a 99% em estudos *in vitro*), mas não total, como observado em ferramentas de *knockout*. A RNAi é uma técnica simples que aproveita-se de um mecanismo biológico pré-existente no organismo: a via de silenciamento gênico pós-transcricional. Essa técnica é baseada na utilização de moléculas dupla fita de RNA (*double stranded RNA molecules- dsRNA*) ou siRNA, que promovem o silenciamento de mRNAs alvos e permite a identificação da função gênica (FIRE et al., 1998).

As moléculas de siRNA possuem aproximadamente 21-23 pares de bases, quando inseridas artificialmente nas células, são incorporadas no complexo RISC, que posteriormente interage com o mRNA homólogo por complementaridade de sequência, resultando na degradação do mRNA alvo e consequentemente redução da produção da proteína (CULLEN & ARNDT, 2005).

A utilização de siRNA tem sido uma escolha atrativa para futuras finalidades terapêuticas de inúmeras doenças causadas por um ou mais genes. Dessa forma, existem vários trabalhos mostrando formas alternativas de entrega de siRNA às células, dentre elas se destaca o processo de eletroporação, que foi utilizado neste trabalho (AIGNER, 2006, 2007).

O processo de eletroporação é um método seguro que requer a transferência direta de moléculas para o citoplasma, evitando interação com alvos inespecíficos que estão associados com as vias de incorporação celular (HEIDEL et al., 2004). Pulsos elétricos são frequentemente utilizados para abertura de poros na membrana celular permitindo a captação de drogas, siRNA e plasmídios dentro de tecidos e órgãos (LI, 2004; WELLS, 2004; GOLZIO et al., 2007). Em roedores pulsos elétricos têm sido utilizados para a entrega de siRNA em vários órgãos, como a pele (ZANG et al., 2002), olhos (MATSUDA & CEPKO, 2004), cérebro (AKANEYA et al., 2005), músculos (GOLZIO et al., 2005), timo (IRLA et al., 2008) entre outros.

A eletroporação oferece várias vantagens específicas, como por exemplo: pulsos e parâmetros são totalmente controláveis e poucos efeitos colaterais foram relatados com a utilização desse método (PAGANIN-GIOANNI et al., 2008).

Por meio de microscopia fluorescente demonstramos pela primeira vez que o processo de electrotransfecção *in vivo* é um método eficiente que permite a entrada e absorção do siRNA no timo, tanto a nível citoplasmático quanto a nível nuclear (Figura 7b). Análises histológicas (H&E) revelaram que o processo de eletrotransfecção *in vivo* no timo, não afeta a estrutura desse órgão, uma vez que ambos compartimentos cortical e medular foram preservados após esse processo (Figura 8).

A utilização de siRNA leva não apenas ao silenciamento gênico pós-transcricional (clivagem de mRNAs), mas também ao silenciamento gênico transcricional (KAWASAKI & TAIRA, 2004; MORRIS et al., 2004). Dessa forma, após a confirmação de que o processo de eletrotransfecção *in vivo* no timo é eficiente para permitir a entrada de siRNA, partimos para a otimização do silenciamento do gene Aire por esse processo.

Os resultados relevaram que o pico de silenciamento de Aire no estroma tímico, correspondente a 59% e ocorreu 48 horas após o processo de eletrotransfecção de siRNA anti-Aire na concentração de 5 mM de siRNA por lóbulo tímico. Como todo processo de silenciamento gênico, nosso sistema modelo foi parcial e transitório e, o nível transcricional deste gene foi totalmente restaurado 72 horas após a

eletrotransfecção. Dada sua especificidade (vide resultados de experimentos com siRNA irrelevante) e ao caráter transitório, esse sistema modelo passou a ser adequado para tentar responder às nossas questões (Figuras 9 e 10).

Além disso, os resultados obtidos demonstraram que o silenciamento do gene Aire afetou a medula tímica, ou seja, exatamente o compartimento que nos interessava. Experimentos para verificar isso, mostraram que as células mTEC isoladas a partir de timos submetidos a electrotransfecção de siRNA anti-Aire apresentaram uma redução na expressão desse gene correspondente a 63% (Figura 11).

Nossos resultados revelaram também que o silenciamento gênico ocorreu a nível pós-transcricional, havendo uma redução da expressão da proteína AIRE nos estromas tímicos submetidos ao processo de silenciamento (Figura 12).

7.2 Análise da expressão de mRNAs de PTAs diferencialmente expressos sob silenciamento de Aire

Considerando que Aire é um controlador transcricional na PGE, podendo controlar tanto positivamente como negativamente a expressão de PTAs, nosso passo seguinte foi avaliar os perfis transcricionais de mRNAs de PTAs diferencialmente expressos em mTECs submetidas ao silenciamento desse gene *in vivo* no timo, focando em PTAs Aire dependentes.

Das quase 44.000 sequências analisadas neste trabalho pela tecnologia de *microarrays*, 4.394 foram moduladas sob silenciamento de Aire. Do grupo dos PTAs considerados como Aire dependentes, apenas 10 foram modulados em nossos experimentos, ou seja, 9 genes foram induzidos (Col2a1, Cyp1a2, Igf2, Ins1, Ins1, Ins2, Mup1, Mup3, Mup4, Spt1) e 1 gene (Ngp) teve a expressão reprimida sob silenciamento de Aire, sugerindo que a sua expressão é estritamente dependente de Aire (Tabela 1).

À primeira vista, esses resultados nos pareceram contraditórios já que Aire é considerado um regulador positivo da expressão desses PTAs e que a expressão dos mesmos foi descrita como sendo substancialmente reprimida em mTECs provenientes de camundongos KO Aire^{-/-} (ANDERSON et al., 2002). Além disso, corroborando com esses dados, um trabalho realizado em nosso grupo também demonstrou que numa linhagem de células mTEC (linhagem mTEC 3.10 que é mantida em cultura), a

expressão dos PTAs Aire dependentes foi reduzida após o silenciamento de Aire (MACEDO et al., 2009).

Nos ensaios de silenciamento de Aire utilizando a linhagem mTEC 3.10, o nível de redução da expressão de Aire obtido foi de aproximadamente 90% (MACEDO et al., 2009). Em nossas mãos apesar de realizarmos vários ensaios de silenciamento com essa linhagem foi impossível obtermos um silenciamento que se aproximasse a esse nível.

Porém esses resultados mostram que tanto o silenciamento de Aire *in vivo* quanto *in vitro*, modulam a expressão de PTAs. O fato das mTECs no ensaio de silenciamento *in vivo* terem sido obtidas de camundongos BALB/c e as células mTEC 3.10 dos experimentos conduzidos *in vitro* terem sido obtidas de camundongos da linhagem C57BL/6 mostram que a modulação dos PTAs pode ser afetadas pelo *background* genético (JIANG et al., 2005; TYKOCINSKI et al., 2008).

Além do mais, AIRE é considerada uma proteína altamente colaborativa, sendo encontrada em corpos nucleares em associação a um conjunto de proteínas conhecidas como parceiras de Aire, incluindo a CBP, DNA-PK e P-TEFB. Dessa forma, para que Aire atue como ativador transcricional fazendo com que a RNA polimerase II (RNA Pol II) continue a transcrição de genes PTAs ao longo da cromatina (FERGUSON, et al., 2008; GIRAUD et al., 2012; RAMSEY et al., 2002), ela tem que estar associada à suas parceiras. Dessa forma, integrando nossos resultados nesse contexto, a nossa visão é que a redução dos níveis de expressão de Aire possa fazer com que essas proteínas parceiras de Aire ativem mecanismos compensatórios envolvidos na expressão desses PTAs.

Um fato interessante observado nos nossos resultados, é que fomos capazes de reproduzir através do silenciamento de Aire *in vivo* no timo, o desequilíbrio na expressão de genes PTAs semelhante ao que ocorre no timo de camundongos NOD durante o desenvolvimento de DM1. Camundongos NOD jovens, ainda no estágio de pré-diabéticos exibem baixos níveis do gene Aire no timo e como consequência, os níveis de expressão de genes PTAs foram induzidos (FORNARI et al., de 2010).

Portanto, esses resultados demonstraram que o silenciamento parcial e transitório do gene Aire é suficiente para afetar a expressão de genes PTAs Aire dependentes, revelando que não somente as mutações, mas também variações nos níveis transcricionais de Aire afetam a expressão de PTAs. Esses dados foram obtidos durante a realização desta Tese e já foram publicados na revista internacional *Immunobiology* (OLIVEIRA et al., 2013).

7.3 Influência de Aire na expressão de microRNAs

A descoberta dos microRNAs (miRNAs) representou um passo importante para na pesquisa do controle da expressão gênica. Esses pequenos RNAs não codificantes são potentes reguladores pós-transcricionais e estão envolvidos nos mais diversos processos fisiológicos, inclusive a regulação da resposta imune (BAUMJOHANN & ANSEL, 2013).

Em 2004, com a identificação dos microRNAs miR-142-a, miR-181a e miR-223 em linfócitos B e células mieloides demonstraram pela primeira vez que miRNAs poderiam atuar na regulação da resposta imune (CHEN et al., 2004). Desde então, o papel dos miRNAs na regulação dos processos de maturação, proliferação, diferenciação e ativação passou a ser melhor estudada. Tornando-se evidente que a expressão dos miRNAs está diretamente envolvida na manutenção da homeostase imunológica. Dessa forma, a expressão desregulada dos miRNAs têm sido relacionada com a indução da autoimunidade (CERIBELLI et al., 2012)

A expressão gênica promíscua no timo (PGE) é regulada em múltiplos níveis (MATHIS & BENOIST, 2009; DERBINSKI et al., 2005; ORG et al., 2008; KOH et al., 2008; TYKOCINSKI et al., 2010; ABRAMSON et al., 2010; GIRAUD et al., 2012). Além do controle transcricional exercido por Aire, mecanismos epigenéticos e regulação pós-transcricional têm sido relacionados com o controle da PGE (DERBINSKI et al., 2005; TYKOCINSKI et al., 2010; UCAR et al., 2013).

Considerado resultados prévios de nosso grupo (MACEDO et al., 2013), em cujo trabalho os autores demonstraram que Aire também controla a expressão de miRNAs num sistema *in vitro* de células mTEC 3.10, um dos objetivos do presente trabalho foi avaliar os perfis de expressão de miRNAs sob a influência do silenciamento do gene Aire *in vivo* no timo. Além disso, tentamos reconstruir redes de interação entre os miRNAs e os seus possíveis mRNAs alvos, explorando assim o controle pós-transcricional da PGE.

Nossos resultados, evidenciaram que 87 miRNAs foram diferencialmente expressos em mTECs sob influência do silenciamento do gene Aire, sendo 44 induzidos e 43 reprimidos (Figura 15). Estes resultados sugerem fortemente que estes miRNAs modulados sejam controlados por Aire *in vivo*.

Recentemente, foi demonstrado que Aire ativa a transcrição ectópica de PTAs não através do reconhecimento de sítios específicos de ligação às regiões promotoras,

mas através da liberação da RNA Pol II ligada a sítios específicos T-boxes (TTATTA) e G-boxes (ATTGGTTA) que se encontram nas regiões promotoras dos PTAs (GIRAUD et al., 2012). Baseado nessas evidências, nós localizamos o posicionamento dos sítios T-box e G-box de ligação da RNA Pol II nos genes de miRNAs. Somente 73 genes de miRNAs foram incluídos nesta análise, pois os demais não estão com suas sequências genômicas disponíveis no banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide>). Todos os 73 genes de miRNAs analisados apresentaram um ou ambos sítios de ligação da RNA Pol II em suas sequências (Figura 16). Esses resultados reforçam a evidência de que a expressão desses miRNAs pode ser controlada por Aire. Esses resultados são consistentes com os resultados obtidos por WANG e colaboradores (2010) que demonstraram que a expressão de miRNAs pode ser ativada ou reprimida pela ação de fatores de transcrição.

A primeira relação funcional entre PGE e miRNAs, foi evidenciada em um trabalho realizado no nosso grupo de pesquisa, onde foi demonstrado que 30 miRNAs foram diferencialmente expressos na linhagem mTEC 3.10, sendo 18 induzidos e 12 reprimidos (MACEDO et al., 2013). Esses miRNAs foram então considerados Aire dependentes em ensaios *in vitro*. Mas apenas 6 desses 30 miRNAs apareceram em nossos dados de *microarrays*. Dentre eles os miR-10b e miR-30e* que foram induzidos; o miR142-3p foi reprimido. Enquanto os miR-425 e miR-338-3p foram reprimidos *in vivo* e induzidos *in vitro*; já o miR-297 foi induzido *in vivo* e reprimido *in vitro*.

Esses resultados mostram que a maioria dos miRNAs que são dependentes de Aire em ensaios realizados *in vitro* em cultura, não foram diferencialmente expressos em mTECs provenientes de ensaio de silenciamento *in vivo* no timo. Essa discrepância observada entre mTECs em cultura e mTECs provenientes de tecido fresco é esperada uma vez que Aire regula expressão de diferentes grupos de genes dependendo do contexto celular (CHEN et al., 2004; SILLANPAA et al., 2004; GUERAU-DE-ARELLANO et al., 2008).

Nossos dados também evidenciaram que 5 miRNAs diferencialmente expressos sob silenciamento de Aire no timo de camundongos BALB/c, também foram diferencialmente expressos em mTECs maduras (CD80⁺/MHC-II⁺) de camundongos C57BL/6 (UCAR et al., 2013). O miR-206 e o miR-10b foram induzidos em ambas análises, já o miR-181c e o miR-363 foram reprimidos. Apenas o miR-15a* teve a

modulação inversa, sendo induzido em nosso sistema modelo e reprimidos no sistema modelo de Ucar e colaboradores.

A interdependência de Aire e miRNAs, foi evidenciada recentemente por Macedo et al (2013), e Ucar et al (2013). No estudo realizado por Ucar utilizando mTECs provenientes de camundongos e humanos, os autores chegaram a um grande número de evidências, dentre elas: miRNAs são dinamicamente regulados durante a diferenciação das células mTEC; a expressão de miRNAs em TECs está sobre o controle de Aire; a falta de miRNAs maduros nas TECs afeta globalmente a PGE e a expressão de Aire; a ausência miR-29a afeta seletivamente PTAs Aire dependentes; a ausência de miRNAs maduros nas TECs afeta os níveis de expressão dos marcadores de maturação das mTECs, CD80⁺/MHC-II⁺.

Nosso estudo contribui com o conhecimento nesta área acerca do papel nos miRNAs no timo, revelando aqueles miRNAs Aire dependentes. Além do mais, resultados publicados por outros grupos de pesquisa corroboram com a nossa hipótese: variações transitórias na expressão de Aire no timo pode acarretar a desregulação não só de mRNAs que codificam PTAs, mas também de miRNAs que estão envolvidos no controle pós-transcricional da PGE.

7.4 Análise das redes de interação miRNA-mRNA

Desde que os primeiros miRNAs foram descobertos, foi demonstrado que para que a sua função seja exercida no controle pós-transcricional, é necessário que ocorra o pareamento (perfeito ou imperfeito) dos miRNAs com a região 3'UTR do seu mRNA alvo. O pareamento imperfeito ainda assim requer hibridização da região que começa no nucleotídeo 2 e vai até o 7 da extremidade 5' do miRNA. Essa região é denominada de região *seed*, e um aspecto importante é o pareamento contínuo e perfeito dessa região com seu mensageiro alvo (BARTEL et al., 2009). Já foram descritos casos de interação na região 5' UTR do mRNA alvo, ou em regiões codificantes do gene, o que resulta em fraca repressão gênica e um aumento da tradução (OROM et al., 2008). Isso implica em algumas consequências relacionadas à investigação dos alvos, já que grande parte dos algoritmos e programas computacionais se baseiam na região 3'UTR do mRNA.

Dessa forma, a identificação de interação miRNA-mRNA bem definidas é de grande importância para a compreensão do controle pós-transcricional. Assim, um dos objetivos do nosso estudo foi reconstruir redes de interação entre miRNA e seus

potenciais mRNA alvos, modulados sob silenciamento de Aire, com o intuito de avaliar o perfil do controle pós-transcricional na PGE.

Para este estudo, foram considerados 4.394 mRNAs e 87 miRNAs modulados sob silenciamento de Aire. Para reconstrução das redes de interação utilizamos o programa GenMiR⁺⁺ que é um modelo Bayesiano que identifica interações miRNA-mRNA baseado não só na complementariedade, mas também nos valores de expressão obtidos por hibridização com *microarrays* (HUANG et al., 2007). O algoritmo GenMiR⁺⁺ aliado ao programa Cytoscape, foram utilizados para construção das redes.

O perfil das redes de interação de miRNA-mRNAs de mTECs controle e Aire silenciadas não apresentaram similaridades entre si (Figuras 17 e 18). Além disso, o silenciamento de Aire também alterou o perfil de representação tecidual dos mRNA de PTAs expressos em mTECs (Figura 19), mostrando o quanto a PGE é alterada ao perturbarmos a expressão de Aire.

Na rede de interação controle apenas miRNAs da família let-7 interagiram com os seus respectivos mRNAs alvos. miRNAs da família let-7 estão associados com a regulação do sistema imune, participam de processos envolvidos na diferenciação de células tronco, ativação de células T e de receptores tipo Toll 7, sendo associados também à processos de neurodegeneração (CHEN, X. M et al., 2007). Além disso, miRNAs da família let-7 têm sido considerados biomarcadores de estadiamento da doença autoimune esclerose múltipla (GANDHI et al., 2013). A desregulação desses miRNAs está associada com a doença autoimune miastenia gravis, sendo encontrados em baixos níveis em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de pacientes com essa doença (JIANG et al., 2012).

Na rede de interação miRNA-mRNA controle, a única interação predita em bancos de dados foi a interação do miRNA let-7a com o mRNA Hmga2. Essa interação está predita nos bancos de dados DIANAmT, miRanda, miRDB, miRWalk e Targetscan.

A rede de interação formada entre miRNA-mRNA diferencialmente expressos em mTECs sob silenciamento de Aire, é composta por miRNAs de múltiplas famílias que interagem com um grupo menor de mRNAs alvos. Da mesma maneira como na rede controle, a única interação predita em bancos de dados foi a interação entre o miRNA 378 e mRNA do gene Prpsap1. Essa interação também foi predita nos bancos de dados DIANAmT, miRanda, miRDB, miRWalk e Targetscan.

Dentre os miRNAs encontrados nas redes de interação de mTECs Aire-silenciadas, o miR-142-3p foi reprimido sob silenciamento de Aire. Este miRNA já foi considerado um biomarcador da doença autoimune lúpus eritematoso sistêmico e a sua repressão tem sido associada à ativação de células T CD4⁺ e células B (CARLSEN et al., 2013; DING et al., 2012). A expressão aberrante do miRNA-142-3p também foi encontrada em PBMC de pacientes com esclerose múltipla (WASCHBISCH et al., 2011). Já o miR-15a* tem sido associado com as doenças autoimunes artrite reumatoide, lúpus e esclerose múltipla (CHATZIKYRIAKIDOU et al., 2012; YUAN et al., 2012; LORENZI et al., 2012).

Esses miRNAs modulados no timo têm sido relacionados à processos imunes e desencadeamento de doenças autoimunes na periferia. Assim, a contribuição do nosso trabalho é que demonstramos pela primeira vez o controle pós-transcricional exercido por esses miRNAs Aire dependentes sobre a PGE.

Um fato intrigante foi observado nas redes de interação miRNA-mRNA controle e Aire silenciadas: PTAs considerados como Aire dependentes por Anderson et al (2002) , não se associam com miRNAs, entretanto outros mRNAs que codificam PTAs participam das redes de interação com miRNAs. Baseado nesses resultados, realizamos uma busca em bancos de dados de predição de interação de miRNA-mRNA (DianaMT, miRanda, miRDB, miRWalk e Targetscan) para avaliarmos se miRNAs modulados por Aire (Tabela 2) poderiam atuar no controle pós-transcricional desses PTAs.

Os resultados obtidos nos bancos de predição de interação miRNA-mRNA, revelaram que 8 PTAs Aire dependentes podem ser regulados pós-transcionalmente por miRNAs também regulados por Aire (Tabela 3). Assim, esses resultados mostram que de acordo bancos de predição, existe possibilidade de interação entre esses miRNAs com PTAs Aire dependentes.

Porém, um fato a ser considerado é que a predição de interação entre miRNAs-mRNAs nesses bancos de dados leva em consideração apenas o pareamento de sequência entre os miRNAs e mRNAs alvos.

O programa GenMiR⁺⁺ utilizado nas nossas análises identifica interações miRNA-mRNA baseado não na sequência, mas sim nos valores de expressão obtidos por dados de *microarrays* (HUANG et al., 2007). Isso foi muito importante na escolha do programa de reconstrução de redes pós-transcricionais em nossa Tese.

Dessa forma, apesar de existir interações preditas nos bancos de dados entre os miRNAs-mRNAs Aire dependentes mas que não estiveram presentes nas redes de

interação reconstruídas neste trabalho, este é um fato que ainda nos intriga, já que, um aspecto importante que deve ser levado em consideração são os fatores envolvidos no contexto celular, como a associação de proteínas de interação ao RNA, e a possível estrutura 3D do RNA. A grande maioria dos programas computacionais de predição não leva em consideração esses fatores, que pode influenciar na ligação dos miRNAs preditos.

Por isso, concluímos que os bancos de dados que mostram interações com miRNAs (as chamadas predições) representam na realidade um ponto de partida, mas devemos analisar experimentalmente as interações, caso a caso em cada sistema modelo.

Portanto, baseados nesses resultados, a nossa hipótese para tentar explicar a falta de interação dos mRNAs de PTAs Aire dependentes é que possa haver alterações nas sequências que compreendem as regiões 3'UTR desses PTAs que dificultariam de alguma forma a hibridização com miRNAs.

7.5 Comparação do perfil transcricional de Aire e de autoantígenos relacionados ao DM1 em mTECs de camundongos BALB/c e NOD.

O diabetes mellitus tipo 1 (DM-1) é uma doença autoimune de origem multigênica com alterações metabólicas sistêmicas causadas pelo acúmulo de glicose no sangue. Essa doença é semelhante em humanos e no camundongo *non obese diabetic* (NOD), incluindo a presença de autoanticorpos específicos contra células β pancreáticas e células T $CD4^+$ ou $CD8^+$ que medeiam a destruição das células β (ADA, 2011; ALBERTI & ZIMMET, 1998) Essa fase ocorre em cerca de 80-90 % dos camundongos NOD fêmeas, e é denominada de período pré-diabético. Além disso, camundongos NOD apresentam sintenia de grupos de ligação (*linkage*) com regiões de cromossomos humanos (ATKINSON & LEITER, 1999; ANDERSON & BLUESTONE, 2005).

Durante essa fase inicial em que as células β pancreáticas são destruídas ocorrem lesões conhecidas como insulite envolvendo além de células T $CD4^+$ ou $CD8^+$ e células B, as células dendríticas e macrófagos, seguida pela fase diabética propriamente dita, com a progressiva destruição das células β , acarretando deficiência na produção de insulina e consequentemente o aumento de glicose no sangue (CÔRTE-REAL et al., 2009; LEHUEN et al., 2010). Esse é um processo progressivo que pode durar em torno

de 20 semanas em camundongos NOD ou alguns anos em humanos (REGNAULT et al., 2009).

Camundongos NOD representam um modelo ideal para o estudo do DM-1 e/ou estudos que envolvem o desbalanço da tolerância central para autoantígenos que estão envolvidos relacionados ao desenvolvimento de DM-1 (CASTANO et al., 1990; ATKINSON & LEITER, 1999; ANDERSON & BLUESTONE, 2005).

Dentre os autoantígenos envolvidos no desenvolvimento do DM1, a insulina é considerada o autoantígeno primário tanto em humanos como em camundongos NOD, com seu gene contribuindo significativamente para o risco da doença (WALDRON-LYNCH & HEROLD, 2011). Além da insulina, Gad1, Gad2, ICA-1 e IA-2 são também considerados autoantígenos principais do DM1 (CSORBA et al., 2010).

O controle da autoimunidade agressiva órgão-específica é atribuído à eficiência da seleção negativa de células T autoreativas, que ocorre no timo envolvendo as mTECs. Essas células expressam um grande grupo de antígenos de tecidos periféricos (PTAs) que representam os diversos tecidos e órgãos do corpo. Esse processo peculiar chamado de expressão gênica promíscua (PGE) é parcialmente controlada por Aire (DERBINSKI et al., 2001, 2005; KYEWSKI et al., 2002; KYEWSKI & DERBINSKI, 2004; GALLEGOS & BEVAN, 2006; MAGALHÃES et al., 2006; MATHIS & BENOIST, 2009).

Dessa forma, a nossa hipótese é que a expressão balanceada de genes como Aire e/ou PTAs nas mTECs, é fundamental para a integridade da tolerância central, e que o desbalanço desses genes, pode contribuir com a suscetibilidade ao diabetes mellitus tipo 1.

Para analisar a nossa hipótese, comparamos os perfis de expressão gênica de PTAs de células mTECs de camundongos NOD na fase pré-diabética (aproximadamente 5 semanas de idade) e mTECs de camundongos BALB/c com a mesma idade, focando em autoantígenos relacionados ao DM1, através do uso da tecnologia de *microarrays*.

Inicialmente, nós avaliamos a estrutura tímica desses dois camundongos através de análises histológicas. As imagens de H&E revelam que aparentemente não há nenhuma alteração na organização da estrutura tímica dessas duas linhagens, ambos os compartimentos cortical e medular são igualmente preservados nessa fase da vida desses animais (Figura 21).

A análise comparativa dos transcriptoma das mTECs de camundongos BALB/c

e NOD, revelaram que a os autoantígenos relacionados ao DM1 apresentam níveis de expressão opostos nessas duas linhagens, visto que, a expressão dos autoantígenos Ins1, Ins2, Gad1, Gad 2 e Ica1 foram induzidos em camundongos BALB/c e reprimidos em camundongos NOD. Apenas a expressão do autoantígeno IA-2 foi induzida em NOD comparado com o camundongo BALB/c (Figura 22).

Os dados de qRT-PCR confirmaram os dados de *microarrays*, mostrando que os níveis transcricionais dos autoantígenos Ins1, Ins2, Gad1 e Ga1 estão desbalanceados, reprimidos em camundongos NOD durante o período pré-diabético (Figura 23). Esses autoantígenos são expressos na periferia pelas células β pancreáticas e são considerados alvos iniciais de destruição pelas células T autoreativas (LIBERMAN & DILORENZO, 2003).

Considerando o fato de que Aire é um controlador transcricional da PGE, nós também avaliamos a expressão desse gene nessas duas linhagens de camundongos. Nossos resultados revelaram que apesar da expressão desses autoantígenos terem modulação oposta nessas duas linhagens, a expressão de Aire é equivalente em mTEC dos camundongos NOD e BALB/c nessa etapa da vida (Figura 24).

Apesar dos níveis transcricionais de Aire serem equivalentes em mTECs de camundongos NOD e BALB/c, a expressão dos autoantígenos relacionados com DM1 e de 10 PTAs Aire dependentes (Csn1s1, Csn1s2a, Igf2, Mup4, Cyp1a2, Ltf, Ptgs, Ngp, Mup1 e Oxt) foram moduladas entre essas duas linhagens. Desde modo, esses resultados nos levaram a pensar na existência de mecanismos regulatórios que atenuem a ação de Aire em mTECs de camundongos NOD.

Para confirmar essa nossa hipótese, avaliamos a expressão da proteína AIRE por meio de análises de imunofluorescência. Nossos resultados revelaram que a expressão da proteína AIRE é notavelmente reduzida nos núcleos das células mTECs do timo de camundongos NOD em comparação com as células mTECs do timo de BALB/c (Figura 26).

Portanto, esses resultados nos conduzem a conclusão de que apesar dos níveis transcricionais de Aire serem iguais em mTECs de camundongos NOD e BALB/c, existem miRNAs que atuam no controle pós-transcricional de Aire, degradando o seu mRNA e consequentemente reduzindo os seus níveis protéicos, desencadeando assim o desbalanço do controle da tolerância central no timo de camundongos NOD, suscetíveis a desenvolver DM1. Um trabalho recente, demonstrou que o miR-220b atua sobre Aire em linfócitos humanos (MATSUO et al., 2013). Além disso, o *knockout* condicional de

Dicer revelou que a ausência específica de miRNAs em células TEC, resulta em uma progressiva redução da expressão de Aire e de PGE no timo (UCAR et al., 2013).

Outro achado interessante do nosso trabalho, revelou que a expressão de Aire durante o desenvolvimento do DM1 em camundongo NOD é maior justamente no período pré-diabético (5 semanas de idade) (Figura 25). Além disso, observamos que os níveis de expressão tanto dos autoantígenos Aire dependentes quanto dos Aire-independentes foram inversamente proporcionais ao nível de expressão de Aire.

Levando em consideração os resultados comparativos da expressão transcricional de Aire em mTECs de camundongos NOD no período pré-diabético e diabético, concluímos que esses camundongos apresentam uma falha temporariamente coordenada na expressão de genes implicados no controle da tolerância central, que leva a uma seleção ineficiente das células T autoreativas, contribuindo com ataques autoimunes aos autoantígenos na periferia (GEENEN, 2012).

Desde o início da vida fetal, o timo desempenha um papel importante no estabelecimento da tolerância central a antígenos próprios incluindo os relacionados ao DM1. A disfunção tímica, bem como os níveis alterados da expressão dos genes da insulina no timo (KISHIMOTO & SPRENT, 2001; ZUCHELLI et al., 2005; CHENTOUFI & POLYCHONAKOS, 2002; ZUCHELLI et al., 2005;) têm sido associados com o desbalanço da tolerância central, promovendo um contínuo enriquecimento do repertório de células T autoreativas na periferia, assim como a diminuição da seleção de células específicas nTreg.

Os resultados obtidos nessa etapa do trabalho confirmaram a nossa hipótese de que existe um desbalanço na PGE de mTECs de camundongos suscetíveis a desenvolver DM1, incluindo os autoantígenos β pancreáticos que são alvos das células T autoreativas. Além do mais, a proteína Aire controladora transcricional da PGE encontra-se em baixos níveis em células mTECs de camundongos NOD. Esses resultados sugerem a participação de miRNAs no controle pós-transcricional de Aire.

Conclusões

8. CONCLUSÕES

- Nosso trabalho demonstrou pela primeira vez que o processo de eletrotransfecção de siRNA anti-Aire *in vivo* no timo é um método eficiente e específico, para o silenciamento funcional de Aire. Dessa forma, esses resultados abrem perspectivas para estudos funcionais de genes envolvidos na tolerância imunológica, manipulando timos intactos.
- Evidenciamos que não só as mutações no gene Aire ou o sistema modelo Aire-KO, suprimem a função de Aire, mas que também as variações transitórias na expressão desse gene são suficientes para afetar a expressão de genes PTAs Aire dependentes.
- Demonstramos que o silenciamento de Aire *in vivo* no timo de camundongos não autoimunes (BALB/c), mimetiza o perfil de expressão de Aire e de genes PTAs durante o desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 1 em camundongos autoimunes NOD.
- Além disso, variações transitórias na expressão de Aire, acarreta também a modulação de miRNAs, sugerindo que esses miRNAs modulados sejam controlados e dependentes de Aire.
- As redes de interação miRNA-mRNA, revelaram que o controle pós-transcricional da PGE é alterada sob silenciamento de Aire. Demonstrando que Aire e miRNAs podem formar uma via essencial no controle da PGE.
- As redes de interação miRNA-mRNA, revelaram que PTAs considerados como Aire dependentes por Anderson e colaboradores (2002), não se associam com miRNAs. Portanto, sugerimos que possa haver alterações nas sequências que compreendem as regiões 3'UTR desses PTAs Aire dependentes que dificultam a hibridização com miRNAs.
- A expressão transcricional de autoantígenos relacionados ao desenvolvimento de DM1 está desbalanceada em mTECs de camundongos NOD durante o período pré-diabético.
- Apesar dos níveis transcricionais de Aire serem equivalentes em mTECs de

camundongos NOD e BALB/c, os níveis proteicos de Aire são reduzidos em mTECs de camundongos NOD. Esses resultados sugerem que miRNAs possam atuar no controle pós-transcricional de Aire, reduzindo os seus níveis proteicos.

- Nossos achados contribuem para melhor compreensão dos mecanismos moleculares desencadeados por Aire no controle da tolerância imunológica.

Baseados em nossos resultados propomos a seguinte via de regulação genético-molecular da expressão gênica promíscua em células tímicas epiteliais medulares:

$$\text{Aire} \rightarrow \text{PTAs} \leftarrow \text{miRNAs} \leftarrow \text{Aire}$$

Referências Bibliográficas

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AALTONEN, J.; BJÖRSES, P.; SANDKUIJL, L.; PERHEENTUPA, J.; PELTONEN, L. An autosomal locus causing autoimmune disease: autoimmune polyglandular disease type I assigned to chromosome 21. **Nature Genetics**. v.8, p.83-87, 1997.

AALTONEN, J.; HORELLI-KUITUNEN, N.; FAN, J. B.; BJÖRSES, P.; PERHEENTUPA, J.; MYERS, R.; PALOTIE, A.; PELTONEN, L. High-resolution physical and transcriptional mapping of the autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy locus on chromosome 21q22.3 by FISH. **Genome Research**. v.7, p.820-829, 1997.

ABRAMSON, J.; GIRAUD, M.; BENOIST, C.; MATHIS, D. Aire's partners in the molecular control of immunological tolerance. **Cell**. v.140, n.1, p.123-135.

ADA-AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**. v. 34, supplement 1, p. 62-69, 2011.

AIGNER, A. Applications of RNA interference: current state and prospects for siRNA-based strategies in vivo. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.76, p. 9-21, 2007.

AIGNER, A. Gene silencing through RNA interference (RNAi) in vivo: Strategies based on the direct application of siRNAs. **Journal of Biotechnology**. v. 124, p.12-25, 2006.

AKANeya, Y.; JIANG, B.; SUMOTO, T. T. RNAi-induced gene silencing by local electroporation in targeting brain region. **Journal of Neurophysiology**. v.93, p.594-602, 2005.

ALBERTI, K. G.; ZIMMET, P. Z. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. **Diabetic Medicine**. V. 15, n. 7, p. 539-553, 1998.

ALEXANDROPOULOS, K. & DANZL, N. M. Thymic epithelial cells: antigen presenting cells that regulate T cell repertoire and tolerance development. **Immunologic Research**. v.54, p.177-190, 2012.

ANDERSON, G.; LANE, P. J.; JENKISON, E. J.; Generating intrathymic microenvironments to establish T-cell tolerance. **Nature Review Immunology**. v.7, p. 954-963, 2007.

ANDERSON, M. S.; VENANZI, E. S.; KLEIN, L.; CHEN, Z.; BERZINS, S. P.; TURLEY, S. J.; VON BOEHMER.; BRONSON, R.; DIERICH, A.; BENOIST, C.; MATHIS, D. Projection

of an immunological self-shadow within the thymus by aire protein. **Science**. v.298, p.1395–1401, 2002.

ANDERSON, M. S.; VENANZI, E. S.; CHEN, Z.; BERZINS, S. P.; BENOIST, C.; MATHIS, D. The cellular mechanism of Aire control of T cell tolerance. **Immunity**. v.23, p.227-239, 2005.

ATKINSON, M. A.; LEITER, E. H. The NOD mouse model of type 1 diabetes: as good as it gets?. **Nature Medicine**. v. 5, p. 601–604, 1999.

BARTEL, D. P. MiRNAs: genomics, biogenesis, mechanism and function. **Cell**. v.116, p. 281-297, 2004.

BAUMJOHANN, D.; ANSEL, KM. MicroRNA-mediated regulation of T helper cell differentiation and plasticity. v.13, n.9, p.666-678, 2013.

BELLGRAU, D. Thymus transplantation and disease prevention in the diabetes-prone Bio-Breeding rat. **Journal of Immunology**. v.142, p.3400–5, 1989.

BEREZIKOV, E.; CHUNG, W. J.; WILLIS, J.; CUPPEN, E.; LAI, E. C.; Mammalian mirtron genes. **Molecular cell**. v.28, p.328-336, 2007.

BETTERLE, C.; GREGGIO, N. A.; VOLPATO, M.; Clinical Review 93: Autoimmune Polyglandular Syndrome Type 1. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**. v. 83, p. 1049-1055, 1998.

BHAYANI, M. K.; CALIN, G. A.; LAI, S, Y. Functional relevance of miRNA sequences in human disease. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**. v.731, p.14-19, 2012.

BJÖRSES, P.; AALTONEN, J.; VIKMAN, A.; PERHEENTUPA, J.; BEN-ZION, G.; CHIUMELLO, G.; HEIDEMAN, P.; HOORWEG-NIJMAN, J. J.; MATHIVON, L.; MULLIS, P. E.; POHL, M.; ROMEO, G.; SHAPIRO, M. S.; SMITH, C. S.; SOLYOM, J.; PELTONEN, L. Genetic homogeneity of autoimmune polyglandular disease type I. **The American Journal of Human Genetics**. v. 59, p.879–886, 1996.

BJÖRSES, P.; HALONEN, M.; PALVIMO, J. J.; KOLMER, M.; AALTONEN, J.; ELLONEN, P.; PERHEENTUPA, J.; ULMANEN, I.; PELTONEN, L. Mutations in the AIRE gene: effects on subcellular location and transactivation function of the autoimmune

polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy protein. **The American Journal of Human Genetics**. v.66, p.378-392, 2000.

BLACKBURN, C. C.; MANLEY, N. R. Developing a new paradigm for thymus organogenesis. **Nature Reviews Immunology**. V. 4, p. 278-289, 2004.

BLUESTONE, J. A.; HEROLD, K.; EISENBARTH, G. Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. **Nature**. V. 464, n. 7293, p. 1293-1300, 2010.

BOWMAN, M. A.; LEITER, E. H, ATKISON, M. A. Prevention of diabetes in the NOD mouse: implications for therapeutic intervention in human disease. **Immunology today**. v.15, p.115-120, 1994.

BREÈS, V.; YOH, S. M.; JONES, K. A.; The multi-tasking P-TEFb complex. **Current Opinion in Cell Biology**. v.20, p.334-340, 2008.

BREZAR, V, CAREL, J. C.; BOITARD, C.; MALLONE, R. Beyond the hormone: insulin as an autoimmune target in type 1 diabetes. **Endocrine Review**. v.32, p.623–669, 2011.

BURNET, F. M. A reassessment of the forbidden clone hypothesis of autoimmune diseases. **Australian Journal of Experimental Biology & Medical Science**. v.50, p.1-9, 1973.

CARLSEN, A. L.; SCHETTER, A. J.; NIELSEN, C. T.; LOOD, C.; KNUDSEN, S.; VOSS, A.; HARRIS, C. C.; HELLMARK, T.; SEGEMARK, M. et al. Circulating microRNA expression profiles associated with systemic lupus erythematosus. miR-142-3p. **Arthritis Rheum**. v. 65, p. 1324-34, 2013

CERIBELLI, A.; SATOH, M.; CHAN, E. K. MicroRNAs and autoimmunity. **Current Opinion in Immunology**. v.24, p. 686-691, 2012.

CHEN, C.Z.; LI, L.; LODISH, H. F.; BARTEL, D. P. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. **Science**. v.303, p.83-6, 2004.

CHEN, X. M.; SPLINTER, P. L.; O'HARA, S. P.; LARUSSO, N. F. A cellular micro-RNA, let-7i, regulates Toll-like receptor 4 expression and contributes to cholangiocyte immune responses against *Cryptosporidium parvum* infection. **The Journal of Biological Chemistry**. v.282, p. 28929-38, 2007.

CHENTOUFI, A. A.; POLYCHRONAKOS, C. Insulin expression levels in the thymus modulate insulin-specific autoreactive T-cell tolerance. **Diabetes**. v.51, p.1383–1390. 2002.

CONCANNON, P.; RICH, S. S.; NEPOM, G. T. Genetics of type 1A diabetes. *The New England Journal of Medicine*. v.360, p. 1646–1654, 2009.

CÔRTE-REAL, J.; DUARTE, N.; TAVARES, L.; PENHA-GONÇALVES, C. Autoimmunity triggers in the NOD mouse: a role for natural auto-antibody reactivities in type 1 diabetes. **Annals of The New York Academy of Science**. v.1173, p.442-8, 2009.

CSORBA, T. R.; LYON, A. W.; HOLLENBERG, M. D. Autoimmunity and the pathogenesis of type 1 diabetes. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**. v.47, p. 51-71, 2010.

CULLEN, L. M.; ARNDT, G. M. M. Genome-wide screening for gene function using RNAi in mammalian cells. **Immunology and Cell Biology**. v.83, p.217-223, 2005.

DAI, R.; AHMED, S. A. MicroRNA, a new paradigm for understanding immunoregulation, inflammation, and autoimmune diseases. **Translational Research**. v.157, p.163-179, 2011.

DELOVITCH, T. L.; SINGH, B. The nonobese diabetic mouse as a model of autoimmune diabetes: immune dysregulation gets the NOD. *Immunity*. V. 7, n. 6, p. 727-738, 1997.

DERBINSKI, J.; GÄBLER, J.; BRORS, B.; TIERLING, S.; JONNAKUTY, S.; HERGENHAHN, M.; PELTONEN, L.; WALTER, J.; KYEWSKI, B. Promiscuous gene expression in thymic epithelial cells is regulated at multiple levels. **The Journal of Experimental Medicine**. v. 202, p.33–45, 2005.

DERBINSKI, J.; KYEWSKI, B. How thymic antigen presenting cells sample the body's self-antigens. **Current opinion in Immunology**. v.22, p. 592-600, 2010.

DERBINSKI, J.; SCHULTE, A.; KYEWSKI, B.; KLEIN, L. Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. **Nature Immunology**. v.2, p.1032–1039, 2001.

DURINOVIC-BELLÓ, I.; WU, R. P.; GERSUK, V. H.; SANDA, S.; SHILLING, H. G.; NEPOM, G. T. Insulin gene VNTR genotype associates with frequency and phenotype of the autoimmune response to proinsulin. **Genes and Immunity**. V. 11, n. 2, p. 188-193, 2010.

FAN, Y.; RUDERT, W. A.; GRUPILLO, M.; HE, J.; SISINO, G.; TRUCCO, M. Thymus-specific deletion of insulin induces autoimmune diabetes. **The EMBO Journal**. v.28, p.2812–2824, 2009.

FERGUSON, B. J.; COOKE, A.; PETERSON, P.; RICH, T. Death in the AIRE. **Trends in Immunology**. v.29, p.306-312, 2008.

FILIPOWICZ, W.; BRATTACHARYYA, S. N.; SONENBERG, N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?. **Nature Review Genetic**. v.9, p.102-114, 2008.

FIRE, A.; XU, S.; MONTGOMERY, M. K.; KOSTAS, S. A.; DRIVER, S. E.; MELLO, C. C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**. v.391, n. 6669, p. 806-811.

FORNARI, T. A.; DONATE, P. B.; MACEDO, C.; MARQUES, M. M. C.; MAGALHÃES, D. A.; PASSOS, G. A. Age-related deregulation of Aire and peripheral tissue antigen genes in the thymic stroma of non-obese diabetic (NOD) mice is associated with autoimmune type 1 diabetes mellitus (DM-1). **Molecular and Cellular Biochemistry**. v.342, p.21-28, 2010.

GALLEGOS, A.M. & BEVAN, M. J.; Central tolerance: good but imperfect. **Immunological Reviews**. v.209, p. 290-296, 2006.

GANDHIM, R.; HEALY, B.; GHOLIPOUR, T.; EGOROVA, S.; MUSALLAM, A.; HUSSAIN, M. S.; NEJADA, P.; PATEL, B.; HEI, H.; KHOURY, S.; QUINTANA, F.; KIVISAKK, P.; CHITNIS, T.; WEINER, H. L. Circulating microRNAs as biomarkers for disease staging in multiple sclerosis. *Annals of Neurology*. v.73, p.729-740, 2013.

GEENEN, V. Thymus and type 1 diabetes: An update. **Diabetes Research and Clinical Practice**. v.98, p. 26-32, 2012.

GEENEN, V.; ACHOUR, I.; ROBERT, F.; VANDERSMISSEM, E.; SODOYEZ, J. C.; DEFRESNE, M. P. Evidence that insulin-like growth factor 2 (IGF2) is the dominant thymic peptide of the insulin superfamily. **Thymus**. v.21, p.115–127, 1993.

GEORGIU, H. M.; MANDEL, T. E. Induction of insulinitis in a athymic (nude) mice. The effect of NOD thymus and pancreas transplantation. **Diabetes**. v.44, p. 49–59, 1995.

GEPTS, W. Pathologic anatomy of the pancreas in juvenile diabetes mellitus. **Diabetes**. v.14, p.619–633, 1965.

GIRAUD, M.; YOSHIDA, H.; ABRAMSON, J.; RAHL P. B.; YOUNG, R. A.; MATHIS, D.; BENOIST, C. Aire unleashes stalled RNA polymerase to induce ectopic gene expression in

thymic epithelial cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v.109, p.535-540, 2012.

GOLDRATH, A. W.; BEVAN, M. J. Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. **Nature**. v.402, n.6759, p.255-262, 1999.

GOLZIO, M.; MAZZOLINI, L.; LEDOUX, A. et al. In vivo gene silencing in solid tumors by targeted electrically mediated siRNA delivery. **Gene Therapy**. v.14, p.752-759, 2007.

GOLZIO, M.; MAZZOLINI, L.; MOLLER, P.; ROLS, M. P.; TEISSIE, J. Inhibition of gene expression in mice muscle by in vivo electrically mediated siRNA delivery. **Gene Therapy**. v.12, p.246-251, 2005.

GRAY, D. H.; CHIDGEY, A. P.; BOYD, R. L. Analysis of thymic stromal cell populations using flow cytometry. Journal of Immunological Methods. v.260, p.15-28, 2002.

GUERAU-DE-ARELLANO, M.; MATHIS, D.; BENOIST, C. Transcriptional impact of Aire varies with cell type. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v.105, p.14011–14016, 2008.

GUPTA, S. & LOUIS, A.G. Tolerance and autoimmunity in primary immunodeficiency disease: a comprehensive review. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**. v.45, n.2, p.162-169, 2013.

HALLER, M. J.; ATKINSON, M. A.; SCHATZ, D. Type 1 diabetes mellitus: etiology, presentation, and management. **Pediatric Clinics of North America**. V. 52, n. 6, p. 1553-1578, 2005.

HALONEN, M.; KANGAS, H.; RÜPPELL, T.; ILMARINEN, T.; OLLILA, J.; KOLMER, M.; VIHINEN, M.; PALVIMO, J.; SAARELA, J.; ULMANEN, I.; ESKELIN, P. APECED-causing mutations in AIRE reveal the functional domains of the protein. **Human Mutation**. v. 23, p.245–257, 2004.

HAN, J.; LEE, Y.; YEOM, K. H.; JIN, H.; KIM, V. N.; The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. **Genes & Development**. v.18, p.3016-3027, 2004.

HEIDEL, J. D.; HU, S.; LIU, X. F.; TRICHE, T. J.; DAVIS, M. E. Lack of interferon response in animals to naked siRNAs. **Nature Biotechnology**. v.22, p.1579-82, 2004.

HEINO, M.; PETERSON, P.; NAGAMINE, K.; LAGERSTEDT, A.; OVOD, V.; RANKI, A.; RANTALA, I.; NIEMINEN, M.; TUUKKANEN, J.; SCOTT, H. S.; ANTONARAKIS, S. E.; SHIMIZU, N.; KROHN, K. Autoimmune regulator is expressed in the cells regulating immune tolerance in thymus medulla. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v.257, p.821-825, 1999.

HUANG, J. C.; MORRIS, Q. D.; FREY, B. J. Bayesian inference of MicroRNA targets from sequence and expression data. **Journal of Computational Biology**. v.14, p. 550-563, 2007.

IORIO, M. V.; CROCE, C. M. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. **EMBO Molecular Medicine**. v.4, p.143-159, 2012.

IRLA, M.; SAADE, M.; KISSENPENNIG, A.; POULIN, L. F.; LESERMAN, L.; MARCHE, P. N.; JOUVIN-MARCHE, E.; BERGER, F.; NGUYEN, C. ZAP-70 restoration in mice by in vivo thymic electroporation. **PLoS One**. v. 3, n. 4, e2059, 2008b.

JIANG, L.; CHENG, Z.; QIU, S.; QUE, Z.; BAO, W.; JIANG, C.; ZOU, F.; LIU, P.; LIU, J. Altered let-7 expression in Myasthenia gravis and let-7c mediated regulation of IL-10 by directly targeting IL-10 in Jurkat cells. **International Immunopharmacology**. v.14, p. 217-223, 2012.

JIANG, W.; ANDERSON, M. S.; BRONSON, R.; MATHIS, D.; BENOIST, C. Modifier loci condition autoimmunity provoked by Aire deficiency. **The Journal of Experimental Medicine**. v.202, p. 805-815, 2005.

JOLICOEUR, C.; HANAHAN, D.; SMITH, K. T-cell tolerance toward a transgenic beta-cell antigen and transcription of endogenous pancreatic genes in the thymus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 91, p.6707–6711, 1994.

JU, B. G.; ROSENFELD, M. G.; A breaking strategy for topoisomerase IIbeta/PARP-1-dependent regulated transcription. **Cell Cycle**. v.5, p.2557-2560, 2006.

KAWASAKI, H.; TAIRA, K. Induction of DNA methylation and gene silencing by short interfering RNAs in human cells. **Nature**. v. 431, p. 211-7, 2004.

KENT, S. C.; CHEN, Y.; BREGOLI, L.; CLEMMINGS, S. M.; KENYON, N. S.; RICORDI, C. Expanded T cells from pancreatic lymph nodes of type 1 diabetic subjects recognize an insulin epitope. **Nature**. v.435, p.224–228, 2005.

KIKUTANI, H.; MAKINO, S. The murine autoimmune diabetes model: NOD and related strains. **Advances in Immunology**. V. 51, p. 285-322, 1992.

KING, C.; ILIC, A.; KOELSCH, K.; SARVETNICK, N. Homeostatic expansion of T cells during immune insufficiency generates autoimmunity. **Cell**. V. 117, n. 2, p. 265-277, 2004.

KISHIMOTO, H.; SPRENT, J. A defect in central tolerance in NOD mice. **Nature Immunology**. v.2, n.11, p. 1025-1031, 2001.

KNIP, M.; VIRTANEN, S. M.; SEPPA, K.; ILONEN, J.; SAVILAHTI, E.; VAARALA, O. Dietary intervention in infancy and later signs of beta-cell autoimmunity. **The New England Journal of Medicine**. v. 363, p.1900-1908, 2010.

KODOMA, K.; BUTTE, A. J.; CREUSOT, R. J.; SU, L.; SHENG, D.; HARTNETT, M.; IWAI, H.; SOARES, L. R.; FATHMAN, C. G. Tissue- and age-specific changes in gene expression during disease induction and progression in NOD mice. **Clinical Immunology**. v.129, p.195-201, 2008.

KOH, A. S.; KUO, A. J.; PARK, S. Y.; CHEUND, P.; ABRAMSON, J.; BUA, D.; CARNEY, D. et al. Aire employs a histone-binding module to mediate immunological tolerance, linking chromatin regulation with organ-specific autoimmunity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 105, p. 15878–15883, 2008.

KONT, V.; LAAN, M.; KISAND, K.; MERITS, A.; SCOTT, H. S.; PETERSON, P. Modulation of Aire regulates the expression of tissue-restricted antigens. **Molecular Immunology**. v.45, p. 25-23, 2008.

KYEWSKI, B.; DERBINSKI, J. Self-representation in the thymus: an extended view. **Nature Review Immunology**. v.4, p.688–698, 2004.

KYEWSKI, B.; DERBINSKI, J.; GOTTER, J.; KLEIN, L. Promiscuous gene expression and central T-cell tolerance: more than meets the eye. **Trends in Immunology**. v.23, p. 364-371, 2002.

KRÜGER, J, REHMSMEIER, M. RNAhybrid: microRNA target prediction easy, fast and flexible. **Nucleic Acids Research**. v. 34(Web Server issue), p.W451-4, 2006.

KURODA, N.; MITANI, T.; TAKEDA, N.; ISHIMARU, N.; ARAKAKI, R.; HAYASHI, Y.; BANDO, Y.; IZUMI, K.; TAKAHASHI, T.; NOMURA, T.; SAKAGUCHI, S.; UENO, T.; et al. Development of autoimmunity against transcriptionally unrepressed target antigen in the thymus of Aire-deficient mice. **Journal of Immunology**. v.174, p.1862-1870, 2005.

LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROS, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. **Cell**. v.75, n.5, p.843-854, 1993.

LEE, R. C.; AMBROS, V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. **Science**. v.294, n.5543, p. 862-864, 2001.

LEE, Y.; JEON, K.; LEE, J. T.; KIM, S.; KIM, V. N. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. **The EMBO Journal**. v.21, p.4663-4670, 2002.

LEHUEN, A.; DIANA, J.; ZACCONE, P.; COOKE, A. Immune cell crosstalk in type 1 diabetes. **Nature Reviews Immunology**. V. 10, n. 7, p. 501-513, 2010.

LEHUEN, A.; DIANA, J.; ZACCONE, P.; COOKE, A. Immune cell crosstalk in type 1 diabetes. **Nature Reviews Immunology**. v.10, n.7, p.501-513, 2010.

LEITER, E. H.; PROCHAZKA, M.; COLEMAN, D. L. The non-obese diabetic (NOD) mouse. **American Journal of Pathology**. V. 128, n. 2, p. 380-383, 1987.

LEWIS, B. P.; BURGE, C. B.; BARTEL, D. P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. **Cell**. v. 120, p. 15-20, 2005.

LI, Q. J.; CHAU, J.; EBERT, P. J.; SYLVESTER, G.; MIN, H.; LIU, G.; BRAICH, R.; MANOHARAN, M.; SOUTSCHEK, J.; SKARE, P.; KLEIN, L. O.; DAVIS, M. M.; CHEN, C. Z. miR-181a is an intrinsic modulator of T cell sensitivity and selection. **Cell**. v.129, p. 147-161, 2007.

LI, S. Electroporation gene therapy: new developments in vivo and in vitro. **Current Gene therapy**. v.4, p.309-316, 2004.

LIEBERMAN, S. M.; DILORENZO, T. P. A Comprehensive guide to antibody and T-cell responses in type 1 diabetes. **Tissue Antigens**. v.63, p.359-377, 2003.

LIKE, A. A.; KSLAUKIS, E.; WILLIAMS, R. M.; ROSSINI, A. A. Neonatal thymectomy prevents spontaneous diabetes mellitus in the BB:W rat. **Science**. p.644-646. 1982.

LIN, X.; CHEN, M.; LIU, Y.; GUO, Z.; HE, X.; BRAND, D.; ZHENG, S.G. Advances in distinguishing natural from induced Foxp3(+) regulatory T cells. **International Journal of Clinical & Experimental Pathology**. v.6, n.2, p. 116–123, 2013.

LISTON, A.; GRAY, D. H. D.; LESAGE, S.; FLETCHER, A. L.; WILSON, J.; WEBSTER, K. E.; SCOTT, H. S.; BOYD, R. L.; PELTONEN, L.; GOODNOW, C. C. Gene dosage-limiting role of Aire in thymic expression, clonal deletion, and organ-specific autoimmunity. **The Journal of Experimental Medicine**. v.200, p. 1015-1026, 2004.

LISTON, A.; LU, L. F.; O'CARROLL, D.; TARAKHOVSKY, A.; RUDENSKY, A.; Dicer-dependent microRNA pathway safeguards regulatory T cell function. **The Journal of Experimental Medicine**. v.205, p.1993-2004, 2008.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))}. **Method**.v. 25, p.402-408, 2001.

LORENZI, J. C.; BRUM, D. G.; ZANETTE, D. L.; DE PAULA, A. S. A.; BARBUZANO, F. G, DOS SANTOS, A. C.; BARREIRA, A. A.; DA SILVA W. A. miR-15a and 16-1 are downregulated in CD4+ T cells of multiple sclerosis relapsing patients. **International Journal of Neuroscience**. v.122, p. 466-71, 2012.

MACEDO, C.; EVANGELISTA, A. F.; MAGALHÃES, D. A.; FORNARI, T. A, LINHARES, L. L.; SAKAMOTO-HOJO, E. T.; DONADI, E. A.; SAVINO, W.; PASSOS, G. A. Evidence for a network transcriptional control of promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells. **Molecular Immunology**. v.16, p.3240-3244, 2009.

MACEDO, C.; EVANGELISTA, A. F.; MARQUES, M. M.; OCTACILIO-SILVA, S.; DONADI, E. A.; SAKAMOTO-HOJO, E. T.; PASSOS, G. A. Autoimmune regulator (Aire) controls the expression of microRNAs in medullary thymic epithelial cells. **Immunobiology**. v.218, p. 554-560, 2012.

MAGALHÃES, D. A.; SILVEIRA, E. L.; JUNTA, C. M.; SANDRIN-GARCIA, P.; FACHIN, A. L.; DONADI, E. A.; SAKAMOTO-HOJO, E. T.; PASSOS, G. A. Promiscuous gene expression in the thymus: the root of central tolerance. **Clinical and Developmental Immunology**. v.13, p.81–99, 2006.

MAKINO, S.; KUNIMOTO, K.; MURAOKA, Y.; MIZUSHIMA Y.; KATAGIRI, K.; TOCHINO, Y. Breeding of nonobese, diabetic strain of mice. **Jikken Dobutsu**. V. 29, n. 1, p. 1-13, 1980.

MATHIEU, C.; GYSEMANS, C.; GIULIETTI, A.; BOUILLON, R. Vitamin D and diabetes. **Diabetologia**. v.48, p.1247–57, 2005.

MATHIS, D. & BENOIST, C. A decade of Aire. **Nature Review of Immunology**. v.7, p. 645–650, 2007.

MATHIS, D. & BENOIST, C. Aire. **Annual Review of Immunology**. v.27, p.287–312, 2009.

MATSUDA, T.; CEPKP, C. L. Electroporation and RNA interference in the rodent in vivo and in vitro. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v.101, p.16–22, 2004.

MATSUO, T.; NOGUCHI, Y.; SHINDO, M.; MORITA, Y.; ODA, Y.; YOSHIDA, E.; HAMADA, H.; HARADA, M.; SHIOKAWA, Y., NISHIDA, T.; TOMINAGA, R.; KIKUSHIGE, Y.; AKASHI, K.; KUDOH, J.; SHIMIZU, N.; TANAKA, Y.; UMEMURA, T.; TANIGUCHI, T.; YOSHIMURA, A.; KOBAYASHI, T.; MITSUYAMA, M.; KURISAKI, H.; KATSUTA, H.; NAGAFUCHI, S. Regulation of human autoimmune regulator (AIRE) gene translation by miR-220b. **Gene**. v.S0378-1119, n.13, p.01045-7, 2013.

MILER, J. F. **Immunological function of the thymus**. *Lancet*. v.30, n.2, p.748–749, 1961.

molecular control of immunological tolerance. **Cell**. v.140, p.123–135, 2010.

MORRIS, K. V.; CHAN, S. W.; JACOBSEN, S. E.; LOONEY, D. J. Small interfering RNA-induced transcriptional gene silencing in human cells. **Science**. v.305, p. 1289–92, 2004.

NAGAMINE, K.; PETERSON, P.; SCOTT, H. S.; KUDOH, J.; MINOSHIMA, S.; HEINO, M.; KROHN, K. J. E.; LALIOTI, M.D.; NOBUYOSHI, S. Positional cloning of the APECED gene. **Nature Genetics**. v.17, p.393 – 398, 1997.

NAKAYAMA, M.; ABIRU, N.; MORIYAMA, H.; BABAYA, N.; LIU, E.; MIAO, D. Prime role for an insulin epitope in the development of type 1 diabetes in NOD mice. **Nature**. v.435, p.220–230. 2005.

NOTARANGELO, L.; CASANOVA, J. L.; CONLEY, M. E.; CHAPEL, H.; FISCHER.; PUCK, J.; ROIFMAN, C.; SEGER, R.; GEHA, R. S. Primary immunodeficiency diseases: an update from the International Union of Immunological Societies Primary Immunodeficiency Diseases Classification Committee Meeting in Budapest. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v.117, p.883-896, 2006.

OKAMURA, K.; HAGEN, J. W.; DUAN, H.; TYLER, D.M, LAI, E. C.; The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*. **Cell**. v.130, p.89-100, 2007.

OLDSTONE, M. B.; NERENBERG, M.; SOUTHERN, P.; PRICE, J.; LEWICKI, H. Virus infection triggers insulin-dependent diabetes mellitus in a transgenic model: Role of anti-self (virus) immune response. **Cell**. v. 65, p. 319–31,1991.

OLIVEIRA, E. H.; MACEDO, C.; DONATE, P. B.;ALMEIDA, R.S.; PEZZI, N.; NGUYEN, C.; ROSSI, M. A.; SAKAMOTO-HOJO E. T.; DONADI, E. A.; PASSOS, G. A., 2013. Expression profile of peripheral tissue antigen genes in medullary thymic epithelial cells (mTECs) is dependent on mRNA levels of autoimmune regulator (Aire). **Immunobiology**. v. 218, p.96-104, 2013.

OROM, U. A.; NIELSEN, F. C.; LUND, A. H. MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. **Molecular Cell**. v.30, p.460-471, 2008.

PAGANIN-GIOANNI, A.; BELLARD, E.; COUDERC, B.; TEISSIÉ, J.; GOLZIO, M. Tracking in vitro and in vivo siRNA electrotransfer in tumor cells. **Journal of RNAi and Gene Silencing**. v.4, p.281-288, 2008.

PANSKY, B.; HOUSE, E. L.; CONE, L. A. An insulin-like thymic factor: a preliminary report. **Diabetes**. v.14, p.325–332, 1965.

PASSOS, G. A. S.; NGUYEN, C.; JORDAN, B. Projeto Transcriptoma- Análise da expressão gênica em larga escala usando DNA-arrays. **Biotecnologia, Ciências & Desenvolvimento**. v.12, p.34-37, 2000.

PATEL, P.; MACEROLLO, A. Diabetes mellitus: diagnosis and screening. **American Family Physician**. V. 81, n. 7, p. 863-870, 2010.

PETERSON, P.; ORG, T.; REBANE, A. Transcriptional regulation by AIRE: molecular mechanisms of central tolerance. **Nature Review of Immunology**. v.8, p. 948-957, 2008.

PITKÄNEN, J.; DOUCAS, V.; STERNSDORF, T.; NAKAJIMA, T.; ARATANI, S.; JENSEN, K.; WILL, H.; VÄHÄMURTO, P.; OLLILA, J.; VIHINEN, M.; SCOTT, H. S.; ANTONARAKIS, S. E.; KUDOH, J.; SHIMIZU, N.; KROHN, K.; PETERSON, P. The autoimmune regulator protein has transcriptional transactivating properties and interacts with the common coactivator CREB-binding protein. **The Journal of Biological Chemistry**. v.275, p.16802-16900, 2000.

PLANAS, R.; PUJOL-BORREL, R.; VIVES-PI, M. Global gene expression changes in type 1 diabetes: insights into autoimmune response in the target organ and in the periphery. **Immunology Letters**. V. 133, n. 2, p. 55-61, 2010.

POCIOT, F.; AKOLKAR, B.; CONCANNON, P.; ERLICH, H. A.; JULIER, C.; MORAHAN, G.; NIERRAS, C. R.; TODD, J. A.; RICH, S. S.; NERUP, J. Genetics of type 1 diabetes: what's next? **Diabetes**. V. 59, n. 7, p. 1561-1571, 2010.

POLYCHRONAKOS, C.; LI, Q. Understanding type 1 diabetes through genetics: advances and prospects. **Nature Reviews Genetics**. V. 12, n. 11, p. 781-792, 2011.

QU, H. Q.; BRADFIELD, J. P.; GRANT, S. F.; HAKONARSON, H.; POLYCHRONAKOS, C. Remapping the type I diabetes association of the CTLA4 locus. **Genes and Immunity**. V. 10, supplement 1, p. S27-S32, 2009a.

QU, H.; BRADFIELD, J. P.; GRANT, S. F.; HAKONARSON, H.; POLYCHRONAKOS, C. The type I diabetes association of the IL2RA locus. **Genes and Immunity**. V. 10, supplement 1, p. S42-S48, 2009b.

RAMSEY, C.; BUKRINSKY, A.; PELTONEN, L. Systematic mutagenesis of the functional domains of AIRE reveals their role in intracellular targeting. **Human Molecular Genetics**. v.11, n.26, p.3299-2208, 2002.

REGNAULT, B.; OSORIO, Y.; FORTEA, J.; MIAO, D.; EISENBARTH, G.; MELANITOU, E. Early over expression of messenger RNA for multiple genes, including insulin, in the Pancreatic Lymph Nodes of NOD mice is associated with Islet Autoimmunity. **BMC Medical Genomics**. v.2, n.63, 2009.

REHMSMEIER, M.; STEFFEN, P.; HOCHSMANN, M.; GIEGERICH, R. Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes. **RNA**. v.10, n. 10, p.1507-1517, 2004.

ROEP, B. O. The role of T cells in the pathogenesis of type 1 diabetes: from cause to cure. **Diabetologia**. v.46, p.305–321, 2003.

- ROEP, B. O.; HIEMSTRA, H. S.; SCHOLOOT, N. C.; DE VRIES, R.R.; CHAUDHURI, A.; BEHAN, P. O.; DRIJFHOUT, J. W. Molecular mimicry in type 1 diabetes: immune cross-reactivity between islet autoantigen and human cytomegalovirus but not Coxsackie virus. **Annals of the New York Academy of Sciences**. V. 958, p. 162-165, 2002.
- RUAN, Y.; LE, B. P.; NG, H. H.; LIU, E. T. Interrogating the transcriptome. **Trends in Biotechnology**. V. 22, n. 1, p. 23-30, 2004.
- RUBY, J. G.; JAN, C. H.; BARTEL, D. P. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. **Nature**. v.448, p.83-86, 2007.
- SHANNON, P.; MARKIEL, A.; OZIER, O.; BALIGA, N. S.; WANG, J. T.; RAMAGE, D.; AMIN, N.; SHWIKOWSKI, B.; IDEKER, T. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. **Genome Research**. v.13, p.2498-504, 2003.
- SHI, Y. & ZHU, M. Medullary thymic epithelial cells, the indispensable player in central tolerance. **Science China Life Sciences**. v.56, p.392-398, 2013.
- SILLANPAA, N.; MAGUAREANU, C. G.; MURUMAGI, A.; REINIKAINEN, A.; WEST, A.; MANNINEN, A.; LAHTI, M. et al. Autoimmune regulator induced changes
- SINGH, B.; RABINOVITCH, A. Influence of microbial agents on the development and prevention of autoimmune diabetes. **Autoimmunity**. v.15, p.209-213, 1993.
- TAKAHAMA, Y. Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. **Nature Reviews Immunology**. v. 6, n. 2, p. 127-135, 2006.
- TANIGUCHI, H.; MAKINO, S.; IKEGAMI, H. The NOD mouse and its related strains. In: SHAFRIR, E. **Animal Models of Diabetes**. **Frontiers in Research**. 2nd ed., CRC Press, 2007.
- TANIGUCHI, R. T. & ANDERSON, M. S. The role of Aire in clonal selection. **Immunology and Cell Biology**. v.89, p.40-44, 2011.
- TURLEY, S.; POIROT, L.; HATTORI, M.; BENOIST, C.; MATHIS, D. Physiological beta cell death triggers priming of self-reactive T cells by dendritic cells in a type-1 diabetes model. **The Journal of Experimental Medicine**. V. 198, n. 10, p. 1527-1537, 2003.

TYKOCINSKI, L. O.; SINEMUS, A.; KYEWSKI, B. The thymus medulla slowly yields its secrets. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v.1143, p. 105-122, 2008.

TYKOCINSKI, L. O.; SINEMUS, A.; REZAVANDY, E.; WEILAND, Y.; BADDELEY, D.; CREMER, C.; SONNTAGE, S. et al. Epigenetic regulation of promiscuous gene expression in thymic medullary epithelial cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v.107, p. 19426–19431, 2010.

UCAR, O.; TYKOCINSKI, L. O.; DOOLEY, J.; LISTON, A.; KYEWSKI, B. An evolutionarily conserved mutual interdependence. **European Journal of Immunology**. v.43, p.1769-1778, 2013.

VON, H. M. Can we learn from viruses how to prevent type 1 diabetes? The role of viral infections in the pathogenesis of type 1 diabetes and the development of novel combination therapies. **Diabetes**. v. 58, p. 2–11, 2009.

WADE, J. T.; STRUHL, K. The transition from transcriptional initiation to elongation. **Current Opinion in Genetic**. v.18, p. 130-136, 2008.

WALDRON-LYNCH, F.; HEROLD, K. C. Immunomodulatory therapy to preserve pancreatic β -cell function in type 1 diabetes. **Nature Reviews Drug Discovery**. V. 10, n. 6, p. 439-452, 2011.

WALTER, M.; ALBERT, E.; CONRAD, M.; KELLER, E.; HUMMEL, M.; FERBER, K.; BARRATT, B. J.; TODD, J. A.; ZIEGLER, A. G.; BONIFACIO, E. IDDM2/insulin VNTR modifies risk conferred by IDDM1/HLA for development of type 1 diabetes and associated autoimmunity. **Diabetologia**. V. 46, n. 5, p. 712-720, 2003.

WANG, C. Y.; DAVOODI-SEMIROMI, A.; HUANG, W.; CONNOR, E.; SHI, J. D.; SHE, J. X. Characterization of mutations in patients with autoimmune polyglandular syndrome type 1 (APS1). **Human Genetics**. v.103, p.681-685, 1998.

WANG, J.; LU, M.; QIU, C.; CUI, Q. TransmiR: a transcription factor-microRNA regulation database. **Nucleic Acids Research**. v.38, p.D119–D122, 2010.

WASCHBISCH, A.; ATIYA, M.; LINKER, R. A.; POTAPOV, S.; SCHWAB, S.; DERFUSS, T. Glatiramer acetate treatment normalizes deregulated microRNA expression in relapsing remitting multiple sclerosis. **PLoS One**. v. 6, n.9, p. e24604, 2011.

WELLS, D. J. Gene therapy progress and prospects: electroporation and other physical methods. **Gene Therapy**. v.11, p.1363-1369, 2004.

WENZLAU, J. M.; JUHL, K.; YU, L.; MOUA, O.; SARKAR, S. A.; GOTTLIEB, P.; HUTTON, J. C. The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes. **PNAS**. V. 104, n. 43, p. 17040-17045, 2007.

WIGHTMAN, B.; HA, I.; RUVKUN, G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. **Cell**. v.75, n.5, p.855-862.

YUAN, Y.; KASAR, S.; UNDERBAYEV, C.; VOLLENWEIDER, D.; SALERNO, E.; KOTENKO, S. V.; RAVECHE, E. Role of microRNA-15a in autoantibody production in interferon-augmented murine model of lupus. **Molecular Immunology**. v.52, p. 61-70, 2012.

ZENG, Y.; YI, R.; CULLEN, B. R. Recognition and cleavage of primary microRNA precursors by the nuclear processing enzyme Drosha. **The EMBO Journal** . v.24, p.138-148, 2005.

ZHANG, L.; NOLAN, E.; KREITSCHITZ, S.; RABUASSAY, DP. Enhanced delivery of naked DNA to the skin by non-invasive in vivo electroporation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**. v.1572, p. 1-9, 2002.

ZUCCHELLI, S.; HOLLER, P.; YAMAGATA, T.; ROY, M.; BENOIST, C.; MATHIS, D. Defective central tolerance induction in NOD mice: genomics and genetics. **Immunity**. v.22, p.385-396, 2005.

Manuscrito

Autoimmune regulator (Aire) and pancreatic autoantigen genes have opposite transcription levels in medullary thymic epithelial cells of NOD mice

Ernna H. Oliveira¹, Claudia Macedo¹, Cristhianna V. Collares¹, Catherine Nguyen², Elza T. Sakamoto-Hojo³, Eduardo A. Donadi⁴, Geraldo A. Passos^{1,5,*}

- 1) Molecular Immunogenetics Group, Department of Genetics, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo (USP), 14049-900, Ribeirão Preto, SP, Brazil.
- 2) National Institute of Health and Medical Research (INSERM, U1090), 13100, Marseille, France.
- 3) Department of Biology, Faculty of Philosophy of Ribeirão Preto, USP, 14040-900, Ribeirão Preto, SP, Brazil.
- 4) Division of Clinical Immunology, Department of Medicine, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, USP, 14049-900, Ribeirão Preto, SP, Brazil.
- 5) Disciplines of Genetics and Molecular Biology, Department of Morphology, Physiology and Basic Pathology, Faculty of Dentistry of Ribeirão Preto, USP, 14040-904, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

* Corresponding author: Dr. Geraldo A. Passos, Molecular Immunogenetics Group, Department of Genetics, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, 14049-900, Ribeirão Preto, SP, Brazil. FAX: +55 16 3602 02 22 Email: passos@usp.br

Abstract

T cell tolerance is a process that depends on promiscuous gene expression (PGE), which is characterized by ectopic expression of peripheral tissue antigens (PTAs) in medullary thymic epithelial cells (mTECs), a phenomenon that is partially controlled by Aire. Considering that autoimmune type 1 diabetes (T1D) results from the breakdown of T cell tolerance to pancreatic beta cell autoantigens, we hypothesized that alterations in Aire expression and/or PGE might contribute to T1D. To assess this, we were the first to compare Aire and PGE expression in mTECs from non-obese diabetic (NOD) mice which have autoimmunity and develop T1D and BALB/c (non-autoimmune) mice. Hierarchical microarray data clustering demonstrated that Aire expression was comparable between strains. Nevertheless, Aire-dependent *Ins1* and *Ins2* and Aire-independent *Gad1*, *Gad2*, and *Ica1* were downregulated, whereas *IA-2* was upregulated in NOD mice. Moreover, the qRT-PCR analyses for Aire and PTA expression demonstrated that expression levels of these genes were opposite in the NOD mice. During T1D development in these mice, Aire expression was higher in prediabetic animals while the expression of T1D autoantigen genes including *Ins1* and *Ins2* was decreased. Aire is primarily a positive regulator of these genes; thus, this expression was the contrary of what was expected. However, this result was significant when considering that low mTEC PTA expression was implicated for the loss of tolerance, which is the main phenotypic feature that is observed in the NOD strain. Considering that the AIRE protein in the thymic stroma was comparatively reduced in NOD mice, these results suggest the participation of an attenuating mechanism shortly after its transcription.

Introduction

Type 1 diabetes (T1D) is an autoimmune disease that is characterized by T cell activation against pancreatic islet β -cells and progressive loss of insulin secretion. Non-obese diabetic (NOD) mice spontaneously develop T1D, making it an animal model that is frequently used to study this disease (Nakayama et al. 2005; Brezar et al. 2011).

Both mouse and human insulin (Ins) is the main autoantigen in T1D, which plays an essential role on the development of diabetogenic autoimmunity (Nakayama et al. 2005; Brezar et al. 2011).

In addition to Ins, other islet specific autoantigens as Glutamic acid decarboxylase (Gad), Tyrosine phosphatase (IA-2), Islet cell autoantigen 1 (Ica1), Islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit related protein (Igrp) and Carboxypeptidase E (Cpe) also represent usual targets in T1D (Lieberman and DiLorenzo 2003; Brian et al. 2010).

The prevention of organ-specific autoimmunity has been attributed to effective negative selection of autoreactive T cells in the thymic medulla. Within this compartment, medullary thymic epithelial cells (mTECs) express a large set of peripheral tissue (auto)antigens (PTAs) that represent the diverse body tissues and organs, a process termed promiscuous gene expression (PGE), which is partially controlled by the Autoimmune regulator (Aire) gene. In the set of mTEC-expressed PTAs, all members of the insulin gene family and Insulin-like growth factor 2 (Igf2) were found, which are of particular interest for T1D (Derbinski et al. 2001, 2005; Kyewski and Derbinski 2004; Magalhães et al. 2006; Cheng et al. 2007; Mathis and Benoist 2007, 2009; Macedo et al. 2009; Kyewski and Peterson 2010; Abramson et al. 2010; Anderson and Su 2011; Pansky et al. 1965; Geenen et al. 1993; Jolicœur et al. 1994; Geenen, 2003; Anderson et al. 2002).

The meaning for this ectopic gene expression appeared when it was reported that thymocytes express a diverse repertoire of T cell antigen receptor (TCR), which are presented in the thymus to mTEC class II major histocompatibility complex (MHC II)-carrying peptides that are coded from PTA genes. Autoreactive T cell clones that strongly recognize PTA peptides in the context of MHC II initiate a signal transduction cascade that induces apoptosis (death by neglect or by negative selection) (Takahama, 2006). Dendritic cells (DCs) also participate in the negative selection process but only after they have acquired PTA peptides from mTECs (Klein and Kyewski, 2000).

Mutations in the Aire gene sequence are strongly associated with autoimmune disease APECED in humans (Villaseñor et al. 2005; Rizzi et al. 2006; Gavanescu et al. 2007; Mathis and Benoist 2009; Akirav et al. 2011; Fierabracci 2011). The Aire knockout (KO) mouse model system confirmed the function of this gene in preventing aggressive autoimmunity because KO animals develop severe, multi-organ, tissue-specific autoimmunity (Anderson et al. 2002).

Nevertheless, we recently demonstrated that in addition to mutations, Aire expression downregulation is associated with T1D onset in NOD mice (Fornari et al. 2009) or downstream expression of PTA genes in mTECs (Macedo et al. 2009; Oliveira et al. 2013).

T1D development has been related to thymic insulin levels. Chentoufi and Polychronakos (2002) demonstrated that non-autoimmune mice with deficient levels of Ins2 expression in the thymus exhibited T1D susceptibility. Moreover, NOD mice demonstrated decreased Ins2 gene expression during T1D onset, and Ins2^{-/-} NOD mice have accelerated insulinitis and T1D progression (Fornari et al. 2009; Thebault-Baumont et al. 2003; Fan et al. 2009).

Based on these data, we hypothesized that alterations in Aire, PGE and/or specific PTA genes in mTECs might contribute to T1D susceptibility. To address this hypothesis, we compared the large-scale expression profile (PGE) of Aire and specific autoantigen genes in mTECs in the spontaneous T1D non-obese diabetic (NOD) model with BALB/c mice, which do not display autoimmunity.

Materials and methods

We used female non-obese diabetic (NOD) and BALB/c mice. The pre-diabetic NOD mice were five to six weeks old and the diabetic mice were seven months old. Diabetes was confirmed by blood glucose level measurement (≥ 250 mg glucose/dl) using the Accu Check Active Kit (Roche Diagnóstica Brasil, São Paulo, Brazil). The female NOD mice were born in specific pathogen free (SPF) conditions. The BALB/c mice were five to six week old or seven months old. All of the mice were born and maintained in a specific pathogen free (SPF) environment at the Special Mouse Facility, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil in temperature-controlled rooms (22°C) with 12 h dark/light cycles, and they received sterile water and food ad libitum. Experimental procedures followed ethical guidelines under strict guidance and approval from the University of São Paulo Ethics Committee for Animal Experimental Research (approval No. 117/2008).

Thymic stroma and mTEC isolation

Thymuses of NOD or BALB/c mice were dissected, and the thymic stroma was separated from the whole thymus as previously described (Gray et al. 2002). In brief, thymi were dissected and trimmed of fat and connective tissue. Tissue fragments were then gently agitated in 50 ml RPMI 1640 media at 4 °C with a magnetic stirrer for 30 min to remove the majority of thymocytes.

The resulting thymic fragments were then transferred to 10 ml fresh RPMI 1640 media, and the remaining thymocytes were dispersed by successive pipetting. The media was changed 2–3 times after agitation, and fragments were recovered by settling each time. The thymic fragments were then incubated in 5 ml 0.125% (w/v) collagenase type II and 0.1% DNase I (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in RPMI 1640 media at 37° C for 15 min and were gently agitated every 5 min with a 1 ml pipettor. After 3-4 digestions, whole stromal cells were pooled and centrifuged at 450 ×g for 5 min and were finally resuspended in 2 ml PBS. These cells were then used for total RNA preparation.

For mTEC isolation, we used a modified version of the protocol described by Kont et al. (2008). Briefly, whole stromal cells were obtained as described above, resuspended at a density of $1 \times 10^8/98 \mu\text{l}$ RPMI 1640, incubated with 2 μl rat anti-mouse IgG2a BP-1 antibodies (e-Bioscience, San Diego, CA, USA) for 15 min and mixed with anti-rat IgG magnetic micro beads (MACs Miltenyi Biotec Inc., Auburn, CA, USA) to remove CD45⁺ cortical thymic epithelial cells (cTECs). The cell fraction containing mTECs was obtained by positive selection using rat anti-mouse Epcam BP-1 antibodies (CD326, EGP40). After incubation with these antibodies, cells were mixed with anti-rat IgG magnetic micro beads and separated in magnetic columns (MACs Miltenyi Biotec). Cells were stained with phycoerythrin (PE)-labeled anti-CD80 antibodies and fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled anti-MHC class II antibodies and analyzed using a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences).

As standardized in our laboratory, CD80⁺ mTEC purity was $\geq 68\%$, and $\geq 27\%$ of these mTECs were CD80⁺ MHC class II⁺ (Oliveira et al. 2013). These cells were then used for total RNA preparation.

Total RNA preparation

Total RNA was extracted using the mirVana kit® (Ambion, Austin, TX, USA) according to the manufacturer's instructions. RNA preparations were confirmed to be free of protein and phenol by UV spectrophotometry. RNA degradation was assessed by microfluidic electrophoresis using Agilent RNA Nano 6000 chips and an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Only those RNA samples that were protein- and phenol-free with an RNA Integrity Number (RIN) ≥ 9.0 were selected for use in microarray and/or RT-PCR protocols.

Microarray hybridizations and data analysis

Changes in transcription levels were evaluated using the Agilent one-color (Cy3 fluorochrome labeled samples) microarray-based gene expression platform according to the

manufacturer's instructions. For messenger RNA hybridization to whole mouse genome 4× 44K 60-mer oligonucleotide arrays (G4122F, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), 500 ng total RNA was Cy3-labeled using the one-color Quick Amp labeling kit (Agilent Technologies). Samples of complementary RNA (cRNA) were hybridized to microarrays for 18 h at 42 °C in a rotator oven and then washed according to the manufacturer's instructions.

Microarray slides were then scanned using a DNA microarray scanner (Agilent Technologies), and the hybridization signals were extracted using the Agilent Feature Extraction software (version 10.5). Gene expression profiles from independent preparations of NOD or BALB/c mTECs were analyzed by comparing the microarray hybridizations of the respective samples.

A complete file including a set of all of the genes present in the microarrays used in this study and the experimental conditions is available online at the EMBL-EBI ArrayExpress public database (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>) under the accession number: E-MEXP 3881 (BALB/c x NOD). The quantitative microarray data were normalized to the 75th percentile and were analyzed using the Agilent GeneSpring GX 11.0 bioinformatics platform (www.agilent.com/chem/genespring) according to the default instructions. Hierarchical sample clustering was allowed based on *t-test* statistical analysis ($p < 0.01$) of genes with a fold change ≥ 1.4 and uncentered Pearson correlation metrics (Eisen et al., 1998). The similarities and dissimilarities in gene expression are presented as dendrograms, in which the branches pattern and length reflects the sample or gene relatedness and heat maps.

Chromosomal localization of PTA genes

The chromosomal localizations of PTA mRNAs that were up- or down-regulated in the NOD or BALB/c mTEC cells were accessed using the NCBI Map Viewer, available online at (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/>).

Quantitative reverse transcription real-time PCR (qRT-PCR)

The total RNA obtained from NOD or BALB/c mTECs was used to prepare cDNAs using SuperScript reverse transcriptase enzyme according to the manufacturer's instructions (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA).

Aire, Ins1, Ins2 and Gad1 and Gad2 gene expression was assessed by qRT-PCR. The cDNA sequences of these genes were retrieved from the NCBI GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>), and the Primer3 web tool (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) was used to select pairs of oligonucleotide primers that spanned an intron/exon junction with an optimal melting temperature of 60°C. The forward and

reverse sequences (presented in the 5' to 3' orientation) were as follows: Aire (GenBank acc NM_009646.1), GCAACTCTGGCCTCAAAGAG and GGTCTGAATTCCGTTTCCAA; Ins1 (GenBank acc NM_008386.3), GCAAGCAGGTCATTGTTTCA and GGGACCACAAAGATGCTGCTGTT; Ins2 (GenBank acc NM_008387.3) ACCTTCAGACCTTGGCACTG and GCTGGGTAGTGGTGGGTCTA; Gad1 (GenBank acc NM_008077.3) TCACCCTCGATTTTCAACC and AACAAACACGGGTGCAATTT; Gad2 (GenBank acc NM_008078.2) CGCACTCTGGAAGACAATGA and CTTGTCCCCTAAGGGTTGGT.

Gene expression was quantified using a StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA), and gene expression levels were normalized to the commonly used housekeeping gene GAPDH expression (GenBank acc NM_008084.2) that was measured using the primers GGGTGTGAACCACGAGAAAT and CCTTCCACAATGCCAAAGTT.

Histological examination

Thymus fragments of BALB/c or NOD mice (n = 3 per group) were dissected, and samples were embedded in Tissue-Tek ® (Sakura Finetek, USA, Inc.) and cut into 5 µm sections with a histo-cryomicrotome. Hematoxylin–eosin (H&E) staining was performed according to conventional protocol. Histological images were acquired using a Leica DM6000 M microscope that had been equipped with a Leica AF6000 Deconvolution System (Leica Microsystems).

Immunolocalization of AIRE protein in the thymic stroma

For immunofluorescence, BALB/c or NOD mice thymus fragments were excised, immediately sectioned and frozen in liquid nitrogen-chilled isopentane and stored accordingly at - 80° C. Immunolabeling was performed (5 µm-thick sections) using primary anti-AIRE antibody (anti-AIRE goat polyclonal antibody diluted 1:100 from Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) and anti-goat FITC-conjugated secondary antibody (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA). The nuclei were labeled with DAPI. For AIRE particle quantification, 10 microscopic fields (40x magnification) containing approximately 30% thymic cortex and 70% thymic medulla were examined, and the number of cells per field was calculated. The images were obtained using a Leica DM6000 M microscope that had been equipped with a Leica AF6000 Deconvolution System (Leica Microsystems).

Results

Comparison of the mTEC cell transcriptional expression profile from BALB/c and NOD mice

Dendrograms and heat-maps of microarray hybridizations of BALB/c or NOD mice mTEC RNA samples were constructed to identify changes in the gene expression profiles of non-autoimmune and T1D autoimmune mice, respectively (Figure 1).

Of the approximately 44,000 oligonucleotide probes that were present in the microarray used in this study, we focused initially on a set of PTA genes that encode T1D-specific autoantigens. We determined that the major Aire-dependent diabetes autoantigens Insulin 1 and 2 (Ins1 and Ins2) and Aire-independent genes Glutamate decarboxylase 1 and 2 (Gad1 and Gad2) and Islet cell autoantigen 1 (Ica1) were downregulated in NOD mTECs compared with BALB/c mice, whereas Histocompatibility 2 (IA-2) was up regulated in NOD mice mTEC cells.

Moreover, we have found that additional Aire-dependent PTA genes were modulated differently between these mouse strains. Three genes: Casein alpha (Csn1s1), Casein alpha s2-like A (Csn1s2a) and Insulin-like growth factor II (Igf2)) were up-regulated in NOD mice while seven other were downregulated: Major urinary protein 4 (Mup4), Cytochrome P450 1a2 (Cyp1a2), Lactotransferrin (Ltf), Prostaglandin D2 synthase (Ptgds), Neutrophilic granule protein (Ngp), Major urinary protein1(Mup1), Major urinary protein1 (Mup3) and Oxytocin (Oxt).

Figure 2 demonstrates microarray data confirmation by qRT-PCR. Ins1, Ins2, Gad1 and Gad2 gene expression was significantly lower in NOD than in BALB/c mTECs.

Aire transcriptional expression in mTEC cells from NOD and BALB/c mice as evaluated by qRT-PCR

Aire expression levels were different in pre-diabetic vs. seven month-old diabetic NOD mice, i.e., Aire levels were lower in pre-diabetic animals, increased significantly in 5 to 6 week-old mice, and decreased during the diabetic period (Figure 3).

Figure 4 demonstrates that Aire transcription levels were comparable in mTEC cells that were isolated from five to six week-old pre-diabetic NOD mice or BALB/c mice, confirming the microarray data.

Histological examination and AIRE protein immunolocalization in the thymic stroma

Examination of H&E histological staining demonstrated no discernible difference in thymic structure of BALB/c and NOD mice, as it was possible to identify the cortex and medulla (Figure 5). Immunofluorescence was used to measure AIRE protein levels in the BALB/c and NOD mice thymic stroma. AIRE protein immunofluorescence was identified in the thymic medulla of both mouse strains, but as strikingly reduced in NOD mice compared with BALB/c (Figure 6) mice. Moreover, the mean number of AIRE⁺ mTEC cells in the thymic stroma was reduced in NOD mice compared with BALB/c mice (Figure 7).

Discussion

Type 1 diabetes mellitus (TD1) in humans and non-obese diabetic (NOD) mice is similar and includes the presence of pancreas-specific auto-antibodies and autoreactive CD4⁺ or CD8⁺ T cell-mediated pancreatic islet beta-cell destruction. In NOD mice this autoreactive destruction occurs in 80–90% of female pups during the pre-diabetic period. Moreover, NOD mice demonstrate synteny to human chromosomal linkage groups that are associated with TD1 (Atkinson and Leiter 1999; Anderson and Bluestone 2005).

Thus, to date, NOD mice represent the choice animal model for studies of autoimmune diabetes and/or lack of autoantigen tolerance that is implicated by T1D autoreactivity (Castano et al. 1990; Atkinson and Leiter 1999; Anderson et al. 2005).

Central thymic tolerance plays an essential role in preventing aggressive autoimmunity because throughout mTEC presentation of PTAs to developing thymocytes, there is an enormous contribution to eliminate autoreactive thymocyte clones by inducing apoptosis in these cells (negative selection) (Anderson et al, 2002; Kont et al, 2008; Kuroda et al, 2005; Ramsey et al, 2002).

Thus, in mTECs, temporal coordination and accurate expression level regulation of genes that are implicated in the control of central tolerance (i.e., Aire and/or PTAs) is essential to prevent aggressive autoimmunity as in T1D.

To test this hypothesis, we compared broad promiscuous gene expression (PGE), Aire transcriptional expression, and major T1D-associated autoantigens such as Ins1, Ins2, Gad1, Gad2, Ica1, IA-2 in mTECs during two distinct phases in NOD mice (pre-diabetic and diabetic) and also between NOD and BALB/c mice, which served as a non-autoimmune control strain.

The comparative microarray transcriptome profiling of BALB/c and NOD mTECs demonstrated that the expression of genes characterizing PGE were opposite, i.e., in BALB/c mice these genes were up-regulated, but in NOD mice, this same set of genes was down-regulated and vice-versa (Figure 1). These results strongly indicated that control of transcriptional expression is different in these mice.

We then focused on specific genes that were directly related to the control of central tolerance. The results demonstrated that Ins1, Ins2, Gad1, and Gad2 autoantigen transcriptional expression is unbalanced (down-regulated) in NOD mice through the pre-diabetic period (Figure 2).

These autoantigens, when recognized by autoreactive T cells in the pancreas, trigger beta-cell islet destruction. In NOD mice, Insulin and GAD are considered to be initiating autoantigens, which are targeted by some of the earliest pathogenic T cell responses (Lieberman and DiLorenzo, 2003). In the periphery, Insulin is exclusively expressed in pancreatic beta-cells and is considered to be an essential autoantigen that is required to cause anti-islet autoimmunity and consequently T1D in NOD mice (Nakayama et al. 2005 and Brezar et al. 2011).

Unlike Insulin, GAD1 and GAD2 proteins are not pancreatic beta-cell specific, and they are in fact encoded by Gad1 (Gad67) and Gad2 (Gad65) genes. Up to 70% of T1D patients have antibodies directed towards GAD2, while approximately 10% of T1D patients present antibodies to GAD1 (Hagopian et al. 1993). In NOD mice, CD4⁺ T cell responses to GAD2 are noted as early as four weeks of age, through the pre-diabetic period (Kaufman et al. 1993).

The higher transcriptional expression of Aire that was observed over the pre-diabetic period of NOD mice (Figure 3) could make sense because this gene positively controls downstream Aire-dependent PTA genes.

Nevertheless, the transcriptional expression of Aire-dependent Ins1 and Ins2 and Aire-independent Gad 1 and Gad2 were inversely proportional to Aire (Figure 2). These data might have consequences because negative modulation of these autoantigens through the pre-diabetic period may cause defects in central T cell self-tolerance, which contributes to triggering autoimmune reactions in the periphery.

Taking into account the comparative results on mTEC transcriptional expression in pre-diabetic and diabetic periods of NOD mice, we concluded that these mice fail to temporally coordinate the expression of genes that are implicated in the control of central tolerance.

Furthermore, the inversely proportional link between Aire and PTA transcriptional expression was previously observed in a study that was performed in our laboratory. We demonstrated that *in vivo* intra-thymic Aire gene knockdown by siRNA, although slight, deregulates PTA transcriptional expression, suggesting that Aire-dependent PTA expression in mTECs is affected by fine changes in Aire expression (Oliveira et al., 2013).

Aire transcriptional levels in BALB/c and NOD mTECs were comparable (Figure 4), but the autoantigen genes that we focused on in this work were down-regulated in NOD mice. Because Aire protein immunofluorescence was strikingly reduced in the NOD mouse thymic stroma compared with BALB/c mice (Figure 6 and 7), we wondered whether Aire may be under an attenuating mechanism. As an example, microRNA action on Aire was recently reported by Matsuo et al (2013) in human IL-2-stimulated CD4⁺ T cells.

With this mechanism, the results obtained in this work open indicates that further studies on the post-transcriptional control acting on Aire in mTECs are warranted.

Figure legends

Figure 1. Hierarchical clustering of mTECs isolated from BALB/c or NOD mice. mRNAs that were modulated (up- or down-regulated) in BALB/c non-autoimmune mice compared with spontaneous T1D NOD mice. Data were collected from microarray hybridizations (gene modulation with fold-change ≥ 1.4). Dendrograms and heat maps were obtained using the Cluster TreeView program within the GeneSpring GX (Agilent) platform. Red: up-regulation, green: down-regulation, and black: unmodulated (Pearson correlation metrics, 75 percentile)

Figure 2. Quantitative real time PCR was used to confirm microarray the data. Transcriptional expression of Insulin (Ins1 or Ins2) and Glutamic acid decarboxylase (Gad1 or Gad2) genes in mTEC cells of BALB/c mice compared with NOD mice that were aged five to six weeks old confirm that the expression of these genes were significantly lower in NOD than BALB/c mice (Student's *t* test, $p < 0.05$)

Figure 3. Comparison of Aire transcriptional expression in mTEC cells of NOD mice during T1D development. qRT-PCR analyses revealed that Aire gene expression is lower in young mice, increases at 5-6 weeks of age and decreases during the diabetic period.

Figure 4. Evaluation of Aire transcriptional expression in mTEC cells of five- to six-week-old BALB/c compared with NOD mice by qRT-PCR. Aire transcriptional levels were comparable between the two strains. (Student's *t* test, $p < 0.05$).

Figure 5. Hematoxylin–eosin histological examination of BALB/c (A) or NOD (B) thymuses. No discernible differences were observed in thymic structures between the two strains (c = cortex, m = medulla). Scale bars indicate 100 μm , 20x magnification.

Figure 6. AIRE protein Immunolocalization in the thymus. The AIRE protein immunofluorescence signal was strikingly reduced in the thymic stroma of NOD (right) compared with BALB/c mice (left) (40 x). c = cortex, m = medulla, magnification 40x.

Figure 7. Number (mean) of AIRE⁺ mTEC cells in BALB-c or NOD mice thymic stroma (Student's *t* test, $p < 0.05$).

References

Nakayama, M., Abiru, N., Moriyama, H., Babaya, N., Liu, E., Miao, D., Yu, Li., Wegmann, D.R., Hutton, J.C., Elliott, J.F., Eisenbarth, G.S., 2005. Prime role for an insulin epitope in the development of type 1 diabetes in NOD mice. *Nature*. 435:220–3.

- Brezar V, Carel JC, Boitard C, Mallone R. Beyond the hormone: insulin as an autoimmune target in type 1 diabetes. *Endocr Rev* 2011;32:623–69.
- Lieberman, S.M., DiLorenzo, T.P. *Tissue Antigens*. 2003 Nov;62(5):359-77. A comprehensive guide to antibody and T-cell responses in type 1 diabetes.
- Brian Stadinski,¹ John Kappler,¹ and George S. Eisenbarth. Molecular Targeting of Islet Autoantigens. *Immunity*. 2010 Apr 23;32(4):446-56.
- Derbinski, J., Schulte, A., Kyewski, B., Klein, L., 2001. Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nat. Immunol.* 2, 1032–1039.
- Derbinski, J., Gäbler, J., Brors, B., Tierling, S., Jonnakuty, S., Hergenbahn, M., Peltonen, L., Walter, J., Kyewski, B., 2005. Promiscuous gene expression in thymic epithelial cells is regulated at multiple levels. *J. Exp. Med.* 202, 33–45.
- Kyewski, B., Derbinski, J., 2004. Self-representation in the thymus: an extended view. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 688–698.
- Macedo, C., Evangelista, A.F., Magalhães, D.A., Fornari, T.A., Linhares, L.L., Junta, C.M., Silva, G.L., Sakamoto-Hojo, E.T., Donadi, E.A., Savino, W., Passos, G.A., 2009. Evidence for a network transcriptional control of promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells. *Mol. Immunol.* 16, 3240–3244.
- Magalhães, D.A., Silveira, E.L., Junta, C.M., Sandrin-Garcia, P., Fachin, A.L., Donadi, E.A., Sakamoto-Hojo, E.T., Passos, G.A., 2006. Promiscuous gene expression in the thymus: the root of central tolerance. *Clin. Dev. Immunol.* 13, 81–99.
- Cheng, M.H., Shum, A.K., Anderson, M.S., 2007. What's new in the Aire? *Trends Immunol.* 28 (7), 321–327
- Mathis, D., Benoist, C., 2007. A decade of Aire. *Nat. Rev. Immunol.* 7 (8), 645–650.
- Mathis, D., Benoist, C., 2009. Aire. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 287–312.
- Kyewski, B., Peterson, P., 2010. Aire, master of many trades. *Cell* 140 (1), 24–26.
- Abramson, J., Giraud, M., Benoist, C., Mathis, D., 2010. Aire's partners in the molecular control of immunological tolerance. *Cell* 140 (1), 123–135.
- Anderson, M.S., Su, M.A., 2011. Aire and T cell development. *Curr. Opin. Immunol.* 23 (2), 198–206.
- Anderson, M.S., Venzani, E.S., Klein, L., Chen, Z., Berzins, S.P., Turley, S.J., von Boehmer, H., Bronson, R., Dierich, A., Benoist, C., Mathis, D., 2002. Projection of an immunological self-shadow within the thymus by aire protein. *Science* 298, 1395–1401
- Takahama Y (2006) Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nat Rev Immunol* 6(2):127–135

- Klein L, Kyewski B (2000) Self-antigen presentation by thymic stromal cells: a subtle division of labor. *Curr Opin Immunol* 12(2):179–186
- Pansky B, House EL, Cone LA. An insulin-like thymic factor: a preliminary report. *Diabetes* 1965;14:325–32.
- Geenen V, Achour I, Robert F, Vandersmissen E, Sodoyez JC, Defresne MP, et al. Evidence that insulin-like growth factor 2 (IGF2) is the dominant thymic peptide of the insulin superfamily. *Thymus* 1993;21:115–27
- Jolicœur C, Hanahan D, Smith K. T-cell tolerance toward a transgenic beta-cell antigen and transcription of endogenous pancreatic genes in the thymus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:6707–11. [24]
- Geenen V. The thymic insulin-like growth factor axis: Involvement in physiology and disease. *Horm Metab Res* 2003;35:656–63.
- Villaseñor, J., Benoist, C., Mathis, D., 2005. AIRE and APECED: molecular insights into an autoimmune disease. *Immunol. Rev.* 204, 156–164.
- Rizzi, M., Ferrera, F., Filaci, G., Indiveri, F., 2006. Disruption of immunological tolerance: role of AIRE gene in autoimmunity. *Autoimmun. Rev.* 5 (2), 145–147
- Gavanescu, I., Kessler, B., Ploegh, H., Benoist, C., Mathis, D., 2007. Loss of Aire dependent thymic expression of a peripheral tissue antigen renders it a target of autoimmunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104 (11), 4583–4587
- Mathis, D., Benoist, C., 2009. Aire. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 287–312.
- Akirav, E.M., Ruddle, N.H., Herold, K.C., 2011. The role of AIRE in human autoimmune disease. *Nat. Rev. Endocrinol.* 7 (1), 25–33.
- Fierabracci, A., 2011. Recent insights into the role and molecular mechanisms of the autoimmune regulator (AIRE) gene in autoimmunity. *Autoimmun. Rev.* 10 (3), 137–143.
- Fornari, T.A., Donate, P.B., Macedo, C., Marques, M.M.C., Magalhães, D.A., Passos, G.A., 2010. Age-related deregulation of Aire and peripheral tissue antigen genes in the thymic stroma of non-obese diabetic (NOD) mice is associated with autoimmune type 1 diabetes mellitus (DM-1). *Mol. Cell. Biochem.* 342, 21–28.
- Oliveira, E.H., Macedo, C., Donate, P.B., Almeida, R.S., Pezzi, N., Nguyen, C., Rossi, M.A., Sakamoto-Hojo, E.T., Donadi, E.A., Passos, G.A., 2013. Expression profile of peripheral tissue antigen genes in medullary thymic epithelial cells (mTECs) is dependent on mRNA levels of autoimmune regulator (Aire). *Immunobiol.* 218(1), 96-104
- Fan Y, Rudert WA, Grupillo M, He J, Sisino G, Trucco M. Thymus-specific deletion of insulin induces autoimmune diabetes. *Embo J* 2009;28:2812–24.

Thebault-Baumont K, Dubois-Lafargue D, Krief P, Briand JP, Halbout P, Vallon-Geoffroy K, et al. Acceleration of type 1 diabetes mellitus in proinsulin 2-deficient NOD mice. *J Clin Invest* 2003;111:851–7.

Gray, D.H., Chidgey, A.P., Boyd, R.L., 2002. Analysis of thymic stromal cell populations using flow cytometry. *J. Immunol. Methods* 260 (1–2), 15–28.

Kont, V., Laan, M., Kisand, K., Merits, A., Scott, H.S., Peterson, P., 2008. Modulation of Aire regulates the expression of tissue-restricted antigens. *Mol. Immunol.* 45 (1), 25–33.

Eisen, M.B., Spellman, P.T., Brown, P.O., Botstein, D., 1998. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 14863–14868.

Atkinson MA, Leiter EH. The NOD mouse model of type 1 diabetes: as good as it gets? *Nat Med.* 1999 Jun;5(6):601-4.

Anderson MS, Bluestone JA (2005) The NOD mouse: a model of immune dysregulation. *Annu Rev Immunol* 23:447–485.

Kuroda, N., Mitani, T., Takeda, N., Ishimaru, N., Arakaki, R., Hayashi, Y., Bando, Y., Izumi, K., Takahashi, T., Nomura, T., Sakaguchi, S., Ueno, T., Takahama, Y., Uchida, D., Sun, S., Kajiura, F., Mouri, Y., Han, H., Matsushima, A., Yamada, G., Matsumoto, M., 2005. Development of autoimmunity against transcriptionally unrepressed target antigen in the thymus of Aire-deficient mice. *J. Immunol.* 174 (4), 1862–1870

Ramsey, C., Bukrinsky, A., Peltonen, L., 2002a. Systematic mutagenesis of the functional domains of AIRE reveals their role in intracellular targeting. *Hum. Mol. Genet.* 11 (26), 3299–3308.

Brezar V, Carel JC, Boitard C, Mallone R. *Endocr Rev.* 2011 Oct;32(5):623-69. doi: 10.1210/er.2011-0010. Epub 2011 Jun 23. Beyond the hormone: insulin as an autoimmune target in type 1 diabetes.

Nakayama M, Abiru N, Moriyama H, Babaya N, Liu E, Miao D, Yu L, Wegmann DR, Hutton JC, Elliott JF, Eisenbarth GS. Prime role for an insulin epitope in the development of type 1 diabetes in NOD mice. *Nature.* 2005 May 12;435(7039):220-3.

Hagopian WA, Michelsen B, Karlsen AE, Larsen F, Moody A, Grubin CE, Rowe R, Petersen J, McEvoy R, Lernmark A. Autoantibodies in IDDM primarily recognize the 65,000-M(r) rather than the 67,000-M(r) isoform of glutamic acid decarboxylase. *Diabetes.* 1993 Apr;42(4):631-6.

Kaufman DL, Erlander MG, Clare-Salzler M, Atkinson MA, Maclaren NK, Tobin AJ. Autoimmunity to two forms of glutamate decarboxylase in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest.* 1992 Jan;89(1):283-92.

Kaufman DL, Erlander MG, Clare-Salzler M, Atkinson MA, Maclaren NK, Tobin AJ. Autoimmunity to two forms of glutamate decarboxylase in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1992; 89: 283–92.

Publicação

Expression profile of peripheral tissue antigen genes in medullary thymic epithelial cells (mTECs) is dependent on mRNA levels of autoimmune regulator (Aire)

Ernna H. Oliveira^a, Claudia Macedo^a, Paula B. Donate^a, Renata S. Almeida^a, Nicole Pezzi^a, Catherine Nguyen^b, Marcos A. Rossi^c, Elza T. Sakamoto-Hojo^d, Eduardo A. Donadi^e, Geraldo A. Passos^{a,f,*}

^a Molecular Immunogenetics Group, Department of Genetics, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo (USP), 14040-900 Ribeirão Preto, SP, Brazil

^b National Institute of Health and Medical Research (INSERM, U1090), 13100 Marseille, France

^c Department of Pathology, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo (USP), 14040-900 Ribeirão Preto, SP, Brazil

^d Department of Biology, Faculty of Philosophy, Sciences and Letters of Ribeirão Preto, University of São Paulo (USP), 14040-900 Ribeirão Preto, SP, Brazil

^e Department of Medical Clinics, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo (USP), 14040-900 Ribeirão Preto, SP, Brazil

^f Disciplines of Genetics and Molecular Biology (DMEF), Faculty of Dentistry of Ribeirão Preto, USP, 14040-904 Ribeirão Preto, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 August 2011

Received in revised form 2 February 2012

Accepted 7 February 2012

Keywords:

Autoimmune regulator (Aire) gene

Autoimmunity

siRNA

In vivo electroporation

Knockdown

Medullary thymic epithelial cells (mTECs)

ABSTRACT

In the thymus of non-obese diabetic (NOD) mice, the expression of the autoimmune regulator (Aire) gene varies with age, and its down-regulation in young mice precedes the later emergence of type 1 diabetes mellitus (T1D). In addition, the insulin (Ins2) peripheral tissue antigen (PTA) gene, which is Aire-dependent, is also deregulated in these mice. Based in these findings, we hypothesized that the imbalance in PTA gene expression in the thymus can be associated with slight variations in Aire transcript levels. To test this, we used siRNA to knockdown Aire by *in vivo* electro-transfection of the thymus of BALB/c mice. The efficiency of the electro-transfection was monitored by assessing the presence of irrelevant Cy3-labeled siRNA in the thymic stroma. Importantly, Aire-siRNA reached medullary thymic epithelial cells (mTECs) down-regulating Aire. As expected, the *in vivo* Aire knockdown was partial and transient; the maximum 59% inhibition occurred in 48 h. The Aire knockdown was sufficient to down-regulate PTA genes; however, surprisingly, several others, including Ins2, were up-regulated. The modulation of these genes after *in vivo* Aire knockdown was comparable to that observed in NOD mice before the emergence of T1D. The *in vitro* transfections of 3.10 mTEC cells with Aire siRNA resulted in samples featuring partial (69%) and complete (100%) Aire knockdown. In these Aire siRNA-transfected 3.10 mTECs, the expression of PTA genes, including Ins2, was down-regulated. This suggests that the expression profile of PTA genes in mTECs is affected by fine changes in the transcription level of Aire.

© 2012 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Introduction

The regulation of negative selection during the induction of self-tolerance in the thymus is dependent on genes expressed by medullary thymic epithelial cells (mTECs). In these cells, the transcription factor autoimmune regulator (Aire) regulates the expression of a large set of downstream genes; of these Aire-dependent genes, 45% encode peripheral tissue antigens (PTAs). These PTAs represent autoantigens expressed by diverse tissues and organs; therefore, this process, which is partially controlled

by the Aire gene, has been termed “promiscuous gene expression” (PGE) (Derbinski et al. 2001, 2005; Kyewski and Derbinski 2004; Magalhães et al. 2006; Cheng et al. 2007; Mathis and Benoist 2007, 2009; Macedo et al. 2009; Kyewski and Peterson 2010; Abramson et al. 2010; Anderson and Su 2011).

Exposure of differentiating thymocytes to a large variety of PTAs ensures the negative selection of highly self-reactive nascent T cell clones and prevents aggressive autoimmune reactions and consequently, the emergence of autoimmune diseases (Villaseñor et al. 2008; Irla et al. 2008a,b; Fierabracci 2011; Taniguchi and Anderson 2011; Anderson and Su 2011; Metzger and Anderson 2011). Dendritic cells (DCs) also participate in the negative selection process through Aire-mediated acquisition of PTA peptides from mTECs (Klein and Kyewski 2000; Derbinski et al. 2001; Kyewski and Derbinski 2004; Kyewski and Klein 2006; Takahama 2006; Holländer 2007; Irla et al. 2008a,b; Villaseñor et al. 2008).

* Corresponding author at: Molecular Immunogenetics Group, Department of Genetics, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, USP, 14040-900 Ribeirão Preto, SP, Brazil. Fax: +55 16 3602 0222.

E-mail addresses: passos@rge.fmrp.usp.br, geraldopassos@pq.cnpq.br (G.A. Passos).

Loss-of-function mutations in the human AIRE gene cause a recessive autoimmune syndrome termed autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED), which is characterized by chronic mucocutaneous candidiasis, hypoparathyroidism and adrenal insufficiency (Villaseñor et al. 2005; Rizzi et al. 2006; Gavanescu et al. 2007; Mathis and Benoist 2009; Akirav et al. 2011; Fierabracci 2011).

Aire-knockout (KO) and Aire-deficient mouse models have demonstrated the functional role of Aire, as these mice develop a relatively mild autoimmune syndrome featuring T cell hyperactivity, production of organ-specific autoantibodies and lymphocytic infiltrates and other anomalies (Anderson et al. 2002; Ramsey et al. 2002a,b; Kuroda et al. 2005; Pereira et al. 2005; Hubert et al. 2009). Moreover, studies using heterozygous Aire KO mice have demonstrated the dependence of PTA gene expression on Aire gene dosage (Liston et al. 2004; Kont et al. 2008).

The expression of Aire and the manifestation of autoimmune diseases in mice are also affected by genetic background; Aire-deficient NOD mice develop severe exocrine pancreatitis, which is not observed in Aire-deficient C57BL/6 or BALB/c mice. Epigenetic or stochastic mechanisms may be implicated in this variability (Jiang et al. 2005; Tykocinski et al. 2008).

Experiments using an artificial vector-based model system demonstrated that thymic Aire expression during the perinatal period is important to prevent autoimmunity in NOD mice (Gueraud-de-Arellano et al. 2009).

Recently, our group showed that in the thymic stroma of autoimmune non-obese diabetic (NOD) mice, the expression of the Aire gene varies with age and with emergence of type 1 diabetes mellitus (T1D). The down-regulation of this gene in young animals precedes the later emergence of T1D in adults. Furthermore, key PTA genes including insulin (*Ins2*) and glutamic acid decarboxylase (*Gad1*), which are involved in the negative selection of autoreactive thymocytes that recognize pancreatic antigens in the thymus, were also down-regulated in these mice (Fornari et al. 2010).

A mechanism explaining the role of AIRE protein in association with a set of other proteins in controlling gene expression in the thymus was recently proposed by Abramson et al. (2010). These authors showed that proteins involved with pre-mRNA processing, transcription, nuclear transport and chromatin binding/structure associate with AIRE protein during the nuclear control of PTA gene transcription.

Despite these findings, the relationship between transient variations in Aire gene transcription and transcription levels of PTAs remains poorly understood. The previously reported data led us to the hypothesis that not only mutations or KO model system, that totally suppress the function of Aire, but also variations in the expression of this gene can disturb genes that code PTAs in the thymus.

Because Aire-deficient and Aire-KO mice do not express Aire in the thymus at any point during their lifespan, these models cannot adequately represent the consequences of slight or transient changes in the expression of this gene.

Therefore, to assess our hypothesis, we used *in vivo* intra-thymic electro-transfection of small interfering RNA (siRNA) to induce transient changes in the transcription levels of the Aire gene in non-autoimmune BALB/c mice and evaluated the consequences of these transient changes in Aire expression on PTA genes in the thymus.

Materials and methods

Mice

Five- to six-week-old female BALB/c mice weighing 18–22 g were used for experiments. Animals were housed in the Central

Animal Facility of the Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil in temperature-controlled rooms (22 °C) with 12-h dark/light cycles and received water and food *ad libitum*. Experimental procedures followed ethical guidelines under strict guidance and approval from the University of São Paulo Ethics Committee for Animal Experimental Research (Protocol # 117/2008).

Medullary thymic epithelial cell line (mTEC)

The medullary 3.10 TEC line (3.10 mTEC) was kindly provided by Dr. W. Savino (Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro, Brazil). This TEC line was established from C57BL/6 mice, and the medullary phenotype was determined by immunostaining with Th-3 and Th-4 antibodies, which recognize cortical and medullary phenotypes, respectively (Hirokawa et al. 1986; Mizuochi et al. 1992).

These cells were further evaluated using a panel of anti-cytokeratin monoclonal antibodies, which confirmed the original distinct medullary phenotype (Werneck et al. 2000). Cells were cultured in RPMI 1640 medium containing 10% fetal bovine serum at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere.

Aire small interfering RNA (Aire siRNA) sequence

We used the TriFecta (IDT, Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA) anti-Aire RNAi sequence (GGAUUCUCUUUAAG-GACUACAAUCTAGAUUGUAGUCCUUAAGAGAAUCCUC) to silence Aire mRNA *in vivo* by thymic electro-transfection of BALB/c mice, as described below, or *in vitro* by liposome-mediated transfection of 3.10 mTEC cells as previously described (Macedo et al. 2009). Irrelevant Cy3(*)-labeled siRNA (T*CCUCCUCUCUUUCUCCCUUGUG*AT*CACAAGGGAGAGAAAGAGAGGAAGG*A) was used to monitor the efficiency of *in vivo* thymic electro-transfection by confocal microscopy (Fig. 1). Unlabeled irrelevant siRNA was used to monitor the side effects of RNA uptake.

Silencing Aire gene transcript

In vitro liposome-mediated transfection of 3.10 mTEC cells

Cells were transfected using a protocol previously standardized in our laboratory (Macedo et al. 2009). Briefly, confluent 3.10 mTEC cultures were transfected with 10 nM of Aire siRNA using HiPerfect reagent (Qiagen, GmbH, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. After transfection, the cells were cultured for 24 h in RPMI as described above. Total RNA was then extracted using the mirVana kit® (Ambion, Austin, TX, USA) and used as a template for cDNA synthesis and confirmation of gene knockdown by quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR).

In vivo electro-transfection of the thymus

Thymus electro-transfection (also referred to as electroporation) was performed based on a previously published protocol (Irla et al. 2008a,b); however, in this study, we used siRNA. Briefly, mice were anesthetized by intraperitoneal injection with a mixture of ketamine (100 mg/kg body weight) and xylazine (10 mg/kg body weight). A crocodile clip corresponding to the cathode was used to establish skin contact on the paw opposite to the injection site. A 0.33-mm diameter injection needle was introduced between the first and the second rib, where the thymus is located, at a 45° angle from the longitudinal axis. We observed that inserting the needle 5 mm was necessary and sufficient to reach the thymus without affecting proximal vital organs such as the heart and lungs.

After insertion of the needle, 5 µl of sterile phosphate-buffered saline (PBS) or 5 µl of sterile PBS containing 5 µg of Aire siRNA or irrelevant siRNA was slowly injected into each thymic lobe (5 µg siRNA per lobe, total 10 µg siRNA per thymus), and an electrical current of five 20-ms pulses of 300 V was immediately applied using a

Fig. 1. Histological examination of BALB/c thymus by fluorescent confocal microscopy after *in vivo* thymus electro-transfection. (A) Thymus electroporated with PBS buffer (control) or B) electro-transfected with irrelevant siRNA-Cy3 (red). siRNA-Cy3 was localized to both the cytoplasm and the nucleus of the stromal cells. The nucleus was stained with DAPI (blue). Magnification 63 $\times$. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

standard square wave electroporator (Model ECM 830, BTX[®] Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA).

Animals were sacrificed by CO₂ inhalation 24, 48 and 72 h after electro-transfection, and thymuses were immediately removed by surgery and processed for whole thymic stroma preparation and mTEC isolation. All experiments were carried out in triplicate.

To monitor the efficiency of electro-transfection, 5 μ g of naked siRNA-Cy3 diluted in 5 μ l PBS or only PBS (control) was injected into each thymic lobe, and mice were electro-transfected. Thymuses were harvested 1 hour after electro-transfection and processed for histological analysis by confocal microscopy.

Fluorescent confocal microscopy

Following siRNA-Cy3 or PBS electro-transfection, thymuses were dissected and incubated for 15 min with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)-DNA staining solution, and samples were embedded in Tissue-Tek[®] (Sakura Finetek, USA, Inc.) and cut into 5- μ m sections with a histo-cryomicrotome. Fluorescent images were acquired using a Leica TCS SP5 confocal microscope with a 556–570-nm bandpass filter set to view Cy3 and a 420-nm long-pass filter set to view DAPI. All images were obtained using the same exposure time and magnification.

Histological examination

Control or PBS electro-transfected thymuses were dissected, and samples were embedded in Tissue-Tek[®] (Sakura Finetek, USA, Inc.) and cut into 5- μ m sections with a histo-cryomicrotome. Staining with hematoxylin–eosin (H&E) were performed according to conventional protocol. All histological images were acquired using a common light photo-microscope with the same exposure time and magnification.

Thymic stroma and mTEC isolation

Following intervals of 24, 48 and 72 h after electro-transfection, thymuses were dissected, and the thymic stroma was separated from the whole thymus, as previously described (Gray et al. 2002). In brief, thymi were dissected and trimmed of fat and connective tissue. Tissue fragments were then gently agitated in 50 ml of RPMI 1640 medium at 4 $^{\circ}$ C with a magnetic stirrer for 30 min to remove the majority of thymocytes. The resulting thymic fragments

were then transferred to 10 ml of fresh RPMI 1640 medium, and the remaining thymocytes were dispersed by successive pipetting. The medium was changed 2–3 times after agitation, and fragments were recovered by settling each time. The thymic fragments were then incubated in 5 ml of 0.125% (w/v) collagenase type II and 0.1% DNase I (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in RPMI 1640 medium at 37 $^{\circ}$ C for 15 min and gently agitated every 5 min with a 1-ml pipettor. After 3–4 digestions, whole stromal cells were pooled and centrifuged at 450 $\times$ g for 5 min and finally resuspended in 200 μ l PBS. These cells were then used for total RNA preparation.

For isolation of mTECs, we used a modified version of the protocol described by Kont et al. (2008). Briefly, whole stromal cells were obtained as described above, resuspended at a density of $1 \times 10^8/98 \mu$ l RPMI 1640, incubated with 2 μ l rat anti-mouse IgG2a BP-1 antibody (e-Bioscience, San Diego, CA, USA) for 15 min and mixed with anti-rat IgG magnetic micro beads (MACs Miltenyi Biotec Inc., Auburn, CA, USA) to remove CD45⁺ cortical thymic epithelial cells (cTECs). The cell fraction containing mTECs was obtained by positive selection using rat anti-mouse Epcam BP-1 (CD326, EGP40). After incubation with this antibody, cells were mixed with anti-rat IgG magnetic micro beads and separated in columns with a magnetic field (MACs Miltenyi Biotec).

The cells were stained with a phycoerythrin (PE)-labeled anti-CD80 antibody and a fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled anti-MHC class II antibody and analyzed using a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences). The purity of CD80⁺ mTECs was $\geq 68\%$, and $\geq 27\%$ of these mTECs were CD80⁺ MHC class II⁺. These cells were then used for total RNA preparation.

Total RNA preparation and quantitative reverse transcription real-time PCR (qRT-PCR)

Total RNA was extracted using the mirVana kit[®] (Ambion, Austin, TX, USA) according to the manufacturer's instructions. RNA preparations were confirmed to be free of proteins and phenol by UV spectrophotometry.

RNA degradation was assessed by microfluidic electrophoresis using Agilent RNA Nano 6000 chips and an Agilent 2100 Bio-analyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Only RNA samples that were free of proteins and phenol and that had an RNA Integrity Number (RIN) ≥ 9.0 were selected for cDNA synthesis using SuperScript reverse transcriptase enzyme according to the

manufacturer's instructions (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA).

The transcriptional levels of Aire and the autoantigen genes (Ins2 and Gad1) were assayed by qRT-PCR. The Primer3 web tool (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) was used to select pairs of oligonucleotide primers spanning an intron/exon junction with an optimal melting temperature of 60°C.

The cDNA sequences of these genes were retrieved from the NCBI GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=nucore&itool=toolbar>). The forward and reverse sequences (presented in the 5' to 3' orientation) were as follows: Aire (GenBank acc NM_009646.1), GCAACTCTGGCTCAAAGAG and GGTCTGAATTCGGTTTCCAA and Ins2 (GenBank acc NM_008387.3), ACCTTCAGACCTTGGCACTG and GCTGGGTAGTGGTGGGTCTA.

Expression of the genes was quantified using a StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA), and gene expression levels were normalized to the expression of the housekeeping gene GAPDH (GenBank acc NM_008084.2, GGGTGTGAACACGAGAAAT and CCTTCCACAATGCCAAAGTT), which is commonly used as a reference.

Microarray hybridizations and data analysis

Changes in gene expression were also evaluated using the Agilent one-color (Cy3 fluorochrome) microarray-based gene expression platform according to the manufacturer's instructions. For hybridizations of messenger RNA to whole mouse genome 4×44K 60-mer oligonucleotide arrays (G4122F, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), 500 ng total RNA was labeled with the one-color Quick Amp labeling kit (Agilent Technologies). Samples of complementary RNA (cRNA) were hybridized for 18 h at 42°C in a rotator oven and washed. The array slides were scanned using a DNA microarray scanner (Agilent Technologies), and the hybridization signals were extracted using the Agilent Feature Extraction software (version 10.5). Gene expression profiles from independent preparations of control and Aire siRNA electro-transfected mTECs were analyzed by comparing the microarray hybridizations of the respective samples.

A complete file including all of the genes present in the microarrays used in this study, as well as the experimental conditions, is available online in the MIAME public database (<http://www.ebi.ac.uk/miameexpress>). ArrayExpress accession numbers: E-MEXP 3343 (*in vivo* Aire siRNA knockdown) and E-MEXP 3213 (*in vitro* Aire siRNA knockdown).

The quantitative microarray data were normalized to the 75th percentile and were analyzed using the Agilent GeneSpring GX bioinformatics platform (www.agilent.com/chem/genespring) according to the default instructions. Hierarchical clustering of

samples was allowed based on ANOVA statistical analysis ($p < 0.01$) of genes with fold change ≥ 1.6 and an uncentered Pearson correlation metric (Eisen et al. 1998). The similarities and dissimilarities in gene expression are presented as dendrograms, in which the pattern and length of the branches reflect the relatedness of the samples or genes, and heat maps.

Identification of peripheral tissue antigen genes

Microarray data analysis was used to assess gene expression based on combined information from the BioGPS (www.biogps.org) and SOURCE (<http://smd.stanford.edu/cgi-bin/sourceSearch>) public databases. These databases provide gene annotation enrichment analysis and functional analysis of microarray data and include sequences of cDNA clones from different organ/tissues, enabling us to group genes based on tissue representation.

Results

Monitoring *in vivo* thymic electro-transfection-mediated delivery of siRNA-Cy3

Fluorescent confocal microscopy images revealed no red fluorescence in thymuses electro-transfected with PBS (Fig. 1a). In contrast, electro-transfection effectively delivered the siRNA-Cy3 sequence to the thymic stroma. We also noted that 1 hour after the electro-transfection procedure siRNA-Cy3 was localized to both the cytoplasm and the nucleus of thymic stromal cells (Fig. 1b). Examination of H&E histological staining confirmed that the electro-transfection procedure did not affect the main thymic structure, as both the cortical and medullary compartments were preserved (Fig. 2).

In vivo thymic gene knockdown is Aire-specific and extends to mTECs

After demonstrating by fluorescence histology that *in vivo* electro-transfection is an effective method to induce uptake of siRNA by the thymus, qRT-PCR was used to measure Aire mRNA levels at different times.

Analysis of RNA (cDNA) from the whole thymic stroma demonstrated that Aire gene knockdown was effective (Fig. 3). Furthermore, we observed that the effect of siRNA-mediated knockdown of Aire was transient; the inhibition of Aire expression peaked at 59% 48 h after electro-transfection, and normal transcription levels were restored within 72 h.

To show that the thymic siRNA electro-transfection procedure itself did not affect Aire expression, a group of mice was

Fig. 2. Histological examination of BALB/c thymus by hematoxylin-eosin staining. (A) Control thymus or (B) thymus electroporated with PBS buffer. Note that the cortical and medullary thymic compartments are preserved after electroporation procedure. Magnification 40× (c = cortex, m = medulla).

Fig. 3. Time-course of *in vivo* thymic Aire knockdown. Aire transcriptional expression in thymic stroma was assayed by qRT-PCR at time points 24, 48 and 72 h after Aire siRNA electro-transfection. The decrease in Aire expression peaked at 48 h (59% Aire knockdown). Within 72 h after electro-transfection, the levels of the Aire transcript were normal (Student's *t* test, $p < 0.05$).

electro-transfected with unlabeled irrelevant siRNA. Fig. 4 shows that 48 h after electro-transfection with irrelevant siRNA, the levels of Aire mRNA were comparable to those in control mice that were electro-transfected with only PBS, as evaluated by qRT-PCR.

To evaluate whether the knockdown process affected the thymic medulla, mTECs were isolated from thymic stroma 48 h after electro-transfection. Fig. 5 shows that Aire was down-regulated approximately 63% in mTECs upon electro-transfection of Aire siRNA.

Total RNA extracted from Aire knockdown mTECs was used for further qRT-PCR and microarray analyses.

Fig. 4. Aire expression levels as determined by qRT-PCR in thymic stroma electro-transfected with PBS (control) or with irrelevant siRNA. The electro-transfection procedure itself did not affect Aire transcriptional expression (Student's *t* test, $p < 0.05$).

Fig. 5. Aire transcriptional expression levels were analyzed by qRT-PCR in mTECs isolated from thymic stroma 48 h after electro-transfection with Aire siRNA. Aire expression was decreased by 63% in Aire siRNA-electro-transfected samples when compared to control samples (electroporated with PBS buffer) (Student's *t* test, $p < 0.05$).

In vitro Aire gene knockdown in an mTEC cell line

Using the 3.10 mTEC cell line, we demonstrated that *in vitro* siRNA-mediated Aire gene knockdown was very efficient. We were able in obtaining a sample of cells in which Aire expression was reduced 69% (Fig. 6) and a sample with Aire expression reduced 100% (Fig. 7), 48 h after transfection. Total RNA extracted from Aire siRNA-transfected 3.10 mTEC cells was used for further qRT-PCR and microarray analyses.

Effect of Aire knockdown on PTA gene expression

To evaluate the effect of Aire knockdown on PTA genes, we used RNA samples (cDNAs) extracted from mTECs from the thymuses of control and Aire siRNA-electro-transfected mice. In addition, we used RNA samples extracted from control and Aire siRNA-transfected 3.10 mTEC cells.

Of the 44,000 oligonucleotides present in the microarray used in this study, we focused on a set of 10 Aire-dependent PTA genes (Table 1) (Anderson et al. 2002) that were modulated in both the *in vivo* and *in vitro* model systems.

Fig. 6. Partial silencing of Aire upon *in vitro* transfection of 3.10 mTEC cells with Aire siRNA compared to control samples (transfected with PBS buffer), as determined by qRT-PCR (Student's *t* test, $p < 0.05$).

Fig. 7. Complete silencing of Aire upon *in vitro* transfection of 3.10 mTEC cells with Aire siRNA, compared to control samples (transfected with PBS buffer) as determined by qRT-PCR (Student's *t* test, $p < 0.05$).

Dendrograms and heat-maps from microarray hybridizations indicate that upon *in vivo* thymic electro-transfection with Aire siRNA, which resulted in partial (63%) silencing of the Aire gene in mTECs, PTA genes, such as insulin (Ins2), were up-regulated (1.6 fold-change). Conversely, upon *in vitro* transfection of 3.10 mTEC cells with Aire siRNA, which completely (100%) silenced the Aire gene, the PTA genes were down-regulated (1.6 fold-change) (Fig. 8a and b, respectively).

To confirm the effect of *in vitro* Aire knockdown on gene expression of 3.10 mTEC cells, we analyzed the expression of the Ins2 gene, which is considered an Aire-dependent PTA, by qRT-PCR. Fig. 9

Table 1

Peripheral tissue antigen (PTA) gene representation and their regulation in mTEC cells after *in vivo* or *in vitro* Aire knockdown. Data were collected from microarray hybridizations (gene modulation with fold-change ≥ 1.6).

PTA gene (symbol)	Tissue representation	Aire gene knockdown	
		<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>
Collagen, type II, alpha 1 (Col2a1)	Osteoblasts and bone	Up	Down
Cytochrome P450 1a2 (Cyp1a2)	Lung and liver	Up	Down
Insulin-like growth factor II (Igf2)	Placenta, umbilical-cord, mammary gland, salivary-gland, osteoblasts, brain	Up	Down
Insulin I (Ins1)	Pancreas	Up	Down
Insulin II (Ins2)	Pancreas	Up	Down
Major urinary protein 1 (Mup1)	Mammary gland, lung, placenta, uterus, ovary, bladder, epidermis, stomach, adipose tissue, adrenal gland, skeletal muscle, heart, liver, brain, lymph nodes, DP and SP thymocytes	Up	Down
Major urinary protein 3 (Mup3)	Mammary gland, adipose tissue, lung, adrenal gland, liver	Up	Down
Major urinary protein 4 (Mup4)	Salivary gland and lacrimal gland	Up	Down
Salivary protein 1 (Spt1)	Salivary gland	Up	Down
Neutrophilic granule protein (Ngp)	DP thymocytes, mast cells, granulocytes, osteoblasts, lymph nodes, bone marrow, bone	Down	Down

Fig. 8. Hierarchical clustering of mTECs isolated from (A) *in vivo* Aire siRNA-electro-transfected thymuses and (B) *in vitro* Aire siRNA-electro-transfected 3.10 mTEC cells. The peripheral tissue antigen (PTA) genes were up-regulated when Aire was partially (63%) silenced by *in vivo* thymic electro-transfection. Conversely, when Aire was fully (100%) silenced in 3.10 mTEC cells, the PTA genes were down-regulated. The significant and differentially expressed genes were selected using Student's *t* test specifically adapted for microarray data following construction of dendrograms and heat-maps, which were obtained using the Cluster TreeView program within the GeneSpring GX (Agilent) platform. Red: upregulation, green: downregulation, and black: unmodulated (Pearson correlation metrics, 75 percentile). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

shows that Ins2 was down-regulated when Aire was partially (69%) as well as fully knocked down (100% silenced) (Fig. 10).

Fig. 11 confirms that the expression of the Ins2 gene was up-regulated in mTECs isolated from mice following thymic electro-transfection with Aire siRNA, which resulted in a 63% silencing of Aire.

Discussion

In this study, we assessed the hypothesis that the deregulation of PTA genes in the thymus, which may cause the loss of self-tolerance,

Fig. 9. Modulation of insulin (Ins2) transcriptional expression in 3.10 mTEC cells transfected *in vitro* with Aire siRNA compared to control samples (transfected with PBS buffer), as determined by qRT-PCR. The Ins2 gene was down-regulated in mTECs displaying a partial knockdown of Aire (69% silencing) (Student's *t* test, $p < 0.05$).

Fig. 10. Modulation of insulin (Ins2) transcriptional expression in 3.10 mTEC cells transfected *in vitro* with Aire siRNA compared to control samples (transfected with PBS buffer), as determined by qRT-PCR. The Ins2 gene was down-regulated in mTECs displaying a complete knockdown of Aire (100% silencing) (Student's *t* test, $p < 0.05$).

Fig. 11. Up-regulation of insulin (Ins2) transcriptional expression in mTECs displaying a partial knockdown of Aire (63% silencing) after *in vivo* thymic electro-transfection of Aire siRNA, compared to control sample (electroporated with PBS buffer), as determined by qRT-PCR (Student's *t* test, $p < 0.05$).

might be caused not only by a complete deficiency in the expression of the Aire gene, but also by slight variations in its transcription levels.

The role played by the Aire gene in the positive control of PTA genes was previously demonstrated using Aire-knockout (KO) and Aire-deficient mice (Anderson et al. 2002; Derbinski et al. 2005). Moreover, studies using heterozygous Aire KO mice have demonstrated the dependence of PTA gene expression on Aire gene dosage (Kont et al. 2008).

Recently, we used unmanipulated NOD mice, which spontaneously develop autoimmune T1D, to demonstrate that the transcriptional expression of Aire in the thymus varies with age and that its down-regulation in young animals precedes the late onset of T1D. Young NOD mice that display down-regulation of Aire show increased levels of transcriptional expression of insulin (Ins2) in the thymus (Fornari et al. 2010). As expression of the Ins2 gene has been shown to be Aire-dependent, this finding was somewhat surprising.

This finding encouraged us to develop a model system in which the transcriptional levels of Aire in the thymus could be subtly manipulated *in vivo*.

In a knockout mouse, a segment of the genomic DNA is disrupted, and expression of the affected gene is completely abolished; thus, in our point of view, KO mice are not a suitable model system for these studies. Furthermore, because naked siRNAs do not integrate into the genome and consequently do not disrupt DNA sequences that may be important for the function of the transcriptional machinery as a whole, we decided to use siRNA-mediated gene knockdown, which preserves the gene in the genome but causes transient degradation of the chosen mRNA.

We hypothesized that the thymus could be efficiently transfected with Aire siRNA, resulting in Aire gene knockdown. As an outcome, we hypothesized that the expression of Aire-dependent PTA genes could be affected.

To test these hypotheses, we assayed the expression of 10 Aire-dependent PTA transcripts in samples from mTECs subjected to either *in vivo* or *in vitro* Aire gene knockdown.

Fluorescent imaging of histological samples (Fig. 1) validated the possibility of *in vivo* thymic electro-transfection. Importantly, siRNA-Cy3 reached both the cytoplasm and the nucleus of thymic stromal cells, which have been shown to carry out the positive and negative selection of autoreactive thymocytes (Klein and Kyewski 2000; Magalhães et al. 2006; Klein et al. 2009). Notably, the cortical and medullary thymic compartments were preserved after 48 h of electro-transfection procedure, as shown by histological H&E staining (Fig. 2).

qRT-PCR analysis of thymic stroma revealed that 48 h after electro-transfection of Aire siRNA, Aire mRNA levels were significantly reduced (Fig. 3).

The Aire siRNA electro-transfection process was specific in this effect, as control mice that were electro-transfected with only PBS or irrelevant siRNA did not demonstrate a significant reduction in Aire mRNA levels (Fig. 4). Moreover, qRT-PCR analysis demonstrated that *in vivo* Aire knockdown affected mTECs (Fig. 5).

We previously demonstrated the efficiency of *in vitro* Aire knockdown in 3.10 mTEC cells (Macedo et al. 2009). In this study, we analyzed RNA (cDNA) samples from 3.10 mTEC cells and demonstrated the possibility of partial (69%) (Fig. 6) and 100% silencing of Aire (Fig. 7).

In contrast to the constitutively Aire deficient mouse model (Aire^{-/-}), in which the organization and composition of the thymic medulla is altered (Gillard et al. 2007), H&E staining of tissue sections demonstrated that the *in vivo* Aire knockdown model system we developed in this study did not cause changes in the thymic structure. The 48-h period of transient Aire knockdown was not sufficient to affect the structure of the thymic stroma and medulla.

The inability of this transient loss of Aire expression to alter thymic structure was likely due to our finding that 72 h after electro-transfection, Aire mRNA levels were fully restored.

Together, these findings demonstrate the establishment of transient *in vivo* down-regulation of Aire mRNA levels as an appropriate model system for our study.

The Aire gene positively controls the expression of a large set of PTA genes that characterize differentiated cells in mTECs (Ramsey et al. 2002a,b; Pitkänen and Peterson 2003; Derbinski et al. 2005).

Based in these data, we evaluated the effect of Aire knockdown on 10 Aire-dependent PTA genes (Fig. 8 and Table 1).

Our results revealed that the transcriptional levels of these genes were increased after *in vivo* Aire knockdown but decreased after *in vitro* Aire knockdown. The only PTA gene that was down-regulated after both *in vivo* and *in vitro* Aire knockdown was neutrophilic granule protein (Ngp), suggesting that its expression is strictly Aire-dependent (Table 1).

Interestingly, we were able to reproduce the imbalance in the expression of PTA genes that occurs in the thymus of NOD mice during the development of T1D in BALB/c mice. The young pre-diabetic NOD mice display transcriptional down-regulation of Aire in the thymus, and as a consequence, the mRNA levels of PTA genes were increased in these mice (Fornari et al. 2010).

At first glance, these findings seem contradictory, as Aire is considered a positive regulator of PTA genes. Thus, we hypothesized that the transcriptional profile of PTAs is dependent on the expression level of Aire.

Importantly, the results obtained with 3.10 mTEC cells (Figs. 9 and 10) demonstrate that the Aire-dependent PTA Ins2 is down-regulated after partial (69%) and fully (100%) silencing of Aire, corroborating findings of studies using Aire KO mice (Anderson et al. 2002).

Despite performing several assays, it has been impossible thus far to achieve 100% Aire knockdown by *in vivo* electro-transfection of the thymus. Nevertheless, our finding that the Ins2 gene is up-regulated when Aire is partially knocked down *in vivo* (Fig. 11) suggests that this kind of regulation occurs in both *in vitro* and *in vivo*.

These results show that levels of Aire mRNA differentially modulate PTA genes both *in vitro* and *in vivo*. As mTEC cells of the *in vivo* experiments were obtained from BALB/c mice and of the *in vitro* experiments we used the 3.10 cell line (C57BL/6 background) this effect seems to be affected by genetic background.

Therefore, these results demonstrate that the levels of PTA transcripts are affected by subtle changes in Aire mRNA levels, confirming our hypothesis.

The precise mechanism underlying this phenomenon was not investigated in this study, but considering recent evidence showing that Aire plays a role in a cascade involving other genes, such as Gucy2d (Macedo et al. 2009), and that AIRE protein interacts with other proteins, including TOP2a and DNA-PK (Abramson et al. 2010; for review see Danso-Abeam et al. 2011) it is possible that in the presence of decreased levels of Aire, these partners may compensate for the partial loss of Aire in controlling gene expression.

When Aire is partially or completely down-regulated *in vitro* (Figs. 6 and 7, respectively) or completely absent *in vivo*, as observed in Aire-KO mice (Anderson et al. 2002), are PTA genes down-regulated.

In conclusion, we provide the first demonstration of *in vivo* thymic delivery of siRNA by electro-transfection (electroporation), resulting in a functional knockdown of Aire gene expression.

Using this model system, we demonstrate that Aire knockdown in the thymus of non-autoimmune BALB/c mice mimics the PTA expression profile observed during onset of autoimmune T1D in NOD mice and that slight variations in the expression of the Aire transcript influence the expression levels of PTA genes.

These results provide a new perspective for further studies of the function of genes involved in immune tolerance manipulating the intact thymus.

Acknowledgments

This study was funded by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) Brazil. We thank Dr. Livia M.R. Moda and Dr. Roy E. Larson (Dept. of Cell Biology, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, USP) and Dr. Maria Jose A. Rocha and MSc Fabio Alves Aguilá (Dept. of Morphology, Faculty of Dentistry of Ribeirão Preto, USP) for the facilities on confocal microscopy analysis, Ms Monica A. Abreu (Dept. of Pathology, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, USP) for the H&E histological analysis of the electro-transfected thymuses.

References

- Abramson, J., Giraud, M., Benoist, C., Mathis, D., 2010. Aire's partners in the molecular control of immunological tolerance. *Cell* 140 (1), 123–135.
- Akbar, E.M., Ruddle, N.H., Herold, K.C., 2011. The role of AIRE in human autoimmune disease. *Nat. Rev. Endocrinol.* 7 (1), 25–33.
- Anderson, M.S., Venanzi, E.S., Klein, L., Chen, Z., Berzins, S.P., Turley, S.J., von Boehmer, H., Bronson, R., Dierich, A., Benoist, C., Mathis, D., 2002. Projection of an immunological self-shadow within the thymus by aire protein. *Science* 298, 1395–1401.
- Anderson, M.S., Su, M.A., 2011. Aire and T cell development. *Curr. Opin. Immunol.* 23 (2), 198–206.
- Cheng, M.H., Shum, A.K., Anderson, M.S., 2007. What's new in the Aire? *Trends Immunol.* 28 (7), 321–327.
- Danso-Abeam, D., Humblet-Baron, S., Dooley, J., Liston, A., 2011. Models of Aire-dependent gene regulation for thymic negative selection. *Front. Immunol.* 2, 1–8.
- Derbinski, J., Schulte, A., Kyewski, B., Klein, L., 2001. Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nat. Immunol.* 2, 1032–1039.
- Derbinski, J., Gähler, J., Brors, B., Tierling, S., Jonnakuty, S., Hergenrohn, M., Peltonen, L., Walter, J., Kyewski, B., 2005. Promiscuous gene expression in thymic epithelial cells is regulated at multiple levels. *J. Exp. Med.* 202, 33–45.
- Eisen, M.B., Spellman, P.T., Brown, P.O., Botstein, D., 1998. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 14863–14868.
- Fierabracci, A., 2011. Recent insights into the role and molecular mechanisms of the autoimmune regulator (AIRE) gene in autoimmunity. *Autoimmun. Rev.* 10 (3), 137–143.
- Fornari, T.A., Donate, P.B., Macedo, C., Marques, M.M.C., Magalhães, D.A., Passos, G.A., 2010. Age-related deregulation of Aire and peripheral tissue antigen genes in the thymic stroma of non-obese diabetic (NOD) mice is associated with autoimmune type 1 diabetes mellitus (DM-1). *Mol. Cell. Biochem.* 342, 21–28.
- Gavanescu, I., Kessler, B., Ploegh, H., Benoist, C., Mathis, D., 2007. Loss of Aire dependent thymic expression of a peripheral tissue antigen renders it a target of autoimmunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104 (11), 4583–4587.
- Gillard, G.O., Dooley, J., Erickson, M., Peltonen, L., Farr, A.G., 2007. Aire-dependent alterations in medullary thymic epithelium indicate a role for Aire in thymic epithelial differentiation. *J. Immunol.* 178 (5), 3007–3015.
- Gray, D.H., Chidgey, A.P., Boyd, R.L., 2002. Analysis of thymic stromal cell populations using flow cytometry. *J. Immunol. Methods* 260 (1–2), 15–28.
- Guerau-de-Arellano, M., Martinic, M., Benoist, C., Mathis, D., 2009. Neonatal tolerance revisited: a perinatal window for Aire control of autoimmunity. *J. Exp. Med.* 206 (6), 1245–1252.
- Hirokawa, K., Utsuyama, M., Moriizumi, E., Handa, S., 1986. Analysis of the thymic microenvironment by monoclonal antibodies with special reference to thymic nurse cells. *Thymus* 8 (6), 349–360.
- Holländer, G.A., 2007. Claudins provide a breath of fresh Aire. *Nat. Immunol.* 8 (3), 234–236.
- Hubert, F.X., Kinkel, S.A., Crewther, P.E., Cannon, P.Z., Webster, K.E., Link, M., Uibo, R., O'Bryan, M.K., Meager, A., Forehan, S.P., Smyth, G.K., Mittaz, L., Antonarakis, S.E., Peterson, P., Heath, W.R., Scott, H.S., 2009. Aire-deficient C57BL/6 mice mimicking the common human 13-base pair deletion mutation present with only a mild autoimmune phenotype. *J. Immunol.* 182 (6), 3902–3918.
- Irla, M., Hugues, S., Gill, J., Nitta, T., Hikosaka, Y., Williams, I.R., Hubert, F.X., Scott, H.S., Takahama, Y., Holländer, G.A., Reith, W., 2008a. Autoantigen-specific interactions with CD4? Thymocytes control mature medullary thymic epithelial cell cellularity. *Immunity* 29 (3), 451–463.
- Irla, M., Saade, M., Kissenpfennig, A., Poulin, L.F., Leserman, L., Marche, P.N., Jouvin-Marque, E., Berger, F., Nguyen, C., 2008b. ZAP-70 restoration in mice by *in vivo* thymic electroporation. *PLoS One* 3 (4), e2059.
- Jiang, W., Anderson, M.S., Bronson, R., Mathis, D., Benoist, C., 2005. Modifier loci condition autoimmunity provoked by Aire deficiency. *J. Exp. Med.* 202 (6), 805–815.

- Klein, L., Kyewski, B., 2000. Self-antigen presentation by thymic stromal cells: a subtle division of labor. *Curr. Opin. Immunol.* 12 (2), 179–186.
- Klein, L., Hinterberger, M., Wirnsberger, G., Kyewski, B., 2009. Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 833–844.
- Kont, V., Laan, M., Kisand, K., Merits, A., Scott, H.S., Peterson, P., 2008. Modulation of Aire regulates the expression of tissue-restricted antigens. *Mol. Immunol.* 45 (1), 25–33.
- Kuroda, N., Mitani, T., Takeda, N., Ishimaru, N., Arakaki, R., Hayashi, Y., Bando, Y., Izumi, K., Takahashi, T., Nomura, T., Sakaguchi, S., Ueno, T., Takahama, Y., Uchida, D., Sun, S., Kajiura, F., Mouri, Y., Han, H., Matsushima, A., Yamada, G., Matsumoto, M., 2005. Development of autoimmunity against transcriptionally unrepressed target antigen in the thymus of Aire-deficient mice. *J. Immunol.* 174 (4), 1862–1870.
- Kyewski, B., Derbinski, J., 2004. Self-representation in the thymus: an extended view. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 688–698.
- Kyewski, B., Klein, L., 2006. A central role for central tolerance. *Annu. Rev. Immunol.* 24, 571–606.
- Kyewski, B., Peterson, P., 2010. Aire, master of many trades. *Cell* 140 (1), 24–26.
- Liston, A., Gray, D.H.D., Lesage, S., Fletcher, A.L., Wilson, J., Webster, K.E., Scott, H.S., Boyd, R.L., Peltonen, L., Goodnow, C.C., 2004. Gene dosage-limiting role of Aire in thymic expression, clonal deletion, and organ-specific autoimmunity. *J. Exp. Med.* 200, 1015–1026.
- Macedo, C., Evangelista, A.F., Magalhães, D.A., Fornari, T.A., Linhares, L.L., Junta, C.M., Silva, G.L., Sakamoto-Hojo, E.T., Donadi, E.A., Savino, W., Passos, G.A., 2009. Evidence for a network transcriptional control of promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells. *Mol. Immunol.* 16, 3240–3244.
- Magalhães, D.A., Silveira, E.L., Junta, C.M., Sandrin-Garcia, P., Fachin, A.L., Donadi, E.A., Sakamoto-Hojo, E.T., Passos, G.A., 2006. Promiscuous gene expression in the thymus: the root of central tolerance. *Clin. Dev. Immunol.* 13, 81–99.
- Mathis, D., Benoist, C., 2007. A decade of Aire. *Nat. Rev. Immunol.* 7 (8), 645–650.
- Mathis, D., Benoist, C., 2009. Aire. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 287–312.
- Metzger, T.C., Anderson, M.S., 2011. Control of central and peripheral tolerance by Aire. *Immunol. Rev.* 241 (1), 89–103.
- Mizuuchi, T., Kasai, M., Kokuho, T., Kakiuchi, S.T., Hirokawa, K., 1992. Medullary but not cortical thymic epithelial cells present soluble antigens to helper T cells. *J. Exp. Med.* 175, 1601–1605.
- Pereira, L.E., Bostik, P., Ansari, A.A., 2005. The development of mouse APECED models provides new insight into the role of AIRE in immune regulation. *Clin. Dev. Immunol.* 12 (3), 211–216.
- Pitkänen, J., Peterson, P., 2003. Autoimmune regulator: from loss of function to autoimmunity. *Genes Immun.* 4 (1), 12–21.
- Ramsey, C., Bukrinsky, A., Peltonen, L., 2002a. Systematic mutagenesis of the functional domains of AIRE reveals their role in intracellular targeting. *Hum. Mol. Genet.* 11 (26), 3299–3308.
- Ramsey, C., Winqvist, O., Puhakka, L., Halonen, M., Moro, A., Kämpe, O., Eskelin, P., Peltto-Huikko, M., Peltonen, L., 2002b. Aire deficient mice develop multiple features of APECED phenotype and show altered immune response. *Hum. Mol. Genet.* 11 (4), 397–409.
- Rizzi, M., Ferrera, F., Filaci, G., Indiveri, F., 2006. Disruption of immunological tolerance: role of AIRE gene in autoimmunity. *Autoimmun. Rev.* 5 (2), 145–147.
- Takahama, Y., 2006. Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nat. Rev. Immunol.* 6 (2), 127–135.
- Taniguchi, R.T., Anderson, M.S., 2011. The role of Aire in clonal selection. *Immunol. Cell Biol.* 89 (1), 40–44.
- Tykocinski, L.O., Sinemus, A., Kyewski, B., 2008. The thymus medulla slowly yields its secrets. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 43, 105–122.
- Villaseñor, J., Benoist, C., Mathis, D., 2005. AIRE and APECED: molecular insights into an autoimmune disease. *Immunol. Rev.* 204, 156–164.
- Villaseñor, J., Besse, W., Benoist, C., Mathis, D., 2008. Ectopic expression of peripheral-tissue antigens in the thymic epithelium: probabilistic, monoallelic, misinitiated. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 15854–15859.
- Werneck, C.C., Cruz, M.S., Silva, L.C., Villa-Verde, D.M.S., Savino, W., Mourão, P.A.S., 2000. Is there a glycosaminoglycan-related heterogeneity of the thymic epithelium. *J. Cell. Physiol.* 185, 68–79.