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

Controle pós-transcricional em timócitos e linfócitos T CD3⁺ periféricos de camundongos NOD durante a emergência do Diabetes mellitus do tipo 1

Thaís Arouca Fornari

Ribeirão Preto 2011

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

Controle pós-transcricional em timócitos e linfócitos T CD3+ periféricos de camundongos NOD durante a emergência do Diabetes mellitus do tipo 1

Thaís Arouca Fornari

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética da 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

FORNARI, THAÍS A.

CONTROLE PÓS-TRANSCRICIONAL EM TIMÓCITOS E LINFÓCITOS T CD3⁺ PERIFÉRICOS DE CAMUNDONGOS NOD DURANTE A EMERGÊNCIA DO DIABETES MELLITUS DO TIPO 1

RIBEIRÃO PRETO, 2011

219p. 30 cm

TESE DE DOUTORADO APRESENTADA À FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO, USP, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: GENÉTICA

ORIENTADOR: PASSOS, GERALDO ALEIXO DA SILVA

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:

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por meio da bolsa de Doutorado Processo 141463/2008-2
- 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

Com muito carinho aos meus queridos pais, Rosane e Francisco, ao meu irmão Guilherme, e ao Paulo, pela certeza de nunca terem me desamparado e estado ao mesmo tempo longe fisicamente e mais presentes do que nunca em minha vida. Não existem palavras no universo capazes de exprimir o que vocês representam em minha vida! Obrigada pelo apoio incondicional, pelo incentivo e pelas infinitas orações.

AMO MUITO VOCÊS!!!!!

"Somos do tamanho de nossos sonhos."

Fernando Pessoa

Agradecimentos

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

Agradeço especialmente ao meu orientador, Prof. Dr. Geraldo Aleixo da Silva Passos, por seu exemplo de profissionalismo, seriedade, dedicação e comprometimento com aquilo que faz. Agradeço pela confiança que me foi dada, pela paciência e pelo incentivo diário durante a minha pós-graduação, me estimulando a superar as dificuldades, o que se tornou imprescindível para o meu crescimento profissional e pessoal. Obrigada Geraldo!

Aos docentes, pós-graduandos e funcionários da área de Pós-Graduação do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto agradeço pela agradável convivência e amizade. Em especial, agradeço às secretárias Susie Nalon e Maria Aparecida pelo carinho, dedicação, amizade, disponibilidade e empenho ao longo desses anos.

Aos Professores Dr. Eduardo Antonio Donadi e Dra. Elza Tieme Sakamoto-Hojo pela colaboração e amizade que auxiliaram no desenvolvimento deste estudo.

Agradeço a Profa. Dra. Karina Fittipaldi Bombonato Prado do Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto e a todos do departamento que contribuíram com a confecção das lâminas histológicas.

Aos Professores Dr. Fernando de Queiróz Cunha e Dr. João Santana que possibilitaram a utilização do aparelho de citometria de fluxo do Departamento de Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Agradeço ao Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto por proporcionar condições para a realização deste trabalho.

Aos amigos e colegas de trabalho (de todas as épocas) do Grupo de Imunogenética Molecular do Departamento de Genética da FMRP-USP que estiveram comigo nesses 7 anos, agradeço pela convivência, pelo companheirismo e por tudo que aprendi com vocês durante esse tempo. Muito obrigada!

Ao CNPq pelo auxílio concedido por meio de bolsa de doutorado (Processo 141463/2008-2) e a FAPESP (Processo 08/56594 – 8) pelo apoio financeiro de suma importância para o desenvolvimento deste projeto.

Finalmente, agradeço aos meus familiares, a todos os amigos, da vida acadêmica e pessoal, e aos profissionais que de alguma forma me auxiliaram ao longo desse trabalho proporcionando conhecimento, apoio e carinho. Obrigada a todos!

"Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já tem a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos, que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia e, se não ousarmos fazêla, teremos ficado, para sempre, a margem de nós mesmos."

Fernando Pessoa

RESUMO

O presente trabalho refere-se ao estudo do papel dos microRNAs no controle pós-transcricional das células T de camundongos *Non Obese Diabetic* (NOD) modelo que reproduz o diabetes mellitus do tipo 1 (DM-1). Durante o desenvolvimento do trabalho, procurou-se esclarecer a hipótese de que os microRNAs controlam os níveis de determinados RNAs mensageiros (mRNAs) das células T durante a indução ou perda de tolerância imunológica. Portanto, a expressão alterada dos microRNAs estaria contribuindo com o processo da autoimunidade. Sendo assim, o objetivo do estudo foi identificar os perfis de expressão e as redes de interação entre um conjunto de microRNAs e seus respectivos mRNAs alvos nos timócitos e nos linfócitos T CD3⁺ periféricos durante o desenvolvimento do diabetes mellitus do tipo 1 (DM-1) em camundongos NOD.

Para avaliar a expressão de genes codificadores de mRNAs, sendo estes possíveis alvos de microRNAs, utilizou-se a tecnologia de *microarrays*. O uso de programas de análise e para a construção das redes foi imprescindível. Acredita-se que fenômenos complexos como a regulação pós-transcricional de células T e seu envolvimento no processo de tolerância imunológica, bem como o surgimento de doenças autoimunes, podem ser melhor compreendidos por meio da genômica funcional.

Os resultados encontrados evidenciam uma expressão diferenciada de mRNAs e microRNAs em timócitos e linfócitos T CD3⁺ periféricos durante o desenvolvimento do diabetes mellitus do tipo 1 (DM-1). As diferenças nos perfis transcricionais encontradas envolvem expressão de genes (mRNAs) relacionados diretamente ao sistema imune, a diferenciação e ativação de linfócitos T e a apoptose, bem como a outros processos relacionados a resposta imune.

Além disso, as redes de interação microRNA-mRNA encontradas no presente trabalho evidenciam interações já conhecidas e apresentam novas interações, mostrando a participação de um grupo de microRNAs que estão atuando no controle pós-transcricional do diabetes do tipo 1 em camundongos NOD, contribuindo com a melhor compreensão do controle genético-molecular das doenças autoimunes, principalmente do diabetes do tipo 1.

Post-transcriptional control in thymocytes and peripheral CD3⁺ T lymphocytes of NOD mice during the emergence of type 1 diabetes

ABSTRACT

This study refers to the role played by microRNAs in the post-transcriptional control of T cells from non obese diabetic (NOD) mice model which reproduces the type 1 diabetes (T1D). During the study, it was tried to clarify the hypothesis that microRNAs control certain messenger RNAs (mRNAs) levels of the T cells during the induction or loss of immunological tolerance. Therefore, the altered expression of microRNAs might be contributing to the process of autoimmunity. Thus, the study aim was to identify the expression profiles and interaction networks between a set of microRNAs and their mRNA targets in thymocytes and peripheral CD3⁺ T lymphocytes during the development of type 1 diabetes (T1D) in NOD mice.

The microarray technology was used to evaluate the expression of mRNAs as possible targets of microRNAs involved in this process. The use of bioinformatics software to reconstruct the networks was essential. It was realized that complex phenomena as post-transcriptional regulation in T cells and their involvement in the immune tolerance process, as well as the emergence of autoimmune diseases can be better understood only by means of functional genomics.

The results show differential expression of mRNAs and microRNAs in thymocytes and peripheral CD3⁺ T lymphocytes during the development of type 1 diabetes (T1D). The differences found in the transcriptional profiles involve mRNAs related to the immune system, differentiation and activation of T lymphocytes and apoptosis as well as other processes related to immune response.

In addition, the microRNA-mRNA interaction networks obtained in this study evidence the predicted interactions as well as new ones, showing the participation of a group of microRNAs that may be acting in post-transcriptional control of type 1 diabetes in NOD mice contributing to a better understanding of the molecular genetic control of autoimmune diseases in specially type 1 diabetes.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. desenvolvir	Principais tipos de células do timo e suas origens durante o mento
Figura 2.	Conceito de migração multivetorial de timócitos21
Figura 3.	Estrutura e função do timo23
Figura 4.	Modelo de afinidade da seleção dos timócitos26
Figura 5.	Atividade transcricional do gene Aire no timo e na periferia29
Figura 6. camundong	Avanço do infiltrado linfocitário nas ilhotas pancreáticas de gos NOD
Figura 7.	Diretrizes das interações microRNA-mRNA40
Figura 8.	Localização genômica dos microRNAs41
Figura 9.	Biogênese e ação dos microRNAs em células animais43
Figura 10. diferenciaça	Representação esquemática dos microRNAs envolvidos na ão hematopoiética e com função no sistema imune
Figura 11 adaptativa	. MicroRNAs envolvidos na regulação da imunidade inata e 45
Figura 12. pancreática	MicroRNAs envolvidos na regulação das funções das células β as e nos tecidos alvos da insulina47
Figura 13. utilizados n	Aparelho Bioanalyzer 2100 Agilent e RNA 6000 Nano Chips a eletroforese microfluídica
Figura 14. oligonuclec	Agilent <i>microarrays</i> no formato 4 x 44k contendo tídeos sintetizados a partir de sequências de mRNAs58
Figura 15. oligonucleo	Agilent <i>microarrays</i> no formato 8 x 15k contendo tídeos sintetizados a partir de sequências de microRNAs62
Figura 16. idades evid	Histologia do pâncreas de camundongos NOD em diferentes lenciando o aumento do infiltrado linfocitário

Figura 17.	Aumento no número de fêmeas da linhagem NOD que
desenvolvera	am Diabetes tipo 1 ao longo de oito meses após o nascimento74
Figura 18.	Análise da pureza das células T por citometria de fluxo75
Figura 19. NOD pré-dia	Caracterização da população de linfócitos T de camundongos béticos e diabéticos por citometria de fluxo
Figura 20.	Gel virtual das amostras de RNAs estudadas77
Figura 21.	Densitometria das amostras de RNAs estudadas77
Figura 22 .	Matriz de expressão com 2.771 mRNAs de timócitos e linfócitos T
CD3⁺ periféri	cos de camundongos da linhagem NOD79
Figura 23 .	Matriz de expressão com 116 microRNAs de timócitos e linfócitos
T CD3 ⁺ perife	éricos de camundongos da linhagem NOD85
Figura 24.	Rede mostrando a interação do microRNA miR-7a* induzido em
linfócitos ativ	ados e seus mRNAs alvos87
Figura 25. linfócitos naiv	Rede mostrando a interação dos microRNAs induzidos em ves e seus mRNAs alvos88
Figura 26. linfócitos naiv	Rede mostrando a interação dos microRNAs reprimidos em ves e seus mRNAs alvos
Figura 27.	Rede mostrando a interação dos microRNAs induzidos em
timócitos e se	eus mRNAs alvos
Figura 28.	Rede mostrando a interação dos microRNAs reprimidos em
timócitos e se	eus mRNAs alvos
Figura 29.	Processos biológicos associados a interação do miR-7a* com
seus respect	ivos mRNAs alvos100
Figura 30.	Processos biológicos associados a interação do miR-669-5p com
seus respect	ivos mRNAs alvos100
Figura 31. seus respect	Processos biológicos associados a interação do miR-712 com ivos mRNAs alvos
Figura 32. seus respect	Processos biológicos associados a interação do miR-24-2* com ivos mRNAs alvos

Figura 49.	Processos biológicos associados a interação do miR-29b* com
seus respect	vos mRNAs alvos110
Figura 50.	Processos biológicos associados a interação do miR-146a com
seus respect	ivos mRNAs alvos110
Figura 51.	Processos biológicos associados a interação do miR-150 com
seus respecti	ivos mRNAs alvos111
Figura 52.	Processos biológicos associados a interação do miR-342-3p com
seus respect	ivos mRNAs alvos111
Figura 53.	Processos biológicos associados a interação do miR-30b com
seus respect	ivos mRNAs alvos112
Figura 54.	Confirmação dos dados de microarrays por qPCR116

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I. Primers utilizados nas reações de PCR em Tempo Real e suasrespectivas sequências sense e antisense68
Tabela II.Processos biológicos dos grupos de mRNAs diferencialmenteexpressos de acordo com o Gene Ontology80
Tabela III.MicroRNAs selecionados pelo perfil de expressão nas diferentesfases do desenvolvimento das células T
Tabela IV.MicroRNAs selecionados pelo perfil de expressão nas diferentesfases do desenvolvimento das células T e seus mRNAs alvos
Tabela V. Principais mRNAs alvos envolvidos nos processos biológicos relacionados ao sistema imune e suas interações com os microRNAs

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 O papel do timo no desenvolvimento das células T e na indução tolerância imunológica	da 17
1.1.1 Ontogenia e estrutura do timo	17
1.1.2 Migração das células precursoras linfóides para o timo	20
1.1.3 Maturação dos timócitos em células T	22
1.1.4 Indução da Tolerância Imunológica	24
1.2 Autoimunidade e doenças autoimunes	32
1.3 A importância dos camundongos NOD na pesquisa do diabetes tipo 1	35
1.4 Análise do transcriptoma	36
1.4.1 Conceito de transcriptoma	36
1.4.2 Métodos de análise do transcriptoma	37
1.5 Biologia dos microRNAs	38
1.5.1 Descoberta, conceito e características dos microRNAs	38
1.5.2 Biogênese e mecanismos de ação	42
1.5.3 MicroRNAs no desenvolvimento e regulação do sistema imune	43
1.5.4 MicroRNAs e doenças autoimunes	45
2. HIPOTESE DO TRABALHO	49
2. HIPOTESE DO TRABALHO	49 51
 2. HIPOTESE DO TRABALHO 3. OBJETIVOS 4. MATERIAL E MÉTODOS 	49 51 53
 2. HIPOTESE DO TRABALHO	49 51 53 53
 2. HIPOTESE DO TRABALHO	49 51 53 53
 2. HIPOTESE DO TRABALHO. 3. OBJETIVOS. 4. MATERIAL E MÉTODOS	49 51 53 53 53
 2. HIPOTESE DO TRABALHO. 3. OBJETIVOS. 4. MATERIAL E MÉTODOS	49 51 53 53 53 54 54
 2. HIPOTESE DO TRABALHO. 3. OBJETIVOS. 4. MATERIAL E MÉTODOS	5 1 53 53 53 54 54 54
 2. HIPOTESE DO TRABALHO	49 51 53 53 54 54 55 55
 HIPOTESE DO TRABALHO. OBJETIVOS. MATERIAL E MÉTODOS	49 51 53 53 54 54 55 55 56
 2. HIPOTESE DO TRABALHO	49 51 53 53 54 54 55 55 56 57
 HIPOTESE DO TRABALHO. OBJETIVOS. MATERIAL E MÉTODOS	49 51 53 53 54 54 55 55 56 57 58
 HIPOTESE DO TRABALHO. OBJETIVOS. MATERIAL E MÉTODOS 4.1 Linhagem de camundongos NOD 4.2 Avaliação da insulite em camundongos NOD 4.3 Avaliação da glicemia 4.4 Definição de controle e teste 4.5 Separação dos timócitos e isolamento de linfócitos T CD3⁺ periféricos 4.6 Quantificação das populações celulares por citometria de fluxo 4.7 Extração de RNA total 4.8 Avaliação da integridade das amostras de RNA total. 4.9 Oligo <i>microarrays</i> 4.9.1 mRNAs <i>microarrays</i> 	49 51 53 53 54 54 55 55 56 57 58 58
 HIPOTESE DO TRABALHO. OBJETIVOS. MATERIAL E MÉTODOS	49 51 53 53 53 54 54 55 55 56 57 58 58 58 61
 HIPOTESE DO TRABALHO. OBJETIVOS. MATERIAL E MÉTODOS	49 51 53 53 53 54 54 55 55 56 57 58 58 58 58 61 64

4.11.1 Software GenMiR ⁺⁺	65
4.11.2 Software MATLAB	65
4.11.3 Software Cytoscape	66
4.12 Reações de transcrição reversa	66
4.13 Reação de polimerização em cadeia em tempo real (qPCR)	67
4.14 Análise estatística dos dados de PCR quantitativa em tempo real	68
5. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	70
6. RESULTADOS	72
6.1 Avaliação da insulite em camundongos NOD	72
6.2 Emergência de diabetes mellitus (DM-1) em camundongos NOD	74
6.3 Quantificação das populações celulares por citometria de fluxo	74
6.4 Avaliação da integridade das amostras de RNA	76
6.5 Análise dos mRNAs diferencialmente expressos	78
6.6 Análise dos microRNAs diferencialmente expressos	84
6.7 Redes de interação microRNAs-mRNAs	86
6.8 Análise da expressão gênica por PCR quantitativa em tempo (qPCR)	real 115
7. DISCUSSÃO	118
7.1 Avaliação da insulite em camundongos NOD	118
7.2 Emergência de diabetes mellitus (DM-1) em camundongos NOD	119
7.3 Avaliação das populações celulares por citometria de fluxo	120
7.4 Análise dos mRNAs diferencialmente expressos	121
7.5 Reação de polimerização em cadeia em tempo real (qPCR)	124
7.6 Análise dos microRNAs diferencialmente expressos	125
7.7 Redes de interação microRNAs-mRNAs	126
8. CONCLUSÕES	130
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	133
SÚMULA CURRICULAR	156
PUBLICAÇÕES	171
Publicações resultantes do assunto desta Tese	172
Publicações resultantes de colaborações	201

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 O papel do timo no desenvolvimento das células T e na indução da tolerância imunológica

1.1.1 Ontogenia e estrutura do timo

O timo é um órgão linfóide primário em que os precursores de células T derivados da medula óssea se submetem a um processo complexo de maturação no contexto do microambiente tímico, representado por células não linfóides e linfóides e por componentes da matriz extracelular (ECM) (VILLA-VERDE *et al.,* 1995). É um órgão altamente especializado cujo microambiente peculiar favorece a proliferação, a sobrevivência, a maturação e a migração de timócitos imaturos (TAKAHAMA, 2006).

A visão embriológica clássica do desenvolvimento do timo que tinha sido perpetuado por décadas tem sofrido revisões importantes nos últimos anos. Entretanto, avanços substanciais na compreensão do desenvolvimento do timo tem sido lentos em comparação com o progresso na investigação sobre as vias celulares e dos mecanismos moleculares de desenvolvimento das células T.

Até por volta de 2001, a organogênese do timo foi, pelo menos em parte, baseada em estudos morfológicos. Inicialmente foi sugerido que o compartimento epitelial do timo seria derivado da ectoderme (córtex) e da endoderme (medula) (CORDIER & HAUMONT, 1980).

Ao longo dos anos, muitos estudos tem sido realizados e coletivamente levaram a visão de que as células epiteliais tanto de origem endodérmica quanto ectodérmica (CORDIER & HAUMONT, 1980) além de células mesenquimais de origem neuroectodérmica (crista neural) (LE DOUARIN & JOTEREAU, 1975; BOCKMAN & KIRBY, 1984; RODEWALD, 2008), contribuíram direta ou indiretamente para o desenvolvimento do timo. Isso significa que as células e suas progênies constituem a estrutura do timo, como é o caso do epitélio derivado da bolsa faringeana. Indiretamente significa que as células fornecem sinais indutivos em *trans*, que seria o caso da crista neural (NC) derivada do mesênquima.

Estudos com análises clonais, utilizando embriões com 12 dias de desenvolvimento (ROSSI *et al.*, 2006), e experimentos com mapeamentos indicando um progenitor comum para as células corticais e medulares (BLEUL *et al.*, 2006), tem conclusivamente mostrado que somente um folheto germinativo contribui para o compartimento epitelial tímico e esse folheto seria a endoderme. Contudo, não se

pode excluir sinais de indução e/ou sobrevivência de outro folheto germinativo (MANLEY et al., 2003; GORDON et al., 2004; BOEHM & BLEUL, 2006).

Em camundongos, o timo surge como estruturas bilaterais da terceira bolsa faringeana no intestino primário embrionário (MANLEY, 2000; GORDON *et al.*, 2001) e são colonizados por progenitores hematopoiéticos por volta do 11,5 dias do desenvolvimento embrionário (ITOI *et al.*, 2001). O primeiro marcador molecular descrito para essa região foi o Foxn1, necessário para o desenvolvimento de células epiteliais tímicas funcionais, para a formação do timo e, portanto, para a formação da diversidade do repertório de células T autotolerantes (NEHLS *et al.*, 1996; BOEHM *et al.*, 2003; BLEUL *et al.*, 2006).

A involução alométrica do timo inicia-se pouco antes do nascimento e a involução absoluta ocorre na puberdade, entretanto o timo adulto continua a receber células precursoras, vindas da medula óssea e a lançar células colonizadoras das áreas T periféricas (BODEY *et al.*, 1997). Esse fenômeno é conhecido e frequentemente associado a idade, sendo caracterizado pela substituição do estroma tímico por tecido adiposo (MONTECINO-RODRIQUEZ *et al.*, 2005).

O declínio na imunidade adaptativa e na produção de células T naïve, a diminuição no repertório do receptor de células T periféricas (TCR), a perda de citocinas e hormônios críticos dentro do microambiente tímico são, em grande parte, atribuidos a involução do timo com o avanço da idade. Alterações moleculares associadas com a perda da função do timo utilizando análises de cDNA microarray para examinar o transcriptoma dos timócitos de ratos de diversas idades (1 a 24 meses) forneceram informações valiosas sobre os mecanismos celulares e moleculares associadas com o envelhecimento do timo (LUSTIG *et al.*, 2009).

O córtex proporciona um microambiente necessário para a seleção positiva dos timócitos imaturos enquanto que a medula é responsável pela seleção negativa das células T autorreativas. Os progenitores linfóides entram no timo adulto pela junção córtico-medular e então migram para a região subcapsular antes, porém, retornando pelo córtex em direção a medula (ANDERSON & JENKINSON, 2001).

Cada um destes compartimentos forma um microambiente estromal especializado que é crucial para controlar a maturação das células T. Este estroma é composto essencialmente de células epiteliais corticais (cTECs) e medulares (mTECs), fibroblastos reticulares, células dendríticas e macrófagos derivados da medula óssea, além de estruturas conhecidas como corpúsculos de Hassal, localizados especificamente na medula tímica, e composto de espirais compactas de células epiteliais remanescentes de células em degeneração. O timo tem ainda um

suprimento vascular abundante e vasos linfáticos eferentes que drenam para os linfonodos do mediastino (VAN EWIJK W, 1991; GRAY *et al.*, 2002).

O estroma tímico pode ser visto como todos os componentes não hematopoiéticos do timo, que são funcionalmente definidos como aqueles elementos, independentemente da sua origem e linhagem, que constituem a estrutura do timo e, portanto, fornecem a matriz sobre a qual os timócitos se desenvolvem. Uma simples e usual classificação para o estroma está baseada não só no marcador hematopoiético CD45, quanto na expressão de queratina. As células do epitélio tímico (TECs) são queratina⁺ enquanto que as células mesenquimais são queratina⁻ (RODEWALD, 2008) (Figura 1).



Figura 1. Principais tipos de células do timo e suas origens durante o desenvolvimento. O timo pode ser dividido em células hematopoiéticas (CD45⁺), que são passageiras, transitórias e residentes do estroma. As células CD45⁻ incluem duas linhagens: células epiteliais tímicas (TEC, queratina⁺) que se originam da terceira bolsa faringeana (camundongos) e as mesenquimais (queratina⁻), que são uma mistura de tipos de células que contribuem para várias estruturas do timo, como cápsulas ou vasculatura. A proporção de células CD45⁺ e CD45⁻ é de cerca de 50-1, mas a maioria dos tipos celulares descritos pode ser isolada com base no fenótipo a partir de suspensões de células do timo seguindo digestão enzimática. [Extraído e modificado de RODEWALD, 2008].

A manutenção do microambiente tímico requer interações recíprocas entre timócitos e células estromais, denominadas de *crosstalk* tímico (VAN EWIJK *et al.,* 1994; VAN EWIJK *et al.,* 2000; GERMERAARD *et al.,* 2003; GRAY *et al.,* 2006).

O microambiente medular do timo desempenha um papel crucial no estabelecimento da autotolerância através da exclusão de timócitos autorreativos e na geração de células T regulatórias. O *crosstalk* entre os timócitos em desenvolvimento e as células epiteliais tímicas medulares (mTECs) contribuem para a formação da medula tímica. Estudos recentes identificaram as moléculas que medeiam o *crosstalk* tímico (NITTA *et al.*, 2011).

A interação dos precursores de timócitos com o microambiente estromal permite o comprometimento desses com as linhagens celulares T e essencialmente elimina ou permite a supressão de células autorreativas (BOEHM & BLEUL, 2006; ANDERSON *et al.*, 2007).

1.1.2 Migração das células precursoras linfóides para o timo

Os precursores de células T, ou células imaturas da linhagem de células T, derivados da medula óssea entram no timo na junção córtico-medular e então migram para a região subcapsular da glândula através dos vasos sanguíneos. O desenvolvimento começa no córtex e, conforme os timócitos vão evoluindo, eles migram para a medula tímica, que contém principalmente células T maduras. Essas células deixam o timo e ganham o sangue e tecidos linfóides periféricos. As quimiocinas são uma grande família de citocinas estruturalmente homólogas que regulam a migração de linfócitos e leucócitos através dos tecidos linfóides periféricos (BLACKBURN & MANLEY, 2004; SAVINO, 2010).

Citocinas da superfamília do fator de necrose tumoral, incluindo RANKL, CD40L e linfotoxina, produzidos por timócitos selecionados positivamente e células indutoras de tecido linfóide, promovem a proliferação e diferenciação de mTECs. Em retorno, ligantes de quimiocinas CCR7 produzidos por mTECs facilitam a migração de timócitos selecionados positivamente para a medula (KWAN & KILLEEN, 2004; NITTA *et al.*, 2011).

As células do microambiente tímico produzem dois grupos de moléculas, as quimiocinas, incluindo Cxcl12 (Chemokine C-X-C motif ligand 12), a qual preferencialmente atrai timócitos imaturos CD4⁻CD8⁻ e CD4⁺CD8⁺, e Ccl21

(Chemokine C-C ligand 21), que exerce quimioatração para timócitos simples positivos maduros, e as proteínas da matriz extracelular, visto que os timócitos em desenvolvimento expressam os receptores correspondentes. Além disso, embora as quimiocinas e a matriz extracelular possam dirigir a migração dos timócitos por si mesmo, uma função combinada para essas moléculas parece contribuir para os padrões de migração resultantes dos timócitos em seus vários estágios de diferenciação (SAVINO *et al.*, 2003; SAVINO, 2006).

A migração dos timócitos é um processo complexo, combinando múltiplas interações moleculares levando a quimiotaxia ou a quimiorrepulsão, envolvendo várias moléculas como ligantes ECM, quimiocinas, efrinas e semaforinas em um conceito proposto como a migração multivetorial (MENDES-DA-CRUZ *et al.*, 2008; SAVINO, 2010) (Figura 2).



Figura 2. Conceito de migração multivetorial de timócitos, incluindo semaforina-3A e efrinas como vetores de migração celular. O painel define esquematicamente o conceito hipotético afirmando que a migração do timócito resulta de interações variadas e simultâneas entre o par ligante. Assim, os vetores individuais formam um vetor resultante que os timócitos levam durante toda a sua jornada no interior dos lóbulos tímicos, a partir do córtex em direção a medula, até ser finalmente exportado do órgão através das paredes dos vasos sanguíneos. Assim, os vetores que estão sob o controle neuroendócrino, uma vez modulados por um hormônio ou por neuropeptídeo, provavelmente irão alterar o vetor resultante. Setas estreitas representam vetores de migração individuais induzida por estímulos específicos, incluindo ligantes ECM, tais como fibronectina, laminina, nidogen, galectina-3, quimiocinas como CXCL12 e CCL25, semaforina-3A, efrinas e outras moléculas ainda a ser definido. Seta sólida representa o vetor de migração final resultante. [Extraído e modificado de SAVINO, 2010].

1.1.3 Maturação dos timócitos em células T

O processo de maturação dos linfócitos consiste numa complexa sequência de eventos biológicos, compreendendo a proliferação das linhagens celulares precursoras, a expressão diferencial de proteínas de membrana, rearranjos gênicos do receptor de antígeno, a seleção do repertório de linfócitos maduros e consequente morte celular programada dos linfócitos não selecionados e finalmente a migração celular.

A maturação inicial caracteriza-se por um aumento da produção de todas as células sanguíneas na medula óssea e por uma alta atividade mitótica, estimulada principalmente pela interleucina 7 (IL-7) que é produzida pelas células do estroma da medula óssea e do timo e pelos ligantes Notch (HARMAN *et al.,* 2005; ZAMISCH *et al.,* 2005). A atividade proliferativa cessa depois que os genes para os receptores de antígeno são expressos. Tais genes surgem por um processo de recombinação somática gerando diversidade do repertório dos linfócitos após junção de segmentos gênicos diferentes.

A interação entre células estromais e linfóides dentro do microambiente tímico é um fator crítico para formar a correta especificidade antigênica do repertório de células T, assim como para capacitá-lo a responder a apresentação de antígenos estranhos pelas moléculas de MHC e não responder a antígenos próprios (BARTHLOTT *et al.*, 2006).

Os timócitos imaturos corticais recém-chegados ao timo contem os genes de TRs na configuração germinativa e, portanto, ainda não expressam o TCR, CD3, as cadeias ζ e os correceptores CD4 e CD8. Essas células são chamadas de timócitos duplo-negativos (DN) e se submetem a múltiplos ciclos de proliferação e de progresso ao estágio duplo-negativo CD4⁻CD8⁻ (DN), aproximadamente 5% do total de timócitos, com discretos passos de maturação distinguidos pela expressão de marcadores de superfície celular CD44^{high}CD25⁻ (DN1), CD44^{high}CD25⁺ (DN2), CD44^{low}CD25⁺ (DN3), e CD44^{low}CD25⁻ (DN4). As proteínas do complexo recombinase (Rag1 e Rag2) são expressas pela primeira vez nesse estágio, e os rearranjos V(D)J se iniciam. Durante a transição da fase DN para duplo-positiva CD4⁺CD8⁺ (DP), aproximadamente 85% dos timócitos se redistribuem a região cortical (RAMIALISON *et al.*, 2002). O rearranjo dos genes da cadeia α e a expressão do heterodímero TCR $\alpha\beta$ ocorrem na população



CD4⁺CD8⁺, exatamente antes ou durante a migração dos timócitos do córtex para a medula (Figura 3).

Figura 3. Estrutura e função do timo. O órgão é dividido em duas regiões; córtex e medula, povoados por diferentes subtipos celulares epiteliais tímicos (TECs). Nos adultos, os precursores de células T entram no timo pela junção córtico-medular, e começam então um programa altamente complexo de diferenciação, que está ligado a migração através do estroma tímico. Os subtipos diferentes de timócitos são encontrados consequentemente em regiões espacialmente restritas do timo. O córtex tímico foi separado em quatro regiões: *Região 1*, junção córtico-medular, local de entrada dos precursores de células T; *Região 2*, células diferenciadas em DN2 as quais se submetem a expansão clonal proliferativa; *Região 3*, inicia-se os rearranjos V(D)J dos genes TRs em células no estágio DN3; *Região 4*, transição de DN para o estado de DP (CD4+CD8+). Células DP migram do córtex para a medula tímica, onde se diferenciam em simples positivas (SP CD4+ ou CD8+). A seleção positiva ocorre no córtex entre as TECs corticais (cTECs), e a seleção negativa ocorre principalmente na medula, entre as TECs medulares (mTECs) e células dendríticas (DCs). Células SP que completaram o programa de diferenciação saem da medula tímica em direção a periferia. [Extraído e modificado de BLACKBURN & MANLEY, 2004].

A recombinação V(D)J dos receptores de células T é um evento molecular essencial na maturação dessas células. É um processo de recombinação sítioespecífica da molécula de DNA que só ocorre nos estágios iniciais de desenvolvimento dos linfócitos T e B. A geração de grande diversidade nas regiões variáveis do receptor de antígeno de linfócitos T é crucial para que os organismos possam reconhecer e responder virtualmente contra todo e qualquer antígeno estranho.

Cada locus TCR consiste de segmentos gênicos de regiões variáveis (V), *joinig* (J) e constante (C), e para as cadeias β e δ incluem segmentos gênicos de diversidade (D). De modo geral, o rearranjo dos segmentos gênicos, ocorre através da ligação de um segmento J a um dos segmentos D, formando uma união D-J, posteriormente um dos segmentos gênicos V se liga ao segmento D-J unidos. Toda sequência de DNA interveniente aos segmentos gênicos que se ligaram passam por um processo de deleção (PAUL, 1993).

As primeiras células que expressam os TCRs estão no córtex tímico, e essa expressão é baixa em comparação com a célula T madura. Em virtude da expressão de seus complexos TCR completos, as células duplo-positivas podem responder ao antígeno e ficam sujeitas a seleção positiva e negativa. A maioria das células DP, que constituem cerca de 80% daquela população, morre por negligência porque não reconhece moléculas disponíveis de MHC expressas por células estromais tímicas (SAVINO, 2006).

As células que passam com sucesso pelos processos de seleção amadurecem em células T CD4⁺ ou CD8⁺ e são chamadas de timócitos simples positivos (SP), e compreendem aproximadamente 10% dos timócitos no timo (RAMIALISON *et al.*, 2002). Assim, os estágios de maturação das células T podem ser rapidamente distinguidos pela análise da expressão das moléculas CD4 e CD8. Essa maturação fenotípica é acompanhada da maturação funcional.

Finalmente, os timócitos maduros com positividade única (células T CD4 e CD8 restritas ao MHC) entram na medula do timo e deixam esse órgão pelos vasos sanguíneos para colonizar os tecidos linfóides periféricos (HAKS *et al.,* 1998). Apenas 15% dos timócitos que vivem no timo nesta fase vão formar a maioria do repertório de células T periféricas (SAVINO, 2006; CIOFANI & ZÚÑIGA-PFLUCKER, 2007).

1.1.4 Indução da Tolerância Imunológica

A tolerância imunológica aos antígenos próprios envolve processos de seleção negativa e positiva de linfócitos T que se desenvolvem no timo. Células T imaturas provenientes da medula óssea passam pelo processo de maturação intratímica constituído pelos estágios de duplo-negativas (CD4⁻ CD8⁻), duplopositivas (CD4⁺ CD8⁺) e simples positivas (CD4⁺ ou CD8⁺). Durante esses estágios ocorre também a recombinação V(D)J dos TCR α/β . A tolerância imunológica, por sua vez, depende de interações entre TCR dos timócitos e o complexo peptídeo MHC próprio das células estromais tímicas (ANDERSON *et al.*, 2006; KRANGEL, 2009).

A seleção positiva é o processo na qual os timócitos DP (no córtex) que apresentam TCR completo na superfície, se ligam com baixa avidez (fracamente) ao complexo peptídeo MHC próprio e são estimulados a sobreviver. Os timócitos cujos receptores não reconhecem as moléculas de MHC próprias morrem por apoptose. Isso assegura que as células T maduras sejam restritas ao MHC próprio. Na seleção positiva também há restrição de moléculas de classe I ou de classe II do MHC com os subtipos de linfócitos T, assegurando que as células T CD8⁺ citotóxicas sejam específicas a peptídeos expostos pelas moléculas de MHC de classe I, enquanto que as células T CD4⁺ auxiliares ligam-se as moléculas de MHC de classe II associadas ao peptídeo (ANDERSON *et al.*, 2006; KLEIN *et al.*, 2009). Após a seleção positiva e o comprometimento em linhagem CD4 ou CD8, os timócitos se deslocam para a medula onde residem de 4 a 5 dias (MCCAUGHTRY *et al.*, 2007).

Em contraste, a seleção negativa é a eliminação por apoptose dos timócitos cujos TCRs ligam-se com avidez (fortemente) ao antígeno próprio apresentado pela molécula de MHC própria de células dendríticas ou de mTECs. A avidez do reconhecimento do antígeno depende da afinidade do TCR e da concentração do peptídeo que a célula T reconhece (SPRENT, 1995; JAMESON & BEVAN; 1998; KLEIN *et al.*, 2009). Este processo elimina células T em desenvolvimento que são fortemente autorreativas contra antígenos próprios ubíquos, que são os antígenos próprios expressos pelas mTECs, antígenos relacionados a tecidos (TRAs) (Figura 4). A seleção negativa envolve moléculas de superfície como CD28, CD5, CD43 e Fas que agindo conjuntamente levam a eficiência do processo (KISHIMOTO & SPRENT, 1999).



Figura 4. Modelo de afinidade da seleção dos timócitos. Segundo esse modelo, a afinidade do receptor de células T (TCR) pelo peptídeo apresentado pelo MHC é o principal determinante da seleção da célula T. Timócitos duplo-positivos (DP) expressam TCRs com nenhuma ou muito baixa afinidade por autopeptídeos via MHC e morrem por negligência. Este mecanismo é responsável por 80-90% da perda de timócitos durante a seleção tímica. Timócitos com afinidade intermediária para autopeptídeos via MHC recebem um sinal de sobrevivência (processo denominado seleção positiva), se comprometendo com a linhagem de células T CD4 ou CD8 e posteriormente, passam pela medula do timo para se tornar parte das células T periféricas. Autopeptídeos via MHC com alta afinidade ao TCR são induzidos a morte celular por apoptose (processo conhecido como seleção negativa ou deleção clonal). Não há evidências em experimentos *in vitro* que definam o limiar que leva a interação a seleção postiva ou negativa. [Extraído e modificado de KLEIN *et al.*,2009]

Existe uma distinção no papel das células TECs. As células corticais não só auxiliam na atração dos precursores linfóides do sangue para o timo como também controlam a diferenciação dos timócitos ao estágio em que eles expressam em sua superfície o receptor de células T αβ completo. Consequentemente, os peptídeos próprios (autopeptídeos) e as moléculas do complexo de histocompatibilidade (MHC) encontram afinidade suficiente nessas células sendo assim selecionadas positivamente. Posteriormente, os timócitos se movem para a medula. As mTECs apresentam moléculas MHC que expressam peptídeos que representam muitos tecidos do parênquima. Os timócitos que apresentarem alta afinidade pelos complexos serão negativamente selecionados ou deletados (HOLLÄNDER, 2007).

De fato, todos os grupos de células apresentadoras de antígenos (APCs), assim como as corticais tímicas (cTECs), medulares tímicas (mTECs), células dendríticas (DCs) e macrófagos tem suas funções na apresentação de grupos de peptídeos próprios, e especialização nas suas habilidades para suportar as seleções positiva e negativa, contribuindo para a diversidade do quadro de antígenos próprios no timo (KLEIN & KYEWSKI, 2000a; KYEWSKI & DERBINSKI, 2004; ANDERSON *et al.*, 2006; KLEIN *et al.*, 2009).

Inúmeras observações experimentais destacam que o controle de qualidade de desenvolvimento de células T através de interações do peptídeo com os complexos MHC nas células APCs da medula é indispensável para a tolerância central. Lesões genéticas que impedem a entrada de timócitos selecionados positivamente para a medula ou que resultem na saída prematura dos timócitos (SRIVATSAN & PENG, 2005; KUROBE *et al.*, 2006), na desorganização da arquitetura medular (BOEHM et al., 2003) ou no interrompimento do desenvolvimento de mTECs (ROSSI *et al.*, 2007; AKIYAMA *et al.*, 2008; HIKOSAKA *et al.*, 2008; IRLA *et al.*, 2008) resultam em manifestações graves de autoimunidade sistêmica.

O processo de seleção e a maturação do repertório de células T são de grande importância, pois induzem a tolerância dessas células ao que é próprio. A aquisição dessa tolerância é dependente da interação entre receptor de célula T (TCR - Tcell receptor) e ligantes MHC-autopeptídeos. Logo a diversidade de antígenos próprios acessível a esse repertório no timo é quem vai determinar a extensão e especificidade dessas células (KLEIN & KYEWSKI, 2000b).

A discriminação do próprio/não-próprio é uma propriedade essencial do sistema imune que dirige uma variedade de mecanismos efetores contra agentes patogênicos enquanto ignora os constituintes próprios do organismo. Somente quando a tolerância ao próprio está finalmente balanceada é que a integridade do corpo é garantida (KYEWSKI & DERBINSKI, 2004).

A tolerância imunológica é a propriedade essencial do sistema imune que controla as reações patológicas contra antígenos do próprio. O timo é visto como o principal órgão envolvido com a indução de tolerância aos antígenos próprios que são expressos pelas células tímicas (tolerância central), enquanto que a indução de tolerância aos antígenos relacionados a outros tecidos (TRAs) tem sido atribuída aos mecanismos de tolerância extratímica (tolerância periférica).

A evidência da expressão de TRAs de órgãos e tecidos parenquimais no timo de camundongos e de humanos foi referida como "expressão gênica promíscua" (PGE) e seu entendimento tem sido alvo de muitas pesquisas, cujos resultados reforçam a concepção de tolerância central de antígenos tecidos específicos (JOLICOEUR *et al.*, 1994; SOSPEDRA *et al.*,1998; DERBINSKI *et al.*, 2001; GOTTER *et al.*, 2004; KYEWSKI & DERBINSKI, 2004; FORNARI *et al.*, 2010).

A descrição do fenômeno da expressão promíscua de genes de TRAs pelas células tímicas medulares epiteliais (mTECs) iniciou uma nova fase na pesquisa em imunogenética que se ocupa da reavaliação das bases moleculares da tolerância central das células T na prevenção da autoimunidade (KYEWSKI & DERBINSKI, 2004; MAGALHÃES *et al.*, 2006).

O controle molecular da expressão gênica promíscua no timo tem sido investigado. O gene Aire (*Autoimmune regulator*), que é um regulador da transcrição (PITKÄNEN & PETERSON, 2003) e que controla a expressão de um conjunto de genes de TRAs em mTECs, com uma tendência a genes que cuja expressão é preferencial de células diferenciadas, tem sido foco de muitos estudos relacionados a PGE (ANDERSON *et al.*, 2002 e 2005; DERBINSKI *et al.*, 2005; DERBINSKI & KYEWSKI, 2005; BARTHLOTT *et al.* 2006; KONT *et al.*, 2008; GARDNER *et al.*, 2009). Contudo, os genes controlados por Aire são altamente diversos com relação a estrutura e função, o que dificultam as conclusões sobre seu modo de ação detalhado.

Um modelo proposto mostra que o gene Aire parece agir através de mecanismos epigenéticos que são necessários, mas não suficientes para a expressão de genes individuais dentro de um *locus*. Outros cofatores podem estar envolvidos precisamente na determinação de quais antígenos que estão sendo expressos dentro de cada célula (GARDNER *et al.*, 2009). A atividade transcricional do gene Aire pode ser observada tanto no timo quanto na periferia (Figura 5).



Figura 5. Atividade transcricional do gene Aire no timo e na periferia. A figura mostra as duas principais populações de células expressando Aire no timo (mTEC) e na periferia do (eTAC). Trabalhos recentes tem demonstrado que o gene Aire promove a transcrição de um conjunto de genes nas duas populações de células. O número de genes induzidos por Aire na periferia parece ser menor, o que pode refletir um menor nível de expressão do gene dentro desta população celular. A figura mostra a interação de Aire com uma série de proteínas que estão envolvidas na transcrição, incluindo CBP (CREB-binding protein), P-TEFb (posterior transcription elongation factor b) e DNA-PK (DNA-dependent protein kinase). [Extraído e modificado de GARDNER *et al.*,2009].

O gene Aire contém domínios de ligação com DNA (KUMAR *et al.*, 2001), mas controla a transcrição de maneira independente da posição de promotores. Esse gene codifica uma proteína de 552 aminoácidos expressa principalmente no timo, e em menor extensão nos linfonodos, além de ter sido encontrado em alguns outros tecidos (ZUKLYS *et al.*, 2000; HALONEN *et al.*, 2001; ADAMSON *et al.*, 2004).

Um estudo recente mostrou que a expressão do gene Aire não é restrita ao estroma tímico (células mTEC), mas é também expresso pelos timócitos e

linfócitos periféricos. Demonstraram que o gene é pouco expresso pelos timócitos CD4⁺CD8⁺ duplo positivos enquanto que no sangue periférico ele é mais expresso nas células B quando comparados com as células T, sendo também altamente expresso em células dendríticas/macrófagos CD14⁺ e em granulócitos (SUZUKI *et al.*, 2008). Entretanto, nada se sabe sobre o papel do gene Aire nos timócitos.

Uma parte dos transcritos de TRAs, porém, parecem ser independentes da expressão de Aire (DERBINSKI *et al.,* 2005; KURODA *et al.,* 2005), e este gene também regula positiva e negativamente a transcrição de uma gama de genes nas TECs, que não codificam para TRAs. O significado deste controle no timo foi observado em estudos com animais Aire-*knockout,* onde a ausência desse gene promove o aparecimento de autoanticorpos, especialmente para o olho e o estômago (DEVOSS *et al.,* 2006; GAVANESCU *et al.,* 2007), sendo suficiente para causar autoimunidade. Em outro estudo, análises de camundongos Aire^{-/-} mostram que a expressão de algumas TRAs é reduzida ou ausente em células mTECS deficientes de Aire e a seleção negativa dos timócitos é prejudicada (LISTON *et al.,* 2004a).

Um estudo recente mostrou que as TRAs seguem o padrão de expressão do gene Aire durante o desenvolvimento normal do timo e sua involução. Uma baixa expressão do gene começa a ser detectada por volta do dia 13,5 do desenvolvimento embrionário e aumenta significativamente no dia 15,5. A maior taxa de expressão do gene acontece no 11º após o nascimento e gradualmente decresce (KONT *et al.*, 2008).

Nosso grupo de pesquisa (Grupo de Iminogenética Molecular, USP, Ribeirão preto) vem trabalhando e procurando compreender melhor a ação do gene Aire *in vitro* em culturas de timo fetal (FTOC, Fetal Thymus Organ Culture) e adulto (ATOC, Adult Thymus Organ Culture). Aliando esse recurso com a tecnologia dos cDNA *microarrays* demonstrou-se a maturação de células T por meio da detecção da recombinação V(D)J de receptores de células T (TRVB8.1) e a modulação da expressão gênica em FTOCs numa escala de transcriptoma evidenciando a participação de genes essenciais implicados no desenvolvimento do timo (CARDOSO *et al.*, 2006).

Em outro trabalho, comparando o tempo de gestação e a duração das culturas, foi possível determinar a época da emergência da indução de genes de TRAs os quais representaram 57 diferentes órgãos parenquimais e 7 órgãos

linfóides. Mostrou-se pela primeira vez que FTOC também reproduz a expressão gênica promíscua (SOUSA CARDOSO *et al.*, 2006).

Em outro estudo, mostrou-se o controle do Aire sobre a PGE após o seu silenciamento *in vitro* por meio de RNA interferente (siRNA) em cultura de células mTECs murinas. Tal silenciamento levou a modulação diferencial de muitos genes e com a reconstrução de redes de interações transcricionais foi possível identificar nós gênicos, como o caso do gene Gucy2d, que apresentou interação com genes *down-stream* de TRAs (MACEDO *et al.*, 2009).

O grupo mostrou ainda que a expressão do gene Aire e de genes de TRAs decrescem no estroma tímico de DBA-1/J, o que dentro do contexto de artrite reumatóide induzida por colágeno (CIA) pode sinalizar uma redução na seleção negativa dos respectivos clones de timócitos autorreativos e, consequentemente, contribuir com reação autoimune (DONATE *et al.*, 2011).

Recentemente, em outro estudo desenvolvido durante nosso mestrado sobre genes de TRAs e a desregulação cronológica da tolerância imunológica (associada a idade), ficou evidente que durante a transição do estado préautoimune (pré-diabético) para autoimune (diabético), os camundongos *Non Obese Diabetic* (NOD) apresentam alteração da PGE no estroma tímico envolvendo inclusive genes que codificam antígenos importantes relacionados ao diabetes do tipo 1 (DM-1) durante o desenvolvimento da doença (FORNARI *et al.*, 2010).

No presente trabalho, continuamos com interesse nos fenômenos genéticomoleculares do controle da tolerância imunológica e no surgimento das doenças autoimunes. Na tentativa de dar um sentido complementar ao fenômeno da PGE que ocorre no estroma tímico, voltou-se dessa vez a atenção para os timócitos e para os linfócitos T CD3⁺ periféricos.

Procurou-se mais uma vez, durante a transição do estado pré-diabético para diabético, avaliar as eventuais alterações da expressão de mRNAs de timócitos e de linfócitos T CD3⁺ periféricos em camundongos.

Estudos recentes tem demonstrado participação de microRNAs no controle pós-transcricional durante a diferenciação dos linfócitos bem como de outros processos relacionados ao sistema imune. No presente trabalho, o grande interesse foi tentar revelar novas interações entre microRNAs e mRNAs

associados a diferentes fases da diferenciação das células T em camundongos NOD.

1.2 Autoimunidade e doenças autoimunes

A possibilidade do sistema imune de um indivíduo reagir contra antígenos autólogos e causar dano tecidual pode levar ao desenvolvimento de autoimunidade.

As doenças autoimunes são condições patológicas em que o sistema imune age sobre si mesmo e causa sérios danos teciduais através de mecanismos ainda desconhecidos (KAMRADT & MITCHISON, 2001; TARNER & FATHMAN, 2001). Essas doenças surgem a partir da interação de três componentes: genético, ambiental e regulatório que resultam numa falha na autotolerância (FATHMAN *et al.*, 2005; JIANG *et al.*, 2005). Tal falha na tolerância central impediria a expressão gênica promíscua de genes TRAs que se encontrariam desregulados em tal situação.

Doenças como diabetes tipo 1 (DM-1), artrite reumatóide, esclerose múltipla e lúpus eritrematoso sistêmico são doenças autoimunes muito estudadas em humanos e em modelos animais. Essas doenças são desordens relativamente comuns que afetam cerca de 5% da população, predominantemente mulheres. O tratamento mais usual para tais doenças é composto de drogas imunossupressoras não específicas como córtico-esteróides e reagentes citotóxicos. A administração sistêmica de citocinas como TGF-beta (transforming growth factor), interleucinas 4 e 10 (IL-4, IL-10) tem mostrado significante eficácia no tratamento de doenças autoimunes em modelos animais (FUJIO et al., 2007).

O uso da terapia gênica no combate de doenças autoimunes em humanos tem sido estudado, inclusive em camundongos, e pode ser uma área promissora da pesquisa no tratamento dessas doenças (ARAI *et al.*, 2010).

Estudos em modelos animais tem mostrado claramente que infecções podem dar início a doenças autoimunes (BACH, 2005). Associações entre viroses e o desenvolvimento do diabetes tipo 1 tem sido atribuídas. As viroses são consideradas fatores ambientais de risco porque induzem fortes respostas imunes e podem infectar o pâncreas e as células β pancreáticas (GIANANI & SARVETNICK, 1996; FILIPPI & VON HERRATH, 2005; VON HERRATH *et al.*, 2007). O diabetes tipo 1 (DM-1) é uma doença metabólica multissistêmica, multifatorial e multigênica decorrente do comprometimento da produção de insulina resultante da destruição das células β pancreáticas causada por efetores pró-inflamatórios e pró-apoptóticos da imunidade inata e da adaptativa (MOORE *et al.*, 2010). Esse processo é progressivo e pode durar em torno de 20 semanas em camundongos NOD e muitos anos em humanos (REGNAULT *et al.*, 2009).

Vários mecanismos podem contribuir para a destruição dessas células incluindo reações mediadas por linfócitos T CD4⁺ reativos. Inicialmente ocorrem lesões conhecidas como insulite envolvendo células dendríticas, macrófagos, células T CD4⁺ e CD8⁺ e células B, seguida pela fase diabética propriamente dita, com a progressiva e seletiva destruição das células β no pâncreas (CÔRTE-REAL *et al.*, 2009; LEHUEN *et al.*, 2010).

Como em humanos, o progresso da doença em camundongos NOD é definido em pelo menos dois estágios. No primeiro deles, a infiltração das ilhotas do pâncreas pelas células T autorreativas começa entre 4 e 8 semanas de idade e torna-se progressivamente mais extensa. No segundo estágio, tipicamente entre 12 a 20 semanas de idade, eventos desconhecidos provocam insulite que progride para a destruição das células β (Figura 6) (KODAMA *et al.*, 2008).



Figura 6. Avanço do infiltrado linfocitário nas ilhotas pancreáticas de camundongos NOD resultando na destruição das células β (insulite) durante o desenvolvimento do diabetes tipo 1. [Extraído e modificado de KODAMA *et al.*, 2008].

O diabetes tipo 1 tem influência genética e ambiental no seu desenvolvimento. O diabetes autoimune em NOD apresenta muitas características genéticas e patofisiológicas com o diabetes humano. Em ambas as

espécies, os genes do MHC e outros não-MHC contribuem para a susceptibilidade da doença. Cerca de 20 regiões não-MHC conhecidas como idd (*insulin dependent diabetes*) tem sido associadas ao risco da doença em camundongos NOD (MAIER & WICKER, 2005; KODAMA *et al.*, 2008; LEHUEN *et al.*, 2010).

Essas regiões de susceptibilidade podem afetar a habilidade da deleção clonal de células T precursoras autorreativas no timo (LISTON *et al.*, 2004b), a habilidade de apresentar autoantígenos e selecionar células T autorreativas (STRATMANN *et al.*, 2003), a tolerância periférica e a atividade das células T ou moléculas com potencial regulatório (SALOMON *et al.*, 2000; KREUWEL *et al.*, 2001) ou a agressividade da lesão (LYONS *et al.*, 2000).

Existem consideráveis evidências de que as células T tem um importante papel no desenvolvimento e na progressão do diabetes tipo 1 em humanos e nos modelos animais. Em camundongos NOD o desenvolvimento do DM-1 depende tanto de células T CD4⁺ quanto de células CD8⁺ (LEHUEN *et al.*, 2010).

As células T auxiliares (T helper - Th) do tipo Th1 tem sido cruciais para o início de doenças autoimunes, incluindo DM-1. As células T regulatórias (Tregs), mais especificamente as células CD4⁺CD25⁺, parecem controlar a autotolerância em camundongos NOD durante a fase pré-diabética, mas a proporção e a capacidade funcional dessas células parecem estar reduzidas ao longo do desenvolvimento do diabetes (JIMENO *et al.*, 2010).

Compreender a patogênese do diabetes tipo 1 (DM-1) é difícil devido ao fato de o processo autoimune que ocorre antes do início clínico ser longo, e pela dificuldade de estudar o pâncreas diretamente. Como alternativa, a exploração dos fluidos corporais, do sangue periférico (REYNIER *et al.*, 2010) e de células do sistema imune em órgãos associados a resposta de defesa, podem fornecer informações que possam ajudar no entendimento do processo que leva a doença. De fato, as células circulantes podem funcionar como "sentinelas", demonstrando mudanças sutis na expressão gênica que ocorrem ao longo do desenvolvimento da doença. Sendo assim, surgiu o interesse em investigar os perfis de expressão gênica dos timócitos e dos linfócitos T CD3⁺ periféricos usando *microarrays* da Agilent.

A caracterização do perfil de expressão gênica pode identificar milhares de genes expressos que podem ter sua transcrição regulada por padrões que

identificam uma doença. Assim, a investigação de novos genes potencialmente envolvidos com a determinação da doença durante o processo de diferenciação dos linfócitos, bem como o controle pós-transcricional por meio dos microRNAs sobre os mRNAs das mesmas células, passaram a ser de grande interesse para o presente estudo.

1.3 A importância dos camundongos NOD na pesquisa do diabetes tipo 1

A linhagem NOD (*Non Obese Diabetic*) é um importante modelo para estudo da emergência do diabetes tipo 1 (DM-1). Desde seu aparecimento ocorrido há mais de 20 anos, estudos com essa linhagem tem proporcionado muitas ideias e resultados sobre a complexidade dos processos envolvidos com doenças autoimunes. Os camundongos NOD representam um excelente modelo de doença autoimune sendo muito úteis para dissecar os mecanismos de tolerância, pois desenvolvem espontaneamente diabetes autoimune muito similar ao diabetes autoimune do tipo 1 em humanos, incluindo a presença de autoanticorpos pâncreas específicos, células T CD4⁺ e CD8⁺ autorreativas e sintenia de grupos de ligação (*linkage*) com regiões de cromossomos humanos (ATKINSON & LEITER, 1999; ANDERSON & BLUESTONE, 2005; CÔRTE-REAL *et al.*, 2009).

Experimentalmente, uma tolerância central defectiva tem sido implicada em pelo menos parte do processo patológico em camundongos NOD (ANDERSON & BLUESTONE, 2005) e essa falha parece ser causada por defeito intrínseco no processo de apoptose nos timócitos de NOD durante a seleção negativa (KISHIMOTO & SPRENT, 2001; LISTON *et al.*, 2004b; ZUCCHELLI *et al.*, 2005).

O camundongo NOD surgiu a partir da linhagem do camundongo Suíço (Swiss) durante um experimento de seleção no Japão, em que cruzamentos entre irmãos foram mantidos para que uma linhagem toda desenvolvesse catarata. Porém, além de não apresentarem catarata, os camundongos tiveram seu índice glicêmico alterado e linhagens susceptíveis e não susceptíveis a doenças autoimunes foram selecionadas (MAKINO *et al.*, 1980; ATKINSON & LEITER, 1999).

A incidência do diabetes espontâneo em NOD é de 60% a 80% em fêmeas e de 20% a 30% em machos. A incidência da doença aumenta quando o camundongo é mantido em ambiente relativamente livre de patógenos e decresce
em condições normais de manutenção (SINGH & RABINOVITCH, 1993; BOWMAN *et al.*, 1994). O início do diabetes 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; KODAMA *et al.*, 2008).

O camundongo NOD também está propenso a desenvolver outras síndromes autoimunes como: sialite (HU *et al.*, 1992), tiroidite autoimune (MANY *et al.*, 1996), polineuropatia periferal autoimune (SALOMON *et al.*, 2001) e prostatite (em machos).

1.4 Análise do transcriptoma

1.4.1 Conceito de transcriptoma

Em analogia ao termo *genoma* que se refere ao conjunto de genes de uma determinada espécie, criou-se o termo *transcriptoma* para se referir ao conjunto de RNAs, ou seja, os transcritos de uma célula num dado momento de seu ciclo. Como os mRNAs são os responsáveis pela codificação da síntese de proteínas e, portanto, os mais importantes no estudo da expressão do genoma, geralmente entende-se que o transcriptoma é o conjunto dos mRNAs. Mas é oportuno lembrar que tanto os RNAs transportadores (tRNAs) e os RNAs ribossômicos (rRNAs) devem ser incluídos no conceito do transcriptoma apesar de não serem codificadores de proteínas.

Mesmo com a inclusão dos microRNAs no transcriptoma, criou-se o termo *miRNoma* seguindo a mesma analogia. Os microRNAs representam uma classe distinta de RNAs que controlam a expressão gênica ao nível da síntese e/ou degradação dos mRNAs (SEVIGNANI *et al.,* 2006).

Durante todo o processo de diferenciação celular e tecidual, um conjunto diversificado de proteínas é mobilizado como resultado da expressão diferencial dos respectivos genes. Portanto, pode-se dizer que durante o desenvolvimento o primeiro ponto de controle molecular é a expressão gênica ao nível do conjunto de mRNAs, definido como transcriptoma. Sabe-se hoje que o transcriptoma das células e tecidos é reflexo da razão entre a biossíntese de mRNAs (transcrição) e

sua degradação, muitas vezes causada pelos microRNAs (SEVIGNANI *et al.*, 2006).

Além disso, o transcriptoma é variável entre os diferentes tipos de células, tecidos e órgãos de um dado indivíduo, 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 comparação da expressão gênica por mensuração dos níveis de mRNAs de células em condições normais e patológicas tem resultado em diagnósticos por *"fingerprints*" o que poderá ajudar a identificar disfunções moleculares com maior precisão, para uma posterior intervenção terapêutica (XIANG & CHEN, 2000).

1.4.2 Métodos de análise do transcriptoma

Um grande progresso tem ocorrido nos últimos anos para a técnica de arranjos em membranas de alta densidade (*microarrays*) para a análise de expressão gênica em grande escala. Há alguns anos atrás, iniciou-se a caracterização por meio de clones de cópias de mRNAs na forma de DNA (DNA complementar ou simplesmente cDNA) de humanos, camundongos e outros organismos-modelo (DUGGAN *et al.*, 1999; LIPSHUTZ *et al.*, 1999).

Atualmente, várias técnicas para a análise do transcriptoma analisando expressão de mRNAs estão disponíveis, como por exemplo, SAGE (análise em série da expressão gênica, do inglês Serial Analysis of Gene Expression) (YE *et al.*, 2002). Entretanto, esses métodos possuem desvantagens, quando o objetivo é analisar expressão em grande escala, o que pode ser solucionado por meio da tecnologia de *microarrays* (JORDAN, 1998; PASSOS *et al.*, 2000; VAN HAL *et al.*, 2000; SAKAMOTO-HOJO *et al.*, 2003).

A tecnologia dos *microarrays* mostrou ser uma ferramenta poderosa e muito difundida nas pesquisas sobre expressão gênica com aplicações no estudo de vários organismos tanto em situações normais como patológicas (WHITNEY & BECKER, 2001). Além disso, tal tecnologia permite a expressão de centenas de genes simultaneamente e fornece assinaturas moleculares das atividades celulares nos estudos de doenças multigênicas como é o caso das doenças autoimunes (FATHMAN *et al.*, 2005).

37

Atualmente, o estudo de *microarrays* pode ser realizado a partir de plataformas diferentes por meio de *chips* que contem todo o genoma da espécie de interesse (humano, camundongo, rato e muitas outras espécies) ou ainda todos os microRNAs relatados até o presente momento.

Em *microarrays* padrão, as sondas são sintetizadas e depositadas a uma superfície sólida por uma ligação covalente a uma matriz química (via epóxi - silano, amino -silano, lisina, poliacrilamida ou outros). A superfície sólida pode ser de vidro ou um *chip* de silício, caso em que eles são coloquialmente conhecidos como um *AFFY chips* quando um chip Affymetrix é usado. Plataformas de *microarrays* como Illumina, usam gotas microscópicas, em vez de o apoio grande e sólido. Alternativamente, os *microarrays* da Agilent podem ser construídos pela síntese direta de sondas de oligonucleotídeos em lâminas de vidro previamente preparadas por um sistema de impressão, processo conhecido como *SurePrint*. Este processo de síntese *in situ* possibilita a deposição de oligonucleotídeos, base a base, com extrema precisão utilizando arquivos de mRNAs ou de microRNAs a partir de bancos de dados.

Pelo conhecimento do perfil de expressão gênica, é possível responder importantes questões, tais como, quantos genes e quais suas intensidades de expressão estão envolvidos num determinado processo biológico. Além disso, reflete o perfil transcricional de milhares de genes em resposta a um estímulo farmacológico ou a uma resposta imune, entre outros (KURELLA *et al.*, 2001).

O presente trabalho representa um esforço no sentido de identificar as prováveis modificações ocorridas na expressão gênica e no controle pós transcricional, exercido pelos microRNAs, ao longo do processo de diferenciação dos linfócitos T de camundongos NOD durante o desenvolvimento do diabetes tipo 1 (DM-1).

1.5 Biologia dos microRNAs

1.5.1 Descoberta, conceito e características dos microRNAs

A ocorrência de RNA dupla fita (dsRNAs) em sistemas biológicos foi reconhecida pela primeira vez no início da década de 60, no contexto de infecções virais (MONTAGNIER & SANDERS, 1963; BALTIMORE *et al.*, 1964) época em que o dogma central da biologia molecular reservava o papel dos *double-strand RNA*

(dsRNA) exclusivamente durante a replicação de vírus de RNA. Três décadas depois, o novo conceito que dsRNAs regulam os processos biológicos fundamentais emergiu de estudos da regulação dos genes heterocrônicos lin-4 e lin-14 em no verme *C. elegans*. Mutações nesses genes resultam no desenvolvimento precoce ou retardado do organismo (CHALFIE *et al.*, 1981; AMBROS & HORVITZ, 1984).

Um suporte adicional ao paradigma foi dado quando outro gene heterocrônico, o let-7, foi descoberto por codificar um RNA com 21 nucleotídeos com função regulatória. Semelhante ao lin-4, o let-7 realiza sua função se emparelhando em sítios dentro da 3 'UTR dos mRNAs alvo inibindo sua tradução e disparando a transição para o próximo estágio de desenvolvimento (SLACK *et al.*, 2000; REINHART *et al.*, 2000; VELLA *et al.*, 2004).

O termo microRNA (miRNA) foi introduzido para se referir aos stRNAs e a todos os outros pequenos RNAs com características semelhantes, mas funções desconhecidas (LAGOS-QUINTANA *et al.*, 2001; LAU *et al.*, 2001; LEE & AMBROS, 2001; PARK *et al.*, 2009). Desde então, os microRNAs já foram relatados em uma grande variedade de organismos, que vão desde algas unicelulares aos seres humanos, sugerindo que os microRNAs sejam um elemento regulatório antigo e crítico (BARTEL & CHEN, 2004; ZHAO *et al.*, 2007). Por meio desse papel regulatório, o microRNA é capaz de se modular por efetores variados durante a realização de funções básicas como *single nucleotides polymorphisms* (SNPs), edição dos microRNAs, metilação e ciclo circadiano (CAI *et al.*, 2009).

Os microRNAs são distintos mas relacionados com os RNAs de interferência (RNAi) e foram identificados numa variedade de organismos, principalmente em mamíferos cujos estudos estão direcionados a compreensão do papel dessas moléculas para o entendimento de doenças e a descoberta de terapias (BARTEL, 2004; SEVIGNANI *et al.*, 2006; NEILSON *et al.*, 2007; MEKEYEV & MANIATIS, 2008; PAULEY & CHAN, 2008; CARTHEW & SONTHEIMER, 2009; TSAI & YU, 2010).

Os microRNAs são pequenos RNAs não-codificantes com 20 a 23 nucleotídeos de comprimento com função primariamente conhecida associada a regulação póstranscricional de determinados mRNAs. Tal regulação seria através da hibridação entre o microRNA e o mRNA alvo na região 3'UTR podendo haver a clivagem do mRNA, a deadenilação do mRNA ou ainda a repressão da tradução do mesmo (BARTEL, 2004; PAULEY & CHAN, 2008; CAI *et al.*, 2009; WINTER *et al.*, 2009). Estudos recentes tem revelado que genes com regiões 3'UTR longas tem sítios de ligação com alta densidade e estão envolvidos principalmente em modulações do desenvolvimento, enquanto genes com regiões 3'UTR curtas apresentam menor densidade e estão envolvidos em processos celulares básicos (OSADA & TAKAHASHI, 2007; SANDBERG *et al.*, 2008; CHENG *et al.*, 2009).

Como os microRNAs exercem suas funções através da ligação aos seus correspondentes mRNAs alvos é importante compreender as interações microRNA-mRNA. Tem sido demonstrado que a capacidade de um microRNA reprimir traducionalmente um mRNA alvo é, em grande parte, ditada pela energia livre de ligação na região denominada *seed*, localizada nos resíduos de 2 a 8 do final da região 5' do microRNA (DOENCH & SHARP, 2004).

Entretanto, além da região *seed*, abordagens computacionais e experimentais descobriram cinco características adicionais aumentando a eficácia do sítio de ligação: 1) composição rica de nucleotídeos AU perto do sítio, 2) proximidade de sítios para microRNAs coexpressos, 3) proximidade de pareamento de resíduos para 13 a 16 nucleotídeos do microRNA, 4) posicionamento dentro da 3'UTR de pelo menos 15 nucleotídeos do códon de parada, e 5) posicionamento longe do centro das UTRs longas (GRIMSON *et al.*, 2007).

O pareamento entre os microRNAs e os mRNAs são frequentemente imperfeitos devido a presença dos elementos de reconhecimento dos microRNAs (MREs) e o espaçamento entre eles (DOENCH *et al.*, 2003; FARH *et al.*, 2005; SAETROM *et al.*, 2007). A exceção é da região *seed*, onde ele ocorre com perfeição (Figura 7).



Figura 7. Diretrizes das interações microRNA-mRNA. Os microRNAs se ligam aos mRNAs alvos por pareamento complementar na região *seed* na 3'UTR (2-7 nucleotídeos). As regiões de despareamento de base (*loop*) devem estar presentes na parte central do duplex microRNA-mRNA. Além disso, deve haver complementaridade razoável entre os nucleotídeos 13-16 do microRNA. [Extraído e modifcado de PAULEY & CHAN, 2008].

A localização genômica dos microRNAs tem sido alvo de estudos que sugerem que os seus transcritos sejam longos, policistrônicos e primários (LAGOS-QUINTANA *et al.*, 2001) (Figura 8).



Figura 8. Localização genômica dos microRNAs. A) MicroRNAs intergênicos encontrados em regiões distintas podendo ser mono ou policistrônicos. B) MicroRNAs intrônicos encontrados nos introns dos genes. C) MicroRNAs exônicos são os mais raros e com frequencia sobrepõe um intron e um éxon de gene não codificante. [Extraído e modificado de OLENA & PATTON, 2010].

O banco de dados de microRNAs conhecido como miRBase (Release 17.0, Abril 2011; http://www.mirbase.org/) traz um registro de 1.492 microRNAs humanos e 782 murinos (pesquisa realizada em 17/10/2011). Porém, novos microRNAs estão sendo validados com a ajuda de algorítimos de predição em programas disponíveis em sites da internet como MiRanda (http://www.microrna.org/microrna/home.do) (BETEL *et al.*, 2008), TargetScan (http://www.targetscan.org/) (LEWIS *et al.*, 2005) e PicTar (http://pictar.mdc-berlin.de/) (KREK *et al.*, 2005).

Assim, como nova e importante peça do processo de regulação gênica, os microRNAs apresentam diversas e cruciais funções biológicas nas células animais e tem sido alvo de muito interesse para estudo nos últimos anos.

1.5.2 Biogênese e mecanismos de ação

A biogênese dos microRNAs é um complexo processo que envolve muitos passos e que começa no núcleo e termina no citoplasma após muitas modificações pós-transcricionais.

No primeiro passo do processo, a RNA polimerase II transcreve genes miR gerando transcritos primários (pri-mRNAs) que tem normalmente muitos nucleotídeos e contem uma ou muitas estruturas na forma de grampo (hairpin) possuindo ainda um cap na região 5' e uma cauda poli A. Na via canônica da biogênese, os pri-miRNAs são clivados no núcleo por um complexo que compreende a enzima RNase III, uma ribonuclease RNA-específica chamada de Drosha e a proteína DGCR8 (DiGeorge sybdrome critical region protein 8) produzindo os precursores dos microRNAs, os pré-miRNAs. Na via não canônica, os pre-miRNAs são gerados a partir de pequenos miRNAs intrônicos (mirtrons) nos spliceossomos. A proteína Exportina 5 é responsável pelo transporte dos prémiRNAs do núcleo para o citoplasma, onde eles serão processados pela enzima Dicer gerando o duplex miRNA/miRNA*. Tal enzima, juntamente com a proteína Ago (Argonauta) e com a proteína TRBP (Trans-activator RNA Binding Protein) formam o complexo RISC (RNA-Induced Silencing Complex). A sequência madura do microRNA (miRNA) se associa ao complexo RISC enquanto que a sequência imatura (miRNA*) será degradada. O miRNA e o complexo RISC interagem com a região 3' UTR do mRNA alvo regulando a sua expressão. A região seed do microRNA é crucial para o reconhecimento do alvo. A perfeita complementariedade entre o microRNA e seu mRNA alvo resulta na repressão dos genes alvos e na diminuição da expressão ou clivagem do mRNA (Figura 9) (CULLEN, 2004; PAULEY & CHAN, 2008; FARAONI et al., 2009; DAVIS-DUSENBERY & HATA, 2010; KROL et al., 2010; DAI & AHMED, 2011).



Figura 9. Biogênese e ação dos microRNAs em células animais. Na via da biogênese o pri-miRNA é processado pela DGCR8/Drosha gerando o pré-miRNA. A Exportin 5 transporta o pré-miRNA do núcleo para o citoplasma que será processado pela Dicer gerando o duplex miRNA/miRNA*. Somente a fita madura (miRNA) se mantém no complexo RISC juntamente com a Dicer e a proteína Ago. A perfeita complementariedade entre o microRNA e seu mRNA alvo resulta na repressão dos genes alvos e na diminuição da expressão ou clivagem do mRNA. [Extraído e modificado de DAI & AHMED, 2011].

1.5.3 MicroRNAs no desenvolvimento e regulação do sistema imune

Estudos tem identificado grupos de microRNAs que são abundantes e diferencialmente expressos em tecidos hematopoiéticos como a medula óssea e órgãos linfóides periféricos além do timo, mostrando um envolvimento com o

desenvolvimento de células B e T (MONTICELLI *et al.*, 2005; RAMKISSOON *et al.*, 2006; NEILSON *et al.*, 2007). COBB e colaboradores (2006) mostraram num estudo com camundongos que os microRNAs estão surgindo como os maiores responsáveis pelo circuito molecular que controla o desenvolvimento e diferenciação de linhagens hematopoiéticas (Figura 10).



Figura 10. Representação esquemática mostrando os microRNAs envolvidos na diferenciação hematopoiética e com função no sistema imune. HSC, células-tronco hematopoéticas; CLP, progenitora linfóide comum; CMP, progenitora mielóide comum; DN, precursoras de células T duplo-negativas; DP, células T duplo-positivas; SP, células T simples-positiva (CD4⁺ e CD8⁺); EMP, progenitor de eritrócitos e megacariócitos; GMP, progenitor de granulócitos e macrófagos. [Extraído e modificado de CARISSIMI *et al.*, 2009].

Perfis de expressão de microRNAs que caracterizam os vários estágios de desenvolvimento das células T tem sido identificados (WU *et al.*, 2007; NEILSON *et al.*, 2007), e tem sido atribuídos como fatores de grande importância na sensibilização destas células a antígenos, e assim seu envolvimento com os processos de seleção tímica e também na diferenciação de células naïve em células efetoras TH1, TH2 e Tregs (MONTICELLI *et al.*, 2005). Esses achados levaram pesquisadores a considerar que os microRNAs podem estar contribuindo com a manutenção dos processos de tolerância e imunidade (LI *et al.*, 2007). Além disso, suas ações tem sido extendidas também ao desenvolvimento e função do sistema imunológico (imunidade inata e adaptativa, figura 11),

inflamação e doenças autoimunes (RODRIGUEZ *et al.*, 2007; ZHAO *et al.*, 2007; LODISH *et al.*, 2008; FURER *et al.*, 2010; WESSNER *et al.*, 2010; DAI & AHMED, 2011).



Figura 11. MicroRNAs envolvidos na regulação da imunidade inata e adaptativa. Na imunidade inata está ilustrado o papel dos microRNAs relacionados ao desenvolvimento de neutrófilos, macrófagos e monócitos. Na imunidade adaptativa estão os microRNAs relacionados ao desenvolvimento e diferenciação das células T e das células B. CMP, progenitor mielóide; GMP, progenitor de granulócitos e monócitos; CLP, progenitor linfóide comum; DN, duplo-negativo ; DP, duplo-positivo; Treg, células T regulatórias .[Extraído e modificado de DAI & AHMED, 2011].

1.5.4 MicroRNAs e doenças autoimunes

A pesquisa de identificação de alvos de microRNAs em células de mamíferos está atraindo importantes grupos de pesquisa no mundo todo, principalmente na área de câncer (LIM *et al.*, 2005; RAJEWSKY, 2006), mas na área de autoimunidade o interesse também tem aumentado.

O fato de os microRNAs estarem envolvidos na modulação da seleção de células T, na sensibilidade do receptor de célula T bem como no desenvolvimento

de células Tregs numa resposta imune normal, sugerem que essas moléculas possam estar envolvidas em doenças inflamatórias ou autoimunes (CARISSIMI *et al.*, 2009).

A desregulação provocada pelos microRNAs está bastante associada as patologias autoimunes como a artrite reumatóide (RA), o lúpus eritematoso sistemico (SLE), a esclerose múltipla (MS), a colite ulcerativa, a psoríase, ao diabetes do tipo 1 (DM-1) além de outras doenças. Muito ainda precisa ser elucidado, mas potenciais mecanismos merecem ser considerados, incluindo a perda ou a diminuição da expressão do microRNA devido a mutação, a ativação epigenética, ao processamento aberrante ou a repressão transcricional; o aumento na expressão do microRNA em consequência da amplificação gênica ou de mutação, ou devido a uma indução transcricional levando a supressão das proteínas dos seus genes alvos além de mutações na região 3' UTR do mRNA ou em seus genes (SONKOLY & PIVARCSI, 2009; FURER *et al.*, 2010).

De modo similar a outras doenças autoimunes, a complexidade da DM-1 deriva de sua natureza multifatorial, incluindo fatores genéticos e ambientais. Além disso, devido a heterogeneidade genética, algumas regiões gênicas (*loci*) ditas de susceptibilidade, podem ter efeitos mais fortes em algumas populações ou famílias. Um nível adicional de complexidade pode ser atribuído aos microRNAs que provocam variações de expressão nos seus genes alvos (SEBASTIANI *et al.*, 2011).

Os microRNAs implicados na secreção de insulina ou na complicação do DM-1 tem atraído a atenção dos pesquisadores. O miR-375 que foi identificado por ser expresso em células endócrinas pancreáticas (POY *et al.*, 2004; JOGLEKAR *et al.*, 2009), juntamente com miR-124a, miR-9, miR-34a, miR-146, miR-29, entre outros (Figura 12), tem tido seus papéis associados com vários eventos subcelulares, envolvendo a secreção de insulina e o metabolismo de glicose (HENNESSY & O'DRISCOLL, 2008; PANDEY *et al.*, 2009; GUAY *et al.*, 2011).



Figura 12. MicroRNAs envolvidos na regulação das funções das células β pancreáticas e nos tecidos alvos da insulina no contexto do diabetes. [Extraído e modificado de GUAY *et al.*, 2011].

As evidências de que os microRNAs estão envolvidos na regulação do sistema imune e no surgimento de doenças autoimunes, despertaram nosso interesse em investigar o perfil de expressão dos microRNAs e de seus respectivos alvos expressos nos timócitos e nos linfócitos T periféricos, que uma vez alterado poderá influenciar o surgimento do diabetes tipo 1.

Hipótese do Trabalho

2. HIPÓTESE DO TRABALHO

Dado o papel crucial dos microRNAs na modulação da expressão gênica do sistema imunológico, sugere-se que a desregulação na sua expressão pode contribuir com a patogênese de doenças autoimunes, incluindo o diabetes mellitus do tipo 1 (DM-1).

Como na DM-1 há destruição das células β pancreáticas por reações mediadas principalmente por linfócitos CD4⁺ periféricos autorreativos, formulou-se a hipótese de que um grupo específico de microRNAs esteja envolvido com o processo de reatividade autoimune.

Esse grupo de microRNAs estaria com perfil de expressão diferente nos timócitos em relação aos linfócitos T CD3⁺ periféricos e estabeleceria interações com diferentes mRNAs (alvos) durante a transição do estado pré-diabético para o diabético.



3. OBJETIVOS

Objetivo amplo:

Identificar os perfis de expressão e as redes de interação entre um conjunto de microRNAs e seus respectivos mRNAs alvos nos timócitos e nos linfócitos T CD3⁺ periféricos durante o desenvolvimento do diabetes mellitus do tipo 1 (DM-1) em camundongos NOD (*Non Obese Diabetic*).

Objetivos específicos:

1) Identificar os perfis de expressão de mRNAs (transcriptoma) de timócitos de camundongos NOD pré-diabéticos (1 mês de idade) utilizando a tecnologia de *microarrays* genoma completo.

2) Identificar os perfis de expressão de mRNAs (transcriptoma) de linfócitos T CD3⁺ periféricos provenientes do baço de camundongos NOD pré-diabéticos (1 mês e 7 meses de idade) e diabéticos (> 7 meses de idade) utilizando a tecnologia de *microarrays* genoma completo.

3) Identificar os perfis de expressão de microRNAs (miRNoma) de timócitos de camundongos NOD pré-diabéticos (1 mês de idade) utilizando a tecnologia de *microarrays* miRNAs genoma completo.

4) Identificar os perfis de expressão de microRNAs (miRNoma) de linfócitos T CD3⁺ periféricos provenientes do baço de camundongos NOD pré-diabéticos (1 mês e 7 meses de idade) e diabéticos (> 7 meses de idade) utilizando a tecnologia de *microarrays* miRNAs genoma completo.

5) Reconstruir redes de interações entre microRNAs e mRNAs alvos (interações já conhecidas e as ainda não descritas), tentando identificar o controle pós-transcricional exercido pelos microRNAs durante a transição do estado pré-diabético para o diabético.

Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Linhagem de camundongos NOD

Os camundongos da linhagem NOD (Non Obese Diabetic) foram adquiridos junto ao biotério da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB UNICAMP) onde são mantidos em condições SPF (*specific pathogen free*). Os animais foram transferidos para o Laboratório de Imunogenética Molecular, no Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP), em mini-isoladores Alesco equipados com filtro de ar. Os mini-isoladores foram previamente autoclavados garantindo o fornecimento de água e ração *ad libitum* também previamente autoclavadas, mantendo os animais sob condições SPF. Além disso, os mini-isoladores foram mantidos numa câmara isoladora Alesco também com entrada de ar filtrado (filtro de 0,45 μ) num ambiente com temperatura constante de 22°C ± 2°C, ciclo de iluminação de 12 horas.

Um preparado polivitamínico suplementar 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.

Esse estudo foi realizado com a aprovação da comissão de ética na pesquisa com animais, CEUA, campus USP, Ribeirão Preto (Protocolo nº 120/2008).

4.2 Avaliação da insulite em camundongos NOD

Visando acompanhar o avanço da infiltração celular por parte dos linfócitos T junto as células β do pâncreas e a consequente destruição dessas células produtoras de insulina levando a insulite, realizou-se um estudo histológico para a observação do processo ao longo do desenvolvimento do animal e concomitantemente do diabetes.

Após a dissecção, os pâncreas foram fixados em formol 10% e depois foram utilizados na confecção de lâminas histológicas permanentes. O início da preparação incluiu a desidratação do tecido, inicialmente em álcool 70% por uma hora e sucessivamente em álcool 80%, 90%, 95% sendo que cada etapa durou uma hora. Em seguida, partiu-se para o álcool absoluto I, por uma hora e posteriormente para o absoluto II e III, também com duração de uma hora em cada etapa. Após a desidratação, todo o material ficou por volta de 12 horas (*overnight*) numa mistura de álcool e xilol (1:1). No dia seguinte, durante o processo de diafanização ou clarificação, submeteu-se o material ao xilol I por uma hora e em seguida ao xilol II, mais uma vez por uma hora.

No último passo fez-se a inclusão do material em três banhos sucessivos com parafina I, II e III, sendo a parafina II a 58°C e as demais a temperatura ambiente, com duração de uma hora cada banho. A parafina utilizada foi a Histosec (Merck).

Após a inclusão do material, iniciaram-se os cortes com espessura de 5 μm no Micrótomo Leica 2025 utilizados na preparação das lâminas.

Em seguida, as lâminas foram coradas com hematoxilina por um minuto e eosina por três minutos. As lâminas foram fotografadas com o auxílio de uma câmera Leica DC300F acoplada a um microscópio Leica DMLB2. A captura das imagens foi feita com o auxílio do programa Leica IM50 e para a inclusão da escala nas fotos utilizou-se o programa Kwin.

4.3 Avaliação da glicemia

O diabetes mellitus do tipo 1 se desenvolve espontaneamente na linhagem NOD que manifesta sintomas clínicos por volta de 4 meses de idade. Um desses sintomas é a alteração glicêmica, resultado da perda de células β pancreáticas, produtoras de insulina.

Para a análise da glicemia foi utilizado o aparelho *Accu Check – Active Kit* (Roche Diagnóstica Brasil LTDA, São Paulo, Brasil). A determinação do valor glicêmico é realizado por meio da aplicação de uma gota de sangue (~2 µl) na fita de papel reativo que é inserido em seguida no leitor óptico. O resultado expressa a concentração de glicose em mg/dl.

4.4 Definição de controle e teste

Foram considerados como controle (pré-diabéticos) os animais que apresentaram índice glicêmico < 250 mg/dl e como teste (diabéticos), aqueles animais que apresentaram índice glicêmico ≥ 250 mg/dl.

54

4.5 Separação dos timócitos e isolamento de linfócitos T CD3⁺ periféricos

Os camundongos NOD foram sacrificados em câmara de CO₂. Os timos de animais com 1 mês de idade foram coletados e pinçados em placa de Petri contendo meio de cultura DMEM + F10 para liberação dos timócitos. Uma membrana de nylon de 10 µm (Sefar Inc. Depew, NY, USA) foi utilizada para separação dos timócitos de possíveis contaminações com outros tipos celulares. A suspensão de células recuperadas foi centrifugada por 8 minutos a 500 x g para formação do botão celular o qual foi posteriormente lavado em PBS 1x. Uma nova centrifugação foi realizada para a formação do botão celular.

Os linfócitos T CD3⁺ periféricos foram obtidos por maceração dos baços de animais com 1 mês e com 7 meses de idade (todos pré-diabéticos) e de animais com mais de 7 meses de idade (diabéticos), também em meio de cultura DMEM + F10. Posteriormente, foi feita a separação de linfócitos T CD3⁺ totais, dos três grupos em questão, pelo uso de esferas magnéticas através de seleção negativa (Pan T cell isolation Kit, mouse, Miltenyi Biotec) segundo as instruções do fabricante.

As células obtidas em ambos os processos (separação de timócitos e isolamento de linfócitos T CD3⁺ periféricos) foram utilizadas tanto para a citometria de fluxo quanto para a extração de RNA total.

4.6 Quantificação das populações celulares por citometria de fluxo

Os timócitos e os linfócitos T CD3⁺ periféricos (1x10⁶ células / tubo) foram lavados em 3 ml de PBS 1x e os botões de células foram obtidos por centrifugação a 400 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e os botões foram ressuspensos em 100 µl de tampão de FACs com 40 µl de *FcBlock* (soro de coelho). Incubou-se por 30 minutos a 4°C e depois, pipetou-se 1 µl de cada anticorpo monoclonal marcado: CD3 (PE), CD4 (PerCP) e CD8 (FITC) (eBioscience). Em seguida, as amostras foram incubadas por 45 minutos a 4°C, e depois lavadas em 2 ml de tampão de FACs. Após a centrifugação para a formação do botão de células, repetiu-se a lavagem, descartou-se o tampão e por último, adicionou-se 150 µl de PBS com 1% de formol para fixação dos anticorpos. A leitura das marcações foi feita no citômetro de fluxo Calibur™

(Becton Dickinson). Os anticorpos controles apropriados foram utilizados e o ensaio foi realizado em triplicata.

Os dados de citometria de fluxo foram analisados pelo *software* estatístico *GraphPad Prism 5.0* (http://www.graphpad.com/prism/Prism.htm). Para análise estatística dos dados, foram utilizados testes *t-student* com a correção de *Welch's* sendo p < 0,05 (*).

4.7 Extração de RNA total

A fim de prevenir da contaminação por ribonucleases durante a extração e manuseio dos RNAs, toda a vidraria, tubos plásticos, espátulas e pinças utilizadas foram previamente autoclavados. Todo o procedimento foi realizado usando luvas de látex sem talco e descartáveis.

Para a extração de RNA total dos timócitos e linfócitos T CD3⁺ periféricos utilizamos o *mirVana PARIS* (Ambion, Austin, TX, USA) que permite a separação simultânea de RNAs de alto peso molecular (\leq 200 nt incluindo os RNAs mensageiros) e de RNAs de baixo pelo molecular (\geq 200 nucleotídeos, nt, incluindo os microRNAs de ~ 23 nt).

Em cada amostra foram adicionados 1.000 µl de solução de lise agitandose vigorosamente com a ajuda de um aparelho tipo vórtex para a lise completa das células (lisado celular). Em seguida, adicionou-se 100 µl de *miRNA Homogenate Additive*, levou-se ao vórtex por 15 segundos e permanecendo em gelo picado por 10 minutos.

O passo seguinte incluiu a adição de 1.000 µl de fenol:clorofórmio ácido e agitação vigorosa no vórtex por 60 segundos. O lisado foi então centrifugado a 10.000 x g por 5 minutos a temperatura ambiente para a formação de uma fase aquosa contendo os RNAs em solução. A fase aquosa foi cuidadosamente transferida para um novo tubo ao qual adicionou-se 1,25x seu volume com etanol 100% a temperatura ambiente.

Para cada amostra foi montada uma coluna em um tubo coletor no qual 700 μ l da mistura lisado/etanol foram pipetados na coluna e centrifugados 15 segundos a 10.000 x g. O líquido foi descartado e o procedimento foi repetido até a filtração de toda a mistura. Em seguida, aplicou-se 700 μ l de *miRNA Wash Solution 1* a coluna e centrifugou-se por 10 segundos a 10.000 x g. O líquido foi descartado e 500 μ l de *miRNA Wash Solution 2/3* foram aplicados a coluna e

centrifugados 10 segundos a 10.000 x g. Repetiu-se o último passo e, após descartar o líquido, centrifugou-se 1 minuto para remover resíduos líquidos no filtro. A coluna foi transferida para um tubo novo coletor e a ela foram adicionados 100 μ l de água DEPC pré-aquecida (95°C). Centrifugou-se 30 segundos para eluição do RNA que foi então conservado a – 80°C.

As quantificações das amostras de RNA total foram feitas utilizando o aparelho *NanoDrop ND-1000 UV-VIS* espectrofotômetro (NanoDrop Technologies) sendo que 1 U A₂₆₀ corresponde a 40 µg de RNA/ml.

4.8 Avaliação da integridade das amostras de RNA total

A qualidade das amostras de RNA total foi determinada por meio de eletroforese microfluídica (On-Chip electrophoresis) utilizando o aparelho *Bioanalyzer 2100 Agilent* e com os *RNA 6000 Nano Chips* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) (Figura 13).



Figura 13. Aparelho *Bioanalyzer 2100 Agilent* e *RNA 6000 Nano Chips* utilizados na eletroforese microfluídica.

Antes de iniciar o preparo do gel para a eletroforese, todos os reagentes, que até o momento estavam a 4°C, foram mantidos por 30 minutos a temperatura ambiente. Decorrido o tempo, iniciou-se com o preparo do gel, pipetando 550 μ l do *RNA 6000 Nano gel* numa coluna com filtro e centrifugou-se por 1.500 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Uma alíquota de 65 μ l foi colocada num tubo 0,5 ml livre de nuclease, depois foi adicionado 1 μ l de *RNA 6000 Nano Dye*, levou-se ao vórtex por 10 segundos e depois centrifugou-se a 13.000 x g por 10 minutos a temperatura ambiente.

Em seguida, iniciou-se o preparo do *RNA 6000 Nano chip* que foi colocado no *priming station* com os ajustes corretos para a leitura de RNAs. Primeiramente pipetou-se 9 µl da mistura gel/*dye* na região G indicada no *chip* e com o auxílio de uma seringa acoplada ao *priming station* distribuiu-se o gel por todo o *chip*. Em seguida, pipetou-se outros 9 µl da mistura nos demais pontos indicados com a letra G. Pipetou-se ainda 1 µl do marcador na posição indicada e 5 µl do *RNA 6000 Nano Marker* em cada uma das 12 amostras, bem como na posição do marcador. Por último, pipetou-se 1 µl de cada amostra nos respectivos poços marcados de 1 a 12 e com a ajuda de um vórtex IKA MS 3 (Manca, Hong Kong, CHN), agitou-se o *chip* no bioanalizador. Com a ajuda do *Agilent 2100 Expert Software* obteve-se o resultado (eletroforograma e densitometria dos géis) em 10 minutos de corrida eletroforética.

Somente as amostras que apresentaram picos correspondentes aos padrões de bandas de RNAr 28S, RNAr 18S, RNAr 5S e RNAt 4S e com *RNA Integrity Number* (RIN) \geq 9.0 foram utilizadas.

4.9 Oligo microarrays

4.9.1 mRNAs microarrays

Os *microarray*s genoma completo da Agilent formato 4 x 44k (Figura 14) são preparados pelo processo *SurePrint* (sistema de impressão), no qual 44.000 oligos de 60 mer são sintetizados *in situ* em lâminas de vidro (2,5 x 7,5 cm) especialmente preparadas. Este processo de síntese *in situ* possibilita a fixação de oligonucleotídeos, sintetizando-os base a base com extrema precisão utilizando arquivos de sequências de RNAs mensageiros (mRNAs) a partir de bancos de dados.



Figura 14. Agilent *microarray*s no formato 4 x 44k contendo oligonucleotídeos sintetizados a partir de sequências de RNAs mensageiros.

A amplificação e a marcação das amostras com o fluorocromo foram feitas com o *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 brevemente centrifugada antes do uso.

Em seguida, foram feitas diluições seriadas segundo recomendação do fabricante levando em consideração a quantidade inicial de RNA total. Para as nossas amostras a opção foi de 500 ng de RNA total num volume final de 5,3 µl. 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 em 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 amplificação e marcação das amostras adicionando 500 ng de RNA total a um tubo de 1,5 ml e depois 1,2 μ l de *T7 Promoter Primer.* Em seguida, adicionou-se água livre de nucleases a 5 μ l da terceira diluição do *Agilent One-Color Spike-Mix* obtendo um volume final de 11,5 μ l. 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 18 µl do *5x First Strand Buffer* (pré-aquecido a 80°C por 4 minutos), sendo adicionados 9 µl de 0,1M DTT; 4,5 µl de 10mM dNTP mix; 4,5 µl MMLV-RT e 2,3 µl de *RNaseOut* sendo distribuído um volume de 8,5 µl 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 gelo picado permanecendo assim por mais 5 minutos.

Imediatamente antes do uso foi preparado um *Transcription Master Mix* (por lâmina) a partir de 68,9 μ l de água livre de nucleases; 90 μ l de 4*x Transcription Buffer*, 27 μ l de 0,1M DTT; 36 μ l de NTP mix; 28,8 μ l de 50% PEG (pré-aquecido a 40°C por 1 minuto); 2,3 μ l de *RNaseOut*, 2,7 μ l de *Inorganic*

pyrophosphatase; 3,6 μl de *T7 RNA Polymerase* e 10,8 μl de *Cyanine 3-CTP*. Cada tubo de amostra recebeu 60 μl *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 (280 µl) do tampão *RA1* em cada amostra. Em seguida a cada tubo foram adicionados 280 µl de etanol 100% (equivalente também a 3,5x o volume da reação) com posterior homogeneização.

A purificação do RNA foi realizada através de minicolunas *RNAspin* aplicando o volume total (640 μ I) de cada amostra na coluna seguida de centrifugação de 30 segundos a 8.000 x g. Cada coluna foi então transferida para um 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 600 μ I do tampão *RA3* em cada coluna seguida de uma centrifugação de 1 minuto a 11.000 x g. O líquido foi descartado e a coluna foi posta novamente no tubo para uma terceira lavagem aplicando-se 250 μ I do tampão *RA3*, seguida de centrifugação por 2 minutos a 11.000 x g.

O último passo do kit envolveu a eluição do RNA em alta concentração adicionando-se 40 µl de água livre de nucleases aquecida a 95°C seguida de centrifugação por 1 minuto a 11.000 x g.

Em seguida o RNA foi quantificado em um espectrofotômetro *NanoDrop ND-1000 UV-VIS* (NanoDrop Technologies) calculando-se a massa de RNA.

Além disso, foi determinada a incorporação do fluorocromo cianina (Cy3) nas amostras (pmol Cy3 / µl). O valor da incorporação total dividido pela massa total fornece um valor que serve como referência para o prosseguimento do passo de hibridação com os *microarrays*. 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 *microarrays* Agilent 4 x 44K. Cada amostra contendo 1,65 µg de RNA marcado e amplificado (cRNA) recebeu 11 µl de *10x Blocking Agent* (preparado com a adição de 500 µl 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 μ l sendo necessário completar cada amostra com o volume de água livre de nucleases correspondente. Por último adicionou-se 2,2 μ l de *25x Fragmentation Buffer* em cada tubo sendo o volume final da reação de 55 μ l. 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* Agilent 4 x 44K, adicionou-se 55 μ l do 2*x GEx Hybridization Buffer HI-RPM* em cada tubo e após homogeneização as amostras foram centrifugadas por 1 minuto a 13.000 x g. Um volume de 100 μ l de cada amostra foi utilizada imediatamente para o processo de hibridação em forno a 65°C com 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 a 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 a temperatura ambiente e por último na solução *Stabilization and Drying* por 30 segundos a temperatura ambiente para prevenir a degradação da cianina 3 (Cy3) pelo ozônio do ar ambiente.

Após serem retiradas da solução, as lâminas foram varridas imediatamente (*scanning*) evitando o impacto dos oxidantes ambientais na intensidade dos sinais. Para isto, foi utilizado o *DNA Microarray Scanner* (Agilent Technologies) e os dados foram extraídos com o *Agilent Feature Extraction Software*.

4.9.2 microRNAs microarrays

Os *microarrays* de microRNAs Agilent 8 x 15k (Figura 15) utilizados nesse trabalho (G4471A, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) também são preparados pelo processo *SurePrint* (sistema de impressão), no qual aproximadamente 15.000 oligos são depositados uniformemente em lâminas de vidro previamente preparadas. Este processo de síntese *in situ* possibilita a deposição de oligonucleotídeos, base a base, de 40-60-mer de comprimento (o

que inclui a sequência de microRNA e uma cauda extra), com extrema precisão resultando em alta pureza e alta fidelidade das sondas de microRNAs.



Figura 15. Agilent *microarray*s no formato 8 x 15k contendo oligonucleotídeos sintetizados a partir de sequências de microRNAs.

A marcação das amostras foi feita com a utilização do *miRNA Complete Labeling and Hyb Kit* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) a partir de 100 ng de RNA total. O primeiro passo envolveu a diluição do RNA total para 50 ng / µl em água livre de nucleases. Posteriormente, adicionou-se 2 µl (100 ng) dessa diluição em um tubo de 0,5 ml e conservou-se no gelo enquanto foi preparado o CIP (*Calf Intestinal Alkaline Phosphatase*) *Master Mix*, que foi feito sem a marcação do *Spike-In.* A reação por amostra do *CIP Master Mix* continha: 0,4 µl de *10x Calf Intestinal Phosphatase Buffer*, 1,1 µl de água livre de nucleases e 0,5 µl de *Calf Intestinal Phosphatase*, sendo o volume final em cada amostra de 4 µl.

O passo seguinte envolveu a defosforilação das amostras. Todos os tubos foram colocados a 37°C em um banho-maria por 30 minutos. Em seguida, desnaturaram-se as amostras adicionando em cada uma delas 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 a desnaturação, partiu-se para o processo de ligação preparando-se o *Ligation Master Mix*. Nesse *mix* utilizou-se por 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*, resultando num volume final

de 11,3 µl misturou-se gentilmente e uma baixa e rápida centrifugação foi feita antes que os tubos fossem levados para incubação a 16°C em num aparelho termociclador por 2 horas.

Decorrido o tempo da incubação, as amostras foram submetidas a secagem a vácuo a temperatura entre 45°C e 55°C num aparelho *SC110A SpeedVac® Plus Concentrator* (Savant Instruments, Holbrook, NY, USA) por aproximadamente 30 minutos observando-se que estivessem totalmente secas e sem resíduos de DMSO.

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

Enquanto ocorria a incubação, as câmaras de hibridação contendo as lâminas da Agilent foram preparadas para receber as amostras. Tudo deve ocorrer num período máximo de 15 minutos. O processo de hibridação com os *microarrays* aconteceu num forno a 55°C com 20 rpm de rotação durante 20 horas.

Após a hibridação, as lâminas foram submetidas a imersão em *GE Wash Buffer 1* (com 0,005% Triton X-102), a temperatura ambiente, para a liberação da lâmina em meio líquido, evitando o ressecamento e exposição ao ozônio do ar capaz de degradar a cianina (*Cyanine3-pCp*).

Em seguida, foram realizadas duas lavagens: a primeira no tampão 1 (*GE Wash Buffer 1* - 0,005% Triton X-102) a temperatura ambiente por 5 minutos e a segunda no tampão 2 (*GE Wash Buffer 2* - 0,005% Triton X-102) por 5 minutos a 37°C. A adição do Triton reduz a possibilidade de artefatos nos *arrays*.

Após serem retiradas da solução, as lâminas foram varridas imediatamente (*scanning*) evitando o impacto dos oxidantes ambientais na intensidade dos sinais utilizando o *DNA Microarray Scanner* (Agilent Technologies).

4.10 Análise dos dados de microarrays

Após o escaneamento das lâminas, os dados foram extraídos com o uso do *Agilent Feature Extraction Software* e os arquivos gerados no programa foram analisados na plataforma de bioinformática *Agilent GeneSpring GX 11.0*.

Para a normalização dos dados de mRNAs, utilizou-se o 75 percentil segundo recomendações da Agilent que informa que os valores dos sinais de expressão nessa situação, em comparação com os sinais da mediana ou do 50 percentil, são mais robustos e representativos quando se usa o *one-color microarray*.

A distribuição dos valores de intensidade dos dados normalizados para cada amostra foram plotados num gráfico *Box-whisker*. As amostras foram ainda comparadas aos pares em relação a uma amostra escolhida (timócitos).

O software GeneSpring nos permite ainda uma análise de Gene Ontology (GO) com a distribuição dos genes em categorias como: processos biológicos, função molecular e componente celular. Para determinar se há uma representação significante dos dados analisados em relação a essas categorias, um teste estatístico é requerido e um *p-value* é dado para cada categoria.

No presente trabalho somente os processos biológicos relacionados ao sistema imune foram analisados evidenciando os genes (mRNAs) que se apresentaram diferencialmente expressos.

Para a normalização dos dados de microRNAs, utilizou-se o quantil.

A distribuição dos valores de intensidade dos dados normalizados para cada amostra foram plotados num gráfico *Box-whisker*. As amostras foram ainda comparadas aos pares em relação a uma amostra escolhida (timócitos).

Como o *software* GeneSpring não permite análise de *Gene Ontology* (GO) para microRNAs, os mRNAs alvos dos microRNAs aqui estudados foram identificados de acordo com os processos biológicos por análise comparativa entre os dados encontrados para a GO dos mRNAs diferencialmente expressos e os resultados das redes de interações microRNAs-mRNAs.

Além disso, os bancos de dados mirBase (http://www.mirbase.org/) e microRNA.org (http://www.microrna.org) foram utilizados no estudo das interações microRNAs-mRNAs tanto para as interações já conhecidas, como para as encontradas no presente trabalho mas ainda não descritas.

4.11 Redes de interações microRNAs-mRNAs

Uma grande variedade de metodologias tem sido utilizada para inferir redes gênicas regulatórias a partir de dados temporais. Entre esses métodos estão modelos discretos, como as redes Booleanas e Bayesianas, modelos contínuos, como as redes neurais e equações diferenciais. Todos esses modelos levam em consideração que o nível de expressão de um gene, num determinado intervalo de tempo, é dado em função do nível de expressão dos outros genes nos tempos anteriores (WANG *et al.*, 2006).

A inferência da arquitetura de redes gênicas a partir de dados temporais obtidos de tecnologias experimentais, como por exemplo, os *microarrays*, ajuda a entender e esclarecer o comportamento do sistema em relação a expressão gênica e a regulação envolvida nessa expressão, tanto durante a transcrição como também de caráter regulatório pós-transcricional, como resultado da ação dos microRNAs.

No presente trabalho, procurou-se estudar o controle pós-transcricional que os microRNAs de timócitos e linfócitos T CD3⁺ periféricos exercem sobre mRNAs das mesmas células por meio da reconstrução de redes de interações microRNAs-mRNAs durante a transição do estado pré-diabético para diabético em camundongos NOD.

4.11.1 Software GenMiR⁺⁺

Para o estudo de interações utilizou-se o algorítimo de estatística bayesiana GenMiR⁺⁺ (Generative model for miRNA regulation) com o intuito de reconstruir redes de interações gerando figuras do tipo *pathways* pelo pareamento dos perfis de expressão de microRNAs (miRNAs) e mRNAs (HUANG *et al.*, 2007) que calcula, com alta sensibilidade, microRNAs reguladores de mRNAs equilibrando as diferentes fontes de incerteza no cálculo.

4.11.2 Software MATLAB

O MATLAB (http://www.mathworks.com/products/matlab/index.html) (MATrix LABoratory) é um programa interativo de alta performance voltado para o cálculo numérico que contém o algorítimo 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 C, C++ ou Fortran.

4.11.3 Software Cytoscape

A partir da matriz de dados gerados no GenMiR⁺⁺ dentro do programa MATLAB foi montado um arquivo no formato texto que em seguida foi utilizando no programa Cytoscape v.2.8.0 (http://www.cytoscape.org) que tornou possível a visualização gráfica das interações microRNA-mRNA calculadas. Tal programa oferece funcionalidades 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 como *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 quando usado em conjunto com grandes bases de dados de expressão gênica (por exemplo, dados de expressão de RNAs obtidos por *microarrays*), dados de expressão proteína-proteína ou ainda proteína-DNA.

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

4.12 Reações de transcrição reversa

Reações de transcrição reversa foram realizadas com 2 μ g de RNA total, 1 μ l de oligo (dT) e 1 μ l de DNTP mix 10 nM em um volume de 12 μ l, segundo instruções do fabricante. As amostras permaneceram a 65°C durante 5 minutos e depois foram colocadas imediatamente no gelo e foi dado um *spin* para que se evitasse a evaporação da amostra após a abertura do tubo. Em seguida, acrescentou-se 4 μ l de *Buffer 5x first-strand*, 2 μ l de dTT e 1 μ l de *RNAsin* e

deixou-se por 2 minutos a 42°C. Adicionou-se 1 µl de enzima *Superscript II RNase H Reverse Transcriptase* (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) resultando num volume final de 20 µl e a reação permaneceu a 42°C por 50 minutos, e depois a 70°C por 15 minutos.

4.13 Reação de polimerização em cadeia em tempo real (qPCR)

A PCR quantitativa em tempo real (qPCR) foi utilizada para a confimação dos dados de microarray para cinco genes que se apresentaram diferencialmente expressos entre timócitos e linfócitos CD3⁺ periféricos: Fasl, Tlr3, Tlr4, Foxp3 e Themis. O gene Hprt foi usado como controle endógeno (Tabela I).

As reações de qPCR foram feitas utilizando o reagente *SYBR Green* (Applied Biosystems) em placas de 48 poços com ciclagem padrão de aproximadamente 2 horas. O aparelho utilizado foi o *StepOne* (Applied Biosystems) juntamente com o *software* de leitura de mesmo nome (Versão 2.1 - Applied Biosystems).

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

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

O protocolo de ciclagem térmica foi: 1 x 95°C durante 10 minutos (*Holding stage*); 40x : desnaturação a 95°C, 15 segundos e anelamento 60°C, 1 minuto (*Cycling stage*); obtenção da curva de *melting* (*Melting curve stage*). A curva é obtida após três passos sendo o primeiro a 95°C, 15 segundos; o segundo a 60°C, 1 minuto e o terceiro por 95°C, 15 segundos.

Os *primers* utilizados foram desenhados com o auxilio do *software* Primer3 (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi) cujos parâmetros foram

ajustados para que todos apresentassem temperatura de pareamento *(annealing)* a 60°C (Tabela I).

Gene	Número de acesso	Sequências sense e antisense
Hprt	NM_013556.2	5' GCCCCAAAATGGTTAAGGTT 3'
		5' CAAGGGCATATCCAACAACA 3'
Fasl	NM_010177.3	5' ACTCCGTGAGTTCACCAACC 3'
		5' GTGGGGGTTCCCTGTTAAAT 3'
Tlr3	NM_126166.4	5' TTGTCTTCTGCACGAACCTG 3'
		5' CCCGTTCCCAACTTTGTAGA 3'
Tlr4	NM_021297.2	5' TCAGAACTTCAGTGGCTGGA 3'
		5' CCTGGGGAAAAACTCTGGAT 3'
Foxp3	NM_001199347.1	5' TCTTCGAGGAGCCAGAAGAG 3'
		5' GCTCCAGAGACTGCACCACT 3'
Themis	NM_178666.5	5' AAATGAAGCTCACCTTGCTCA 3'
		5' ATCCTGGCCACTTTCATCTG 3'

Tabela I. Primers utilizados nas reações de qPCR e suas respectivas sequências sense e antisense.

4.14 Análise estatística dos dados de PCR quantitativa em tempo real

A avaliação da expressão dos transcritos por PCR quantitativa em tempo real ocorre por meio de uma análise diferente daquela empregada nos dados de *microarrays*. Os valores de quantificação relativa são calculados utilizando-se a comparação de genes constitutivos, conforme descrito por PFAFFL (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 5.0* (http://www.graphpad.com/prism/Prism.htm).

Delineamento Experimental

5. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL



Resultados
6. RESULTADOS

6.1 Avaliação da insulite em camundongos NOD

Visando acompanhar o avanço da infiltração dos linfócitos T no pâncreas e a consequente insulite que leva a destruição das células β produtoras de insulina (ilhotas de Langerhans), realizou-se um estudo histológico para a observação desse processo ao longo do desenvolvimento do animal e a concomitante emergência do diabetes.

Para o estudo, foram removidos pâncreas de camundongos NOD prédiabéticos a partir de um mês de idade e em mais sete fases subsequentes, inclusive de animais diabéticos. Os tecidos foram utilizados para a confecção de lâminas histológicas.

A análise histológica dessas lâminas mostrou que os animais com um mês de idade apresentaram poucos infiltrados inflamatórios nas ilhotas de Langerhans, envolvidas por ácinos exócrinos mistos normais (Figura 16A); aos três meses, verificou-se aumento da presença de linfócitos nos limites externos das ilhotas (Figura 16B), passando-se para invasão mais intensa nos meses subsequentes, principalmente aos quatro meses e meio, seis meses e oito meses (Figuras 16C-G). Nota-se que os animais com diabetes comprovada apresentaram ausência de ilhotas de Langerhans no pâncreas (Figura 16H).



Figura 16. Histologia do pâncreas de camundongos NOD em diferentes idades evidenciando o aumento do infiltrado linfocitário (*) e a consequente destruição das células β pancreáticas: A) 1 mês; B) 3 meses; C) 4,5 meses; D) 5,5 meses; E) 6 meses; F) 7 meses; G) 8 meses e H) animais diabéticos com \geq 7,0 meses de idade.

6.2 Emergência de diabetes mellitus (DM-1) em camundongos NOD

Durante o andamento deste trabalho adequamos a manutenção dos camundongos NOD em condições SPF (*specific patogen free*) em nosso próprio laboratório, o que possibilitou o desenvolvimento do diabetes mellitus tipo 1 (DM-1) entre os camundongos provenientes do biotério da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB UNICAMP).

Foram adquiridos camundongos fêmeas NOD com 1 mês de idade, dentre os quais algumas foram imediatamente utilizadas para a obtenção de timócitos e linfócitos T CD3⁺ periféricos, enquanto que as demais fêmeas foram monitoradas a partir dos quatro meses em relação a glicemia para a obtenção de animais diabéticos. Ao longo de oito meses, 21 animais se tornaram diabéticos e foram utilizados no isolamento de linfócitos T CD3⁺ periféricos. A figura 17 mostra o aumento no número de fêmeas diabéticas segundo a idade.



Figura 17. Aumento no número de fêmeas da linhagem NOD que desenvolveram DM-1 ao longo de oito meses após o nascimento.

6.3 Quantificação das populações celulares por citometria de fluxo

Procurando avaliar a pureza das células obtidas após a separação de timócitos por membrana de *nylon* e através do isolamento dos linfócitos T CD3⁺ periféricos provenientes do baço por meio de esferas magnéticas, foram

realizados ensaios com o uso de anticorpos anti-CD3 marcados com ficoeritrina e citometria de fluxo. A figura 18A mostra que 93% das células obtidas pela separação em membrana de *nylon* correspondem a timócitos. A figura 18B, por sua vez, mostra que 87% das células que não aderiram às esferas magnéticas (seleção negativa) correspondem a linfócitos T CD3⁺.



Figura 18. Análise da pureza das células T por citometria de fluxo (FACs - Fluorescent activated cell sorting). A) Timócitos e B) Linfócitos T CD3⁺ periféricos.

Em relação à população de linfócitos T CD3⁺ obtida por isolamento com esferas magnéticas e provenientes de baço de camundongos NOD pré-diabéticos e diabéticos, procurou-se ainda caracterizá-los como linfócitos T CD4⁺ ou CD8⁺.

Após a incubação com anticorpos específicos para os marcadores de superfície CD3, CD4 e CD8 seguida de citometria, os dados foram analisados e

como mostra o resultado da figura 19, as populações de linfócitos T CD4⁺ são mais abundantes em relação aos linfócitos T CD8⁺ tanto em camundongos prédiabéticos quanto nos diabéticos.



CD4



Figura 19. Caracterização da população de linfócitos T de camundongos NOD pré-diabéticos e diabéticos por citometria de fluxo.

6.4 Avaliação da integridade das amostras de RNA

As amostras de RNA total dos timócitos e linfócitos T CD3⁺ periféricos de baço dos camundongos NOD foram analisadas por eletroforese microfluídica utilizando o aparelho *Agilent 2100 Bioanalyzer*. A integridade das amostras pode ser observada pela imagem do gel virtual (Figura 20) e da densitometria, nas

quais podem ser vistas as frações de RNAr 28S, RNAr 18S, RNAs 4-5S e também de RNAs de baixo peso molecular exibindo perfil de excelente integridade (Figura 21).



Figura 20. Gel virtual das amostras de RNA estudadas mostrando RNAr 28S, RNAr 18S e RNAs 4-5S. L = Ladder; 1) timócitos NOD 1 mês; 2) linfócitos NOD pré-diabéticos 1 mês (näive); 3) linfócitos NOD pré-diabéticos 7 meses; 4) linfócitos NOD diabéticos (ativados).



Figura 21. Densitometria das amostras de RNA estudadas mostrando as frações de RNAr 28S, RNAr 18S e RNAs 4-5S. Amostras de timócitos e linfócitos T CD3⁺ periféricos estudados com o RIN (RNA integrity number) = 10,0.

6.5 Análise dos mRNAs diferencialmente expressos

Após o escaneamento das lâminas de *microarrays*, os dados foram extraídos com auxílio do *Agilent Feature Extraction Software* e os arquivos gerados foram analisados com o uso do programa *GeneSpring GX 11.0* da Agilent.

Os dados de mRNAs foram normalizados utilizando o 75 percentil e a distribuição dos valores de intensidade dos dados normalizados para cada amostra foram plotados num gráfico *Box-whisker*. Após a análise estatística por meio de *One-way* ANOVA com *p-value* \leq 0,05 no qual as amostras foram comparadas aos pares em relação a uma amostra escolhida (timócitos) foram evidenciados 22.449 mRNAs diferencialmente expressos. Com a escolha de *fold-change* \geq 2.0 foram evidenciados 2.771 mRNAs que finalmente formaram o conjunto de dados estudados no presente trabalho (Figura 22).

Com relação a análise do *Gene Ontology* (GO) após a escolha de um *p*value cut-off < 0,1 foram selecionados somente os processos biológicos mais relacionados com sistema imune, evidenciando os mRNAs que se apresentaram diferencialmente expressos (Tabela II).



Figura 22. Comparação dos perfis de expressão gênica entre os camundongos da linhagem NOD. Matriz de expressão de 2.771 mRNAs de timócitos e linfócitos T CD3⁺ periféricos do baço de camundongos pré-diabéticos (1 mês e 7 meses de idade) e de camundongos diabéticos. A correlação de Pearson foi utilizada como medida de similaridade.

Tabela II.	. Processos	biológicos do	s grupos d	e mRNAs	diferencialm	ente expressos	de acordo com
o Gene C	ntology.	-	•				

Grupo	Processo Biológico	mRNAs
	Ativação do sistema imune	Cd55 Daf2 Fcer1g Kire1 Kirk1 Lax1 Lyn Malt1 Masp2 Plcg2 Tir3 Tir4 Tir6 Unc93b1
	Resposta imune adaptativa	Bcl3 Cd55 Cd74 Daf2 Fcer1g Fcgr3 Icam1 IcosI Lilrb3 Masp2 Pou2f2 Slc11a1 Tlr6
	Ativação cellular	Bank1 Bcl11a Bcl3 Btk Casp1 Cd74 Clcf1 Cplx2 Cxcr5 Elf4 Entpd1 Fcer1g Fcgr3 Fyb Gapt Gpr183 H2-M3 Hdac9 Hhex IcosI II4 Irf1 Irf4 Itgax KIre1 KIrk1 Lax1 Lbp Lilrb3 Lyn Malt1 Plcg2 Pou2f2 Slc11a1 Tlr3 Tlr4 Tlr6 Vwf
	Resposta de defesa	Alox5 Bcl3 Btk Ccl19 Ccl5 Ccr2 Ccr5 Cd163 Cd180 Cd36 Cd55 Cd74 Chst2 Ciita Clec4a2 Clec4d Cnr2 Daf2 Ddx58 Fcer1g Fcgr3 H2-K1 H2-M3 Hdac9 II18rap II1b Irf8 Lbp Lta Ly86 Lyn Malt1 Masp2 Mefv Ncf1 Neurod2 Pglyrp1 Prg2 Samhd1 Slc11a1 Tirap Tlr3 Tlr4 Tlr6
	Cascata quinase I- kappaβ /NF-kappaβ	Btk Irak2 Malt1 Rel Tirap Tlr4
1	Processos do sistema imune efetor	Bcl3 Btk Cd55 Cd74 Cplx2 Daf2 Fcer1g Fcgr3 lcam1 lcosl Lax1 Lbp Lilrb3 Lyn Masp2 Ncf1 Pou2f2 Slc11a1
	Resposta imune	Bcl3 Btk Ccl19 Ccl5 Ccl9 Ccr2 Cd180 Cd55 Cd74 Ciita Clec4a2 Clec4d Cplx2 Daf2 Ddx58 Enpp1 Fasl Fcer1g Fcgr3 Fcgrt Gpr183 H2-D1 H2-K1 H2-M3 H2-Q10 H2-Q2 H2-Q7 H2-Q8 H2-T23 Hfe Icam1 Icosl Igj II18rap II1b II4 Irf8 Irf8 Lax1 Lbp Lilrb3 Lta Ltb Ly86 Lyn Malt1 Masp2 Ncf1 Oas1b Pglyrp1 Plcg2 Pou2f2 Prg2 Samhd1 Slc11a1 Tirap TIr3 TIr4 TIr6
	Resposta imune – ativação de transdução de sinal	Fcer1g Klre1 Klrk1 Lax1 Lyn Malt1 Plcg2 Tlr3 Tlr4 Tlr6 Unc93b1
	Processos do sistema imune	Bank1 Bcl11a Bcl3 Btk Casp1 Ccl19 Ccl5 Ccl9 Ccr2 Cd180 Cd300lf Cd55 Cd74 Ciita Clcf1 Clec4a2 Clec4d Cplx2 Crkl Csf1 Csf3r Cxcr5 Daf2 Ddx58 Dnase2a Elf4 Enpp1 Fasl Fcer1g Fcgr3 Fcgrt Fyb Gapt Gpr183 H2-D1 H2-K1 H2-M3 H2-Q10 H2-Q2 H2-Q7 H2-Q8 H2-T23 Hdac9 Hfe Hhex Icam1 Icosl Igj II18rap II1b II4 Irf1 Irf4 Irf8 Itgax KIre1 KIrk1 Lax1 Lbp LiIrb3 Lta Ltb Ly86 Lyn Malt1 Masp2 Myo1e Ncf1 Oas1b Pglyrp1 Plcg2 Pou2f2 Prg2 Samhd1 Slc11a1 Terc Tirap Tlr3 Tlr4 Tlr6 Tnfrsf13c Unc93b1
	Resposta inflamatória	Alox5 Btk Ccl19 Ccl5 Ccr2 Cd163 Cd180 Cd55 Chst2 Cnr2 Daf2 Fcgr3 Hdac9 II1b Lbp Lta Ly86 Lyn Masp2 Mefv Ncf1 Slc11a1 Tirap Tlr3 Tlr4 Tlr6

Grupo	Processo Biológico	mRNAs
	Ativação de linfócitos	Bank1 Bcl11a Bcl3 Cd74 Clcf1 Cxcr5 Elf4 Gapt Gpr183 H2- M3 Hdac9 Hhex IcosI II4 Irf1 Itgax KIre1 KIrk1 Lax1 Malt1 Plcg2 Pou2f2 Slc11a1
	Ativação de linfócitos durante a resposta imune	Bcl3 Gpr183 H2-M3 Plcg2 Slc11a1
	Imunidade mediada por linfócitos	Bcl3 Cd55 Cd74 Daf2 Fcer1g Fcgr3 Icam1 Icosl Lilrb3 Masp2 Pou2f2 Slc11a1
	Regulação positiva da produção de interferon-gama	Bcl3 H2-M3 Irf8 KIre1 KIrk1 Lta Slc11a1 TIr4
1	Regulação da resposta de defesa	Adrb2 Anxa1 Cadm1 Ccl5 Ccr5 Cnr2 Crtam Fcer1g Fcgr3 H2- BI H2-M3 Klrb1b Klre1 Klrk1 Lta Nt5e Tgm2 Tlr3 Tlr4 Tlr6 Unc93b1
	Regulação dos processos do sitema imune efetor	Cadm1 Crtam Fcer1g Fcgr3 H2-Bl H2-K1 H2-M3 Hmox1 Klrb1b Klre1 Klrk1 Lta
	Regulação da resposta imune	Btla Cadm1 Cd55 Crtam Daf2 Fcer1g Fcgr3 H2-Bl H2-K1 H2- M3 II4 KIrb1b KIre1 KIrk1 Lax1 Lta Lyn Malt1 Masp2 Plcg2 Slc11a1 TIr3 TIr4 TIr6 Tnfrsf13c Unc93b1
	Regulação da resposta inflamatória	Adrb2 Anxa1 Ccl5 Cnr2 Fcer1g Fcgr3 Lta Nt5e Tgm2 Tlr4
	Regulação da citotoxicidade mediada por leucócitos	Cadm1 Crtam H2-BI H2-K1 H2-M3 Klrb1b Klre1 Klrk1
	Apoptose	Actc1 Bag3 Dapl1 Dedd2 Fasl Gramd4 Hipk2 Nfkb1 Nod1 Pea15a Pim2 Pmaip1 Psen2 Ripk1 Sgk1 Sgms1 Shisa5 Tmem173 Traf1 Traf3ip2 Traf5
	Resposta imune	B2m Ccl3 Ccl5 Cxcl9 Eomes Fasl Foxp3 H2-Q10 II18r1 II1rl1 II7r Irgm1 Myo1f Pf4 Psen2 Tgtp1 Tlr1 Tmem173 Tnfaip8l2 Tnfsf8 Traf3ip2
2	Processos do sistema imune	B2m Ccl3 Ccl5 Cxcl9 Eomes Fasl Flt3l Foxp3 Gimap5 H2-Q10 Il18r1 Il1rl1 Il2rb Il7r Irf1 Irgm1 Jak3 Myo1f Nfkb1 P2rx7 Pf4 Pik3cd Psen2 Slamf1 Tgfbr2 Tgtp1 Tlr1 Tmem173 Tnfaip8l2 Tnfsf8 Traf3ip2
	Regulação da cascata quinase l- kappaβ /NF-kappaβ	Card6 II1rl1 Nod1 Pim2 Tgm2
	Regulação da transducão de sinal	Arhgef12 Arhgef3 Arrb1 Arrb2 Axin2 Card6 Cd44 Fasl Furin II1rl1 Nod1 P2rx7 Pim2 Psen2 Rasa3 Rasgrp2 Rgs11 Runx2 S1pr1 Smad7 Socs3 Spry2 Tgm2 Zeb2

Grupo	Processo Biológico	mRNAs
3	Processos do sistema imune	Add2 Ahsp Ank1 Ccl4 Ccr2 Cd48 Cebpa Ctla4 Ctse Elane Epas1 Epb4.2 Gimap5 Gm5077 ld2 lfng ll1r1 ll1rl1 ll1rl2 ltgam Junb Klf1 Klf11 Mpo Plscr1 Polr3c Samhd1 Spna1 Tal1 Tgtp1 Trim10 Txnrd2 Zbtb32
	Comunicação celular	Atg16l1 Bmp8a Cacna1c Cblc Chat Cldn5 Cxcr7 Drd5 Erbb3 Gad1 Gad2 Gast Gja5 Gnal Gpr12 Gpr173 Gpr82 Grp Grpr Hnf1b Itgax Kcnk2 Lin7a Mrgprb2 Ngfr Olfr1010 Olfr1022 Olfr1048 Olfr107 Olfr1090 Olfr1115 Olfr1161 Olfr128 Olfr1377 Olfr1384 Olfr1388 Olfr1459 Olfr1462 Olfr1469 Olfr1495 Olfr304 Olfr33 Olfr350 Olfr365 Olfr516 Olfr523 Olfr556 Olfr606 Olfr62 Olfr651 Olfr68 Olfr684 Olfr724 Olfr768 Olfr770 Olfr784 Olfr790 Olfr796 Olfr845 Olfr889 Olfr904 Olfr924 Olfr974 Park2 Pdx1 Pik3c2g Plat Pth Rab3b Rab3c Slc1a2 Slc6a4 Syn2 Taar4 Tacr1 Upk1a Vmn2r26 Vmn2r81 Xcr1
4	Via de sinalização do receptor protéico acoplado proteína G	Cxcr7 Drd5 Gast Gnal Gpr12 Gpr173 Gpr82 Grp Grpr Kcnk2 Mrgprb2 Olfr1010 Olfr1022 Olfr1048 Olfr107 Olfr1090 Olfr1115 Olfr1161 Olfr128 Olfr1377 Olfr1384 Olfr1388 Olfr1459 Olfr1462 Olfr1469 Olfr1495 Olfr304 Olfr33 Olfr350 Olfr365 Olfr516 Olfr523 Olfr556 Olfr606 Olfr62 Olfr651 Olfr68 Olfr684 Olfr724 Olfr768 Olfr770 Olfr784 Olfr790 Olfr796 Olfr845 Olfr889 Olfr904 Olfr924 Olfr974 Pth Taar4 Tacr1 Vmn2r26 Vmn2r81 Xcr1
	Transdução de sinal	Bmp8a Cblc Cxcr7 Drd5 Erbb3 Gast Gnal Gpr12 Gpr173 Gpr82 Grp Grpr Itgax Kcnk2 Mrgprb2 Ngfr Olfr1010 Olfr1022 Olfr1048 Olfr107 Olfr1090 Olfr1115 Olfr1161 Olfr128 Olfr1377 Olfr1384 Olfr1388 Olfr1459 Olfr1462 Olfr1469 Olfr1495 Olfr304 Olfr33 Olfr350 Olfr365 Olfr516 Olfr523 Olfr556 Olfr606 Olfr62 Olfr651 Olfr68 Olfr684 Olfr724 Olfr768 Olfr770 Olfr784 Olfr790 Olfr796 Olfr845 Olfr889 Olfr904 Olfr924 Olfr974 Pdx1 Pik3c2g Plat Pth Rab3b Rab3c Taar4 Tacr1 Upk1a Vmn2r26 Vmn2r81 Xcr1
	Apoptose e sua regulação	Alms1 Bcl2l1 Birc5 Bub1 Bub1b Casp6 Ckap2 Cul7 E2f1 E2f2 Egln3 Epha2 Fas Ift57 Krt18 Krt8 Lig4 Phlda1 Rad21 Rtn3 Stk3 Tfdp1 Tia1 Tpx2 Traf4 Trp53inp1 Vdac1
	Ativação celular	Ada Bcl11b Ccnd3 Cd4 Cd8a Cxcl12 Fas Hdac7 Hells Lig4 Ly6d Msh6 Patz1 Rag1 Rorc Satb1 Sox4 Themis
5	Proliferação celular	Alms1 Aspm Bcl2l1 Ccnd3 Cxcl12 Gins1 Hells Hmgb1 Lig4 Lipa Mki67 Ncapg2 Nde1 Satb1 Tacc2 Tacc3 Uhrf1 Vegfa
	Ativação de linfócitos	Ada Bcl11b Ccnd3 Cd4 Cd8a Cxcl12 Faz Hdac7 Hells Lig4 Ly6d Msh6 Patz1 Rag1 Rorc Satb1 Sox4 Themis
	Ciclo celular	1190002H23Rik Anapc5 Anln Aspm Aurka B230120H23Rik Birc5 Bub1 Bub1b C79407 Casc5 Ccdc99 Ccna2 Ccnb1 Ccnb2 Ccnd3 Ccne2 Ccnf Ccng2 Cdc20 Cdc25a Cdc25c Cdc45 Cdca2 Cdca3 Cdca5 Cdk1 Cdkn1a Cdkn2c Cdkn3 Cenpe Cenpj Cep55 Chek1 Ckap2 Ckap5 Cul7 E2f1 E2f2 E2f3 E2f7 Ercc6l Esco2 Espl1 F630043A04Rik Fam33a Fbxo5 Gas2l3

	_	
Grupo	Processo Biologico	mRNAs
		Gsg2 H2afx Haus2 Hells Kif11 Kif2c Kifc1 Lig4 Mad1l1 Mki67 Myb Ncapd2 Ncaph Ndc80 Nde1 Nek2 Nsl1 Nuf2 Nusap1 Pard6g Phgdh Prc1 Psrc1 Pttg1 Rad21 Rad51c Rbbp4 Rcc1 Sgol1 Sgol2 Skp2 Spag5 Spc25 Stmn1 Tacc2 Tacc3 Tfdp1 Tpx2 Trp53inp1 Tubb5 Tubg1 Ube2c Uhrf1 Wee1
5	Diferenciação de linfócitos	Ada Bcl11b Cd4 Cd8a Fas Hdac7 Hells Lig4 Ly6d Patz1 Rag1 Rorc Satb1 Sox4 Themis
	Ativação de células T	Bcl11b Ccnd3 Cd4 Cd8a Cxcl12 Fas Lig4 Patz1 Rag1 Rorc Satb1 Sox4 Themis
	Diferenciação de células T	Bcl11b Cd4 Cd8a Fas Lig4 Patz1 Rag1 Rorc Satb1 Sox4 Themis
	Recombinação V(D)J	Bcl11b Lig4 Rag1 Xrcc6
	CD8+, diferenciação alpha-beta das células T	Pax1 Satb1
	Diferenciação celular	Acan Bcl11b Bcl2l1 Bcl6 Bmp7 Cby1 Cdkn1c Cux1 Cxcl12 Dyrk1b Ephb2 Gjc1 Gpc2 Hdac2 Id3 Ift81 Igfbp3 Lhx2 Lig4 Morc1 Msi2 Myh10 Notch1 Notch3 Ntn1 Paqr5 Pax1 Pias2 Pitx2 Ptprf Rag1 Rag2 Runx1 Satb1 Sox11 Spata6 Spo11 Stra8 Tbata Thy1 Whrn
6	Adesão célula-célula	Acan Arvcf Jup Lmo4 Mcam Ncam1 Ntn1 Ptprf Pvrl3 Vangl2
	Diferenciação de linfócitos	Bcl11b Bcl6 Lig4 Pax1 Rag1 Rag2 Satb1
	Ativação de células T	Bcl11b Cxcl12 Lig4 Pax1 Rag1 Rag2 Satb1 Sla2
	Diferenciação de células T	Bcl11b Lig4 Pax1 Rag1 Rag2 Satb1
	Recombinação V(D)J para receptor de célula T	Bcl11b Lig4
	Recombinação V(D)J	Bcl11b Lig4 Rag1 Rag2

6.6 Análise dos microRNAs diferencialmente expressos

Da mesma maneira como descrita para os mRNAs os dados de microRNAs foram também extraídos com o uso do programa *Agilent Feature Extraction* e os arquivos foram analisados com o uso do programa *GeneSpring GX 11.0* da Agilent.

Os dados de microRNAs foram normalizados utilizando o quantil e a distribuição dos valores de intensidade dos dados normalizados para cada amostra foram plotados num gráfico *Box-whisker*. Após a análise estatística por meio de *One-way* ANOVA com *p-value* \leq 0,05 no qual as amostras foram comparadas aos pares em relação a uma amostra escolhida (timócitos) foram evidenciados 556 microRNAs diferencialmente expressos. Com a escolha de um *fold-change* \geq 2.0 foram evidenciados 116 microRNAs que finalmente formaram o conjunto de dados estudados no presente trabalho (Figura 23).



Linfócitos CD3⁺ NOD Diabéticos Linfócitos CD3⁺ NOD 7 meses Linfócitos CD3⁺ NOD 1 mês Timócitos NOD 1 mês

Figura 23. Comparação dos perfis de expressão de 116 microRNAs de camundongos da linhagem NOD. Matriz de expressão dos microRNAs de timócitos e linfócitos T CD3⁺ periféricos do baço de camundongos pré-diabéticos (1 mês e 7 meses de idade) e de camundongos diabéticos. A correlação de Pearson foi utilizada como medida de similaridade.

6.7 Redes de interação microRNAs-mRNAs

Procurando estudar o controle pós-transcricional que os microRNAs de timócitos e linfócitos T CD3⁺ periféricos exercem sobre os mRNAs dessas células, realizou-se um estudo utilizando programas para a reconstrução de redes de interações entre os microRNAs e os mRNAs durante a transição do estado prédiabético para diabético em camundongos NOD.

Para o estudo, foram considerados o conjunto dos 2.771 mRNAs e 27 microRNAs diferencialmente expressos (dentre os 116 como mostrado na figura 23). A tabela III mostra os cinco perfis de expressão dos microRNAs que foram selecionados.

Perfil de expressão	microRNA
MicroRNA induzido em linfócitos ativados (NOD diabético)	miR-7a*
MicroRNAs induzidos em linfócitos näives (NOD pré- diabético com 1 mês de idade)	miR-669h-5p miR-712 miR-24-2* mcmv-miR-M23-1-5p miR-125a-3p
MicroRNAs reprimidos em linfócitos näives (NOD pré- diabético com 1 mês de idade)	miR-33 miR-30a
MicroRNAs induzidos em timócitos (NOD pré-diabético com 1 mês de idade)	let-7f* miR-181c miR-128 miR-301a miR-494 miR-200b miR-363 miR-18a miR-101b miR-18a*
MicroRNAs reprimidos em timócitos (NOD pré-diabético com 1 mês de idade)	miR-139-5p miR-223 miR-29a* miR-101a miR-29b* miR-146a miR-150 miR-342-3p miR-30b*

Tabela III.MicroRNAsselecionadospeloperfildeexpressãonasdiferentesfasesdodesenvolvimentodas células T.

Com relação ao estudo das interações entre os microRNAs e os mRNAs diferencialmente expressos das células T em questão, optou-se pela construção de uma rede para cada um dos perfis citados anteriormente. A figura 24, mostra a interação do miR-7a*, que apresentou-se induzido em linfócitos ativados (NOD diabético), com 207 mRNAs diferencialmente expressos que se apresentaram reprimidos nos mesmos linfócitos (Tabela IV).



Figura 24. Rede mostrando a interação do microRNA miR-7a* e seus mRNAs alvos. MicroRNA induzido (vermelho) e mRNAs reprimidos (verde).

Outra rede de interação foi definida a partir de cinco microRNAs que se encontram induzidos em linfócitos näives (NOD pré-diabético 1 mês de idade) (Figura 25). O miR-669h-5p apresentou interação com 45 mRNAs reprimidos nos mesmos linfócitos. O miR-712, o miR-24-2*, o mcmv-miR-M23-5p e o miR-125a-

3p interagiram respectivamente com 84, 95, 173 e 100 mRNAs (Tabela IV), todos por sua vez, reprimidos em linfócitos näives.



Figura 25. Rede mostrando a interação dos microRNAs induzidos em linfócitos näives (NOD Prédiabético com 1 mês de idade) e seus mRNAs alvos. MicroRNAs induzidos (vermelho) e mRNAs reprimidos (verde).

Uma terceira rede de interação foi desenhada com os microRNAs miR-33 e miR-30a que se encontram reprimidos em linfócitos näives (NOD pré-diabético 1 mês de idade) (Figura 26). O miR-33 apresentou interação com 53 mRNAs enquanto que o miR-30a interagiu com 64 mRNAs. No caso do miR-33, 11 mRNAs se encontram reprimidos e 42 induzidos. Em relação ao miR-30a, 14 mRNAs estão reprimidos e 50 estão induzidos (Tabela IV).



Figura 26. Rede mostrando a interação dos microRNAs reprimidos em linfócitos näives (NOD Prédiabético com 1 mês de idade) e seus mRNAs alvos. MicroRNAs reprimidos (verde), mRNAs induzidos (vermelho) e mRNAs reprimidos (verde).

Uma quarta rede de interação foi estabelecida com os microRNAs induzidos em timócitos (NOD pré-diabético 1 mês de idade). Todos os mRNAs que apresentaram interação com os 10 microRNAs escolhidos se encontram induzidos (Tabela IV). A exceção foi para o mRNA do gene Gad1, que se apresenta reprimido, e mostrou estar interagindo somente com o miR-181c (Figura 27).



Figura 27. Rede mostrando a interação dos microRNAs induzidos em timócitos (NOD Prédiabético com 1 mês de idade) e seus mRNAs alvos. MicroRNAs induzidos (vermelho), mRNAs induzidos (vermelho) e mRNA reprimido (verde).

A última rede de interação foi gerada com 9 microRNAs reprimidos em timócitos (NOD pré-diabético 1 mês de idade) (Figura 28). Todos os mRNAs que apresentaram interação com os tais microRNAs escolhidos se encontram induzidos. Os microRNAs e a lista de seus mRNAs alvos podem ser vistos na tabela IV.



Figura 28. Rede mostrando a interação dos microRNAs reprimidos em timócitos (NOD Prédiabético com 1 mês de idade) e seus mRNAs alvos. MicroRNAs reprimidos (verde) e mRNAs induzidos (vermelho).

Tabela IV. MicroRNAs selecionados pelo perfil de expressão nas diferentes fases do desenvolvimento das células T e seus mRNAs alvos.

MicroRNA	mRNAs Alvos
miR-7a*	207 mRNAs reprimidos em linfócitos ativados (NOD diabético)
Induzido em linfócitos ativados (NOD diabético)	Ada, Akap1, Alms1, Anln, Aqp11, Arhgap11a, Armcx1, Arpp21, Arvcf,Asf1b,Aspm,Atp10a,Aurka,Bahcc1,BC055324,Birc5,Brdt, Brip1,Bub1,Bub1b,C79407,Camk4,Capn3,Casc5,Cbx1,Cbx2, Ccdc18,Ccdc99,Ccna2,Ccnb1,Ccnb2,Ccne2,Ccnf,Ccr9,Cdc20, Cdc25c,Cdc45,Cdca2,Cdca5,Cdca7,Cdk1,Cdkn3,Cenpe,Cenpf, Cenpi,Cenpl,Cenpm,Cenpn,Cep55,Chdh,Chek1,Ckap2,Ckap2I, Ctdspl,Cux1,Ddah2,Depdc1aDepdc1b,Dhfr,Dleu7,Dnajc6Dntt, Dtl,E2f1,E2f7,Ect2,Emilin1,Epb4.114b,Ercc6I,Esco2,Esp11,Evpl, Ezh2,F13a1,Fam125b,Fam33a,Fam64a,Fam72a,Fbxo5,Fignl1,Fo xm1,Gas2I3,Gdpd1,Gins1,Gm10270,Gm1060,Gm6985, Gpr162,Gpr56,Gtf2ird1,H2afj,H2afx,H3f3b,Hells,Hist1h1a, Hist1h1e,Hist1h2aa,Hist1h2ab,Hist1h2af,Hist1h2ai,Hist1h2ak, Hist1h2ao,Hist1h3a,Hist2h2ac,Hmgb2,Hmgn2,Igf2bp3,Igsf3, II17rb,Itm2a,Kif11,Kif14,Kif18a,Kif18b,Kif20a,Kif22,Kif23,Kif2c, Kif4,Kif7,Kifc1,Klhl4,Kpna2,Krt18,Lonrf3,Lxn,Ly6e,Lzff1,Maoa, MastI,Mex3a,Mki67,Mxd3,Myb,Myh10,Mylpf,Ncapd2,Ncapg, Ncapg2,Ncaph,Ndc80,Neil3,Nek2,Nphp1,Nsg1,Ns11,Nt5dc2, Nuf2,Nusap1,Pbk,Pcna,Phlda1Phxr2,Pitpnm2,Plk4,Plxdc2,Ppih,P pil5,Prickle1,Prodh,Prss1,Psrc1,Pttg1,Rad51ap1,Rad54b, Rag1,Ramp1,Rdh10,Rorc,Rps6kl1,Rrm2,Sgol1,Sgol2,Sh3gl3, Shcbp1,Slc16a1,Smo,Sox13,Sox4,Spag5,Spc25,Srd5a1,Stm1,T acc3,Tcf19,Tfdp1,Tmem120b,Tnnt1,Top2a,Tpx2,Traip,Troap, Tspan6,Tubb2a,Tubb5,Tube1,Tyms,Tyms-ps,Uaca,Ube2c, Uhrf1,Vegfa,Wdr35,Wdr67,Whsc1,Zfp704,Zfp820 Nenhum mRNA induzido em linfócitos ativados (NOD diabético)
miR-669h-5p Induzido em linfócitos näive (NOD pré- diabético/ 1 mês de idade)	45 mRNAs reprimidos em linfócitos näive (NOD pré-diabético/ 1 mês de idade) 1520402A15Rik,4930470G03Rik,4933406B17Rik, 4933407L21Rik,4933438K21Rik,9630023C09Rik, Al256396,Arg2,B3gat1,B930068K11Rik,Cacna1c,Cdh4, Cst9,Cux2,Dennd5b,Drd5,Fcer2a,Fcrl5,Gad1,Gm7247, Gpr12,Klhl14,Klk1b7-ps,Krt8,Odz1,Olfr365,Olfr904, Olfr924,Pard3,Pbx3,Pcdh10,Pcp4,Phactr3,Phxr2,Pla2g2d,Ppl,Prt g,Slc38a11,Slc46a2,Slc6a4,Snord123,Sorbs2,Stfa1,Tmem139,Ys k4 Nenhum mRNA induzido em linfócitos näive (NOD pré-diabético/ 1 mês de idade)

MicroRNA	mRNAs Alvos
miR-712 Induzido em linfócitos	84 mRNAs reprimidos em linfócitos näive (NOD pré-diabético/ 1 mês de idade)
diabético/ 1 mês de idade)	1300015D01Rik,1520402A15Rik,2010107C10Rik, 4930470G03Rik,4931400O07Rik,4933406B17Rik, 4933407L21Rik,4933438K21Rik,9430025M13Rik, 9630023C09Rik,AI256396,Ank3,Arg2,B3gat1,B3gnt7, B930068K11Rik,Cacna1c,Cdh4,Ceacam5,Clec4g,Cst9, Cux2,Cxcr7,Dclk1,Dennd5b,Drd5,Fam48a,Fcer2a,FcrI5, Gad1,Gm5753,Gm7247,Gm839,Gnal,Gpr12,II1f9,KlhI14, Klk1b7-ps,Krt8,Ly6d,Mid1,Mmp8,Morc4,Odz1,Olfm4, Olfr1469,Olfr33,Olfr365,Olfr784,Olfr904,Olfr924,Pard3, Park2,Pbx3,Pcdh10,Pcp4,Pde4dip,Phactr3,Phxr2,Pla2g2d,Pou3f 1,Ppl,Prtg,Psp,Ptpla,Scn3b,Slc22a7,Slc38a11, Slc46a2,Slc6a4,Slfn4,Snord123,Sorbs2,Stfa1,Stfa2I1, Tmem139,Vmn2r26,Vmn2r81,Vsx2,Ysk4,Zdbf2,Zfp397os,Zmynd 12Zscan4c Nenhum mRNA induzido em linfócitos näive (NOD pré-diabético/ 1 mês de idade)
miR-24-2* Induzido em linfócitos	95 mRNAs reprimidos em linfócitos näive (NOD pré-diabético/ 1 mês de idade)
näive (NOD pré- diabético/ 1 mês de idade)	1300015D01Rik,1520402A15Rik,2010107C10Rik, 4930470G03Rik,4931400007Rik,4933406B17Rik, 4933407L21Rik,4933438K21Rik,9430025M13Rik, 9630023C09Rik,AI256396,Ank3,Arg2,B3gat1,B3gnt7, B930068K11Rik,Bank1,Cacna1c,Car12,Cdh4,Ceacam5, Cldn5,Clec4g,Cst9,Cux2,Cxcr7,Dclk1,Dennd5b,Drd5, Fam48a,Fcer2a,Fcrl5,Gad1,Gm5753,Gm7247,Gm839, Gnal,Gpr12,Gstm6,II1f9,Klh114,Klk1b7-ps,Krt8,Ly6d,Mid1, Mmp8,Morc4,Mrgprb2,Nlrp4f,Odz1,Olfm4,Olfr1469,Olfr33,Olfr365 ,Olfr516,Olfr784,Olfr904,Olfr924,Pard3,Park2,Pbx3,Pcdh10,Pcp4, Pde4dip,Phactr3,Phxr2,Pla2g2d,Pou3f1,Ppl,Prtg,Psp,Ptpla,Ptprm, Rab3c,Scn3b,Siah3,Slc22a7, Slc38a11,Slc46a2,Slc6a4,Slfn4,Snord123,Sorbs2,Stfa1, Stfa2l1,Tmem139,Vmn1r228,Vmn2r26,Vmn2r81,Vsx2, Ysk4,Zdbf2,Zfp397os,Zmynd12,Zscan4c Nenhum mRNA induzido em linfócitos näive (NOD pré-diabético/ 1 mês de idade)
mcmv-miR-M23-1-5p	173 mRNAs reprimidos em linfócitos päive (NOD pré-diabético/ 1
Induzido em linfócitos näive (NOD	mês de idade)
pré-diabético/ 1 mês de idade)	1300015D01Rik,1520402A15Rik,2010107C10Rik, 2900079G21Rik,4921539E11Rik,4930412F15Rik, 4930470G03Rik,4930548J01Rik,4930556H04Rik, 4931400O07Rik,4931429I11Rik,4933406B17Rik, 4933407L21Rik,4933424G06Rik,4933438K21Rik,

MicroRNA	mRNAs Alvos
mcmv-miR-M23-1-5p Induzido em linfócitos näive (NOD pré-diabético/ 1 mês de idade)	9430025M13Rik,9630023C09Rik,A130015J22Rik, A630033E08Rik,A830018L16Rik,Ace,Al256396,Ank3, Ap3b2,Arg2,Arpp21,B130065D12Rik,B3gat1,B3gnt7, B930068K11Rik,Bank1,Bmf,C030006F08Rik, C530043A13Rik,Cacna1c,Calcr,Car12,Cbln1,Ccdc89, Cdh4,Ceacam19,Ceacam5,Cldn5,Clec4g,Clgn,Cnpy1,Cst9Cux2, Cxcl12,Cxcr7,D930049A15Rik,Dclk1,Dennd5b,Drd5,Efhd1,Enah, Fam48a,Fcer2a,Fcrl5,Foxp2,Gad1,Gad2, Galntl5,Gm12824,Gm4532,Gm5753,Gm7247,Gm839,GnalGp6,G pr12,Gpr82,Gsdmc11,Gstm6,H2-Ob,Hoxc4,II1f9, Itgb4,Kcnk2,Kif11,Klh14,Klk1b7-ps,Krt34,Krt8,Ly6d,Mid1, Mmp21,Mmp8,Morc4,Mrgprb2,Mybpc2,Mylk,NIrp12,NIrp2,NIrp4f, Nos1ap,Ntm,Odz1,Olfm4,Olfr1090,Olfr1115, Olfr1161,Olfr1281,Olfr1384,Olfr1459,Olfr1469,Olfr304, Olfr33,Olfr365,Olfr516Olfr768,Olfr784,Olfr790,Olfr889, Olfr904,Olfr924,Pard3,Park2,Pbx3,PPcdh10,Pcp4,Pde4dipPdgfa, Phactr3,Phxr2,Pigr,Pitx2,Pkib,Pla2g2d,Pou3f1,Ppl, Prtg,Psp,Ptcra,Pth,Ptpla,Ptprm,Rab3c,Retnla,Rpgrip1, Scara3,Scn3b,Sel113,Sertad4,Sh3bgr,Siah3,Slc22a7, Slc38a11,Slc46a2,Slc6a4,Slfn4,Snord123,Sorbs2,Sox19, Spata16,Stfa1,Stfa2l1,Syt16,Tmc1,Tmem139,Trim66, Tspan2,Usp29,Vmn1r193,Vmn1r228,Vmn2r26,Vmn2r81, Vsx2,Ysk4,Zdbf2,Zfp397os,Zmynd12,Zscan4c
miR-125a-3p Induzido em linfócitos näive (NOD pré- diabético/ 1 mês de idade)	100 mRNAs reprimidos em linfócitos näive (NOD pré-diabético/ 1 mês de idade) 1300015D01Rik,1520402A15Rik,2010107C10Rik, 4930470G03Rik,4931400007Rik,4933406B17Rik, 4933407L21Rik,4933438K21Rik,9430025M13Rik, 9630023C09Rik,Al256396,Ank3,Arg2,B3gat1,B3gnt7, B930068K11Rik,Bank1,Cacna1c,Car12,Cdh4,Ceacam5, Cldn5,Clec4g,Cst9,Cux2,Cxcr7,Dclk1,Dennd5b,Drd5, Fam48a,Fcer2a,Fcrl5,Gad1,Gm12824,Gm5753,Gm7247, Gm839,Gnal,Gpr12,Gstm6,II1f9,Klhl14,Klk1b7-ps,Krt8, Ly6d,Mid1,Mmp8,Morc4,Mrgprb2,Mybpc2,Mylk,Nlrp4f, Odz1,Olfm4,Olfr1469,Olfr304,Olfr33,Olfr365,Olfr516, Olfr784,Olfr889,Olfr904,Olfr924,Pard3,Park2,Pbx3,Pcdh10Pcp4,P de4dip,Phactr3,Phxr2,Pla2g2d,Pou3f1,Ppl,Prtg,PspPtpla,Ptprm,R ab3c,Scn3b,Siah3,Slc22a7,Slc38a11, Slc46a2,Slc6a4,Slfn4,Snord123,Sorbs2,Stfa1,Stfa2l1, Tmem139,Vmn1r228,Vmn2r26,Vmn2r81,Vsx2,Ysk4,Zdbf2,Zfp397 os,Zmynd12,Zscan4c

MicroRNA	mRNAs Alvos
miR-33	11 mRNAs reprimidos em linfócitos näive (NOD pré-diabético/ 1 mês de idade)
Reprimido em linfócitos näive (NOD pré-diabético/ 1 mês de idade)	Anln,Arpp21,Bahcc1,E2f7,II17rb,Kif11,Kif2c,Nt5dc2, Pitpnm2,Psrc1,Rag1
	42 mRNAs induzidos em linfócitos näive (NOD pré-diabético/ 1 mês de idade)
	9530077C05Rik,Aspm,Brip1,Bub1,Bub1b,Casc5,Ccnb1, Ccnb2,Ccne2,Cdc45,Cdca5,Cdk1,Cenpe,Chek1,Ckap2, Ckap2I,Depdc1a,Dntt,Dtl,F630043A04Rik,Fam64a,Gas2I3,Hist1h 2ab,Hist1h2af,Igf2bp3,Igsf3,Kif14,Kif18b,Kif20a,Kif4,Mastl,Ncapg, Ppil5,Rad54b,Sgol2,Shcbp1,Smo,Sox4, Spc25,Top2a,Tpx2,Zfp820
miR-30a	14 mRNAs reprimidos em linfócitos näive (NOD pré-diabético/ 1 mês de idade)
Reprimido em linfócitos näive (NOD pré-diabético/ 1 mês de idade)	2610021K21Rik,AnIn,Arpp21,Bahcc1,E2f7,II17rb,Kif11, Kif18a,Kif2cMex3a,Nt5dc2,Pitpnm2,Psrc1,Rag1
	50 mRNAs induzidos em linfócitos näive (NOD pré-diabético/ 1 mês de idade)
	9530077C05Rik,Aspm,Brip1,Bub1,Bub1b,Casc5,Ccna2, Ccnb1,Ccnb2,Ccne2,Cdc45,Cdca5,Cdk1,Cenpe,Chek1, Ckap2,Ckap2I,Depdc1a,Dntt,DtI,F630043A04Rik,Fam64a,Gas2I3, Gins1,Hist1h2ab,Hist1h2af,Igf2bp3,Igsf3,Kif14, Kif18b,Kif20a,Kif4,MastI,Myb,Ncapg,Neil3,Nek2,Ppil5, Rad54b,Sgol2,Shcbp1,Smo,Sox4,Spc25,Tacc3,Top2a, Tpx2,Tyms,Zfp704,Zfp820
let-7f*	Nenhum mRNA reprimido em timócitos (NOD pré-diabético/ 1 mês de idade)
Induzido em timócitos (NOD pré-diabético/ 1 mês de idade)	1 mRNA induzido em timócitos (NOD pré-diabético/ 1 mês de idade)
miR-181c Induzido em timócitos (NOD pré-diabético/ 1	1 mRNA reprimido em timócitos (NOD pré-diabético/ 1 mês de idade) Gad1
mês de idade)	19 mRNAs induzidos em timócitos (NOD pré-diabético/ 1 mês de idade)
	4933438K21Rik,Anln,Bahcc1,Ccne2,Cdca5,Chek1, Depdc1a,Dtl,E2f7,Fam64a,Igf2bp3,Kif11,Kif14,Kif4,Ncapg,Nt5dc2 ,Rag1,Top2a,Zfp820

MicroRNA	mRNAs Alvos
miR-128 Induzido em timócitos	Nenhum mRNA reprimido em timócitos (NOD pré-diabético/ 1 mês de idade)
(NOD pré-diabético/ 1 mês de idade)	15 mRNAs induzidos em timócitos (NOD pré-diabético/ 1 mês de idade)
	Anln,Bahcc1,Ccne2,Cdca5,Chek1,Dtl,E2f7,Igf2bp3,Kif11, Kif14, Kif4,Ncapg,Nt5dc2,Top2a,Zfp820
miR-301a	Nenhum mRNA reprimido em timócitos (NOD pré-diabético/ 1 mês de idade)
(NOD pré-diabético/ 1 mês de idade)	68 mRNAs induzidos em timócitos (NOD pré-diabético/ 1 mês de idade)
	2610021K21Rik,4933438K21Rik,9530077C05Rik,Anln, Arpp21,Aspm,Bahcc1,Brip1,Bub1,Bub1b,Casc5,Ccna2, Ccnb1,Ccnb2,Ccne2,Cdc45,Cdca2,Cdca5,Cdk1,Cenpe, Chek1,Ckap2,Ckap2l,Depdc1a,Dntt,Dtl,E2f7,Espl1, F630043A04Rik,Fam64a,Gas2l3,Gins1,Hist1h2ab, Hist1h2af,Igf2bp3,Igsf3,II17rb,Kif11,Kif14,Kif18a,Kif18b, Kif20a,Kif2c,Kif4,Mastl,Mex3a,Myb,Ncapg,Ndc80,Neil3, Nek2,Nt5dc2,Pitpnm2,Ppil5,Psrc1,Rad54b,Rag1,Sgol2, Shcbp1,Smo,Sox4,Spc25,Tacc3,Top2a,Tpx2,Tyms,Zfp704Zfp820
miR-494	Nenhum mRNA reprimido em timócitos (NOD pré-diabético/ 1 mês de idade)
Induzido em timócitos (NOD pré-diabético/ 1 mês de idade)	69 mRNAs induzidos em timócitos (NOD pré-diabético/ 1 mês de idade)
	2610021K21Rik,4933438K21Rik,9530077C05Rik,Anln, Arpp21,Aspm,Bahcc1,Brip1,Bub1,Bub1b,Casc5,Ccna2, Ccnb1,Ccnb2,Ccne2,Cdc45,Cdca2,Cdca5,Cdk1,Cenpe, Chek1,Ckap2,Ckap2l,Depdc1a,Dntt,Dtl,E2f7,Esco2,Espl1,F63004 3A04Rik,Fam64a,Gas2l3,Gins1,Hist1h2ab, Hist1h2af,Igf2bp3,Igsf3,II17rb,Kif11,Kif14,Kif18a,Kif18b, Kif20a,Kif2c,Kif4,MastI,Mex3a,Myb,Ncapg,Ndc80,Neil3, Nek2,Nt5dc2,Pitpnm2,Ppil5,Psrc1,Rad54b,Rag1,Sgol2, Shcbp1,Smo,Sox4,Spc25,Tacc3,Top2a,Tpx2,Tyms, Zfp704,Zfp820
miR-200b Induzido em timócitos (NOD pré-	Nenhum mRNA reprimido em timócitos (NOD pré-diabético/ 1 mês de idade)
diabético/ 1 mês de idade)	1 mRNA induzido em timócitos (NOD pré-diabético/ 1 mês de idade)
	Nt5dc2

MicroRNA	mRNAs Alvos
miR-363 Induzido em timócitos (NOD pré-diabético/ 1	Nenhum mRNA reprimido em timócitos (NOD pré-diabético/ 1 mês de idade)
mês de idade)	37 mRNAs induzidos em timócitos (NOD pré-diabético/ 1 mês de idade)
	Anln,Arpp21,Aspm,Bahcc1,Brip1,Bub1,Ccnb1,Ccne2, Cdc45,Cdca5,Chek1,Ckap2,Depdc1a,Dntt,Dtl,E2f7, Fam64a,Gas2l3,Hist1h2ab,Igf2bp3,Igsf3,II17rb,Kif11,Kif14,Kif2c,K if4,Mastl,Ncapg,Nt5dc2,Pitpnm2,Rag1,Sgol2, Shcbp1,Smo,Top2a,Tpx2,Zfp820
miR-18a Induzido em timócitos (NOD pré-diabético/ 1	Nenhum mRNA reprimido em timócitos (NOD pré-diabético/ 1 mês de idade)
mes de laade)	35 mRNAs induzidos em timócitos (NOD pré-diabético/ 1 mês de idade)
	Anln,Arpp21,Aspm,Bahcc1,Brip1,Bub1,Ccne2,Cdc45, Cdca5,Chek1Ckap2,Depdc1a,Dntt,Dtl,E2f7,Fam64a, Gas2l3,Hist1h2ab,Igf2bp3,Igsf3,II17rb,Kif11,Kif14,Kif2c, Kif4,MastI,Ncapg,Nt5dc2,Pitpnm2,Rag1,Shcbp1,Smo, Top2a,Tpx2,Zfp820
miR-101b Induzido em timócitos	Nenhum mRNA reprimido em timócitos (NOD pré-diabético/ 1 mês de idade)
(NOD pré-diabético/ 1 mês de idade)	57 mRNAs induzidos em timócitos (NOD pré-diabético/ 1 mês de idade)
	9530077C05Rik,Anln,Arpp21,Aspm,Bahcc1,Brip1,Bub1, Bub1b,Casc5,Ccnb1,Ccnb2,Ccne2,Cdc45,Cdca5,Cdk1, Cenpe,Chek1,Ckap2,Ckap2l,Depdc1a,Dntt,Dtl,E2f7, F630043A04Rik,Fam64a,Gas2l3,Hist1h2ab,Hist1h2af, Igf2bp3,Igsf3,II17rb,Kif11,Kif14,Kif18a,Kif18b,Kif20a,Kif2c,Kif4,Ma stl,Mex3a,Myb,Ncapg,Nt5dc2,Pitpnm2,Ppil5,Psrc1,Rad54b,Rag1, Sgol2,Shcbp1,Smo,Sox4,Spc25,Top2a, Tpx2,Zfp704,Zfp820
miR-18a* Induzido em timócitos	Nenhum mRNA reprimido em timócitos (NOD pré-diabético/ 1 mês de idade)
(NOD pré-diabético/ 1 mês de idade)	57 mRNAs induzidos em timócitos (NOD pré-diabético/ 1 mês de idade)

MicroRNA	mRNAs Alvos
miR-18a* Induzido em timócitos (NOD pré-diabético/ 1 mês de idade)	4933438K21Rik,9530077C05Rik,AnIn,Arpp21,Aspm, Bahcc1,Brip1,Bub1,Casc5,Ccnb1,Ccnb2,Ccne2,Cdc45, Cdca5,Cdk1,Cenpe,Chek1,Ckap2,Ckap2I,Depdc1a,Dntt, DtI,E2f7,F630043A04Rik,Fam64a,Gas2I3,Hist1h2ab, Hist1h2af,Igf2bp3,Igsf3,II17rb,Kif11,Kif14,Kif18a,Kif18b, Kif20a,Kif2c,Kif4,MastI,Mex3a,Myb,Ncapg,Nt5dc2,Pitpnm2Ppil5,P src1,Rad54b,Rag1,Sgol2,Shcbp1,Smo,Sox4,Spc25Top2a,Tpx2,Z fp704,Zfp820
miR-139-5p Reprimido em timócitos (NOD pré- diabético/ 1 mês de idade)	Nenhum mRNA reprimido em timócitos (NOD pré-diabético/ 1 mês de idade) 68 mRNAs induzidos em timócitos (NOD pré-diabético/ 1 mês de idade)
	2610021K21Rik,9530077C05Rik,AnIn,Arpp21,Aspm, Bahcc1,Brip1,Bub1,Bub1b,Casc5,Ccna2,Ccnb1,Ccnb2, Ccne2,Cdc45,Cdca2,Cdca5,Cdk1,Cenpe,Chek1,Ckap2, Ckap2I,Depdc1a,Dntt,DtI,E2f7,Espl1,F630043A04Rik, Fam64a,Gas2I3,Gins1,Hist1h2ab,Hist1h2af,Igf2bp3,Igsf3, II17rb,Kif11,Kif14,Kif18a,Kif18b,Kif20a,Kif2c,Kif4,MastI, Mex3a,Myb,Ncapg,Ndc80,Neil3,Nek2,Nt5dc2,Pitpnm2, Ppil5,Psrc1,Rad54b,Rag1,Sgol2,Shcbp1,Smo,Sox4, Spc25,Tacc3,Top2a,Tpx2,Tyms,Tyms-ps,Zfp704,Zfp820
miR-223 Reprimido em timócitos (NOD pré- diabético/ 1 mês de idade)	Nenhum mRNA reprimido em timócitos (NOD pré-diabético/ 1 mês de idade)
	33 mRNAs induzidos em timócitos (NOD pré-diabético/ 1 mês de idade)
	Anln,Arpp21,Aspm,Bahcc1,Brip1,Bub1,Ccnb1,Ccne2, Cdc45,Cdca5,Chek1,Ckap2,Depdc1a,Dntt,Dtl,E2f7, Fam64a,Hist1h2ab,Igf2bp3,Igsf3,II17rb,Kif11,Kif14,Kif4, Ncapg,Nt5dc2,Pitpnm2,Rag1,Shcbp1,Smo,Sox4,Top2a, Zfp820
miR-29a* Reprimido em timócitos (NOD pré- diabético/ 1 mês de idade)	Nenhum mRNA reprimido em timócitos (NOD pré-diabético/ 1 mês de idade)
	46 mRNAs induzidos em timócitos (NOD pré-diabético/ 1 mês de idade)
	9530077C05Rik,Anln,Arpp21,Aspm,Bahcc1,Brip1,Bub1, Casc5,Ccnb1,Ccne2,Cdc45,Cdca5,Cdk1,Chek1,Ckap2, Depdc1a,Dntt,Dtl,E2f7,Fam64a,Gas2l3,Hist1h2ab,Igf2bp3,Igsf3,II 17rb,Kif11,Kif14,Kif18b,Kif20a,Kif2c,Kif4,Mastl, Ncapg,Nt5dc2,Pitpnm2,Ppil5,Rad54b,Rag1,Sgol2,Shcbp1,Smo,S ox4,Spc25,Top2a,Tpx2,Zfp820

MicroRNA	mRNAs Alvos
miR-101a Reprimido em timócitos (NOD pré- diabético/ 1 mês de idade)	Nenhum mRNA reprimido em timócitos (NOD pré-diabético/ 1 mês de idade)
	86 mRNAs induzidos em timócitos (NOD pré-diabético/ 1 mês de idade)
	2610021K21Rik,4933438K21Rik,5730528L13Rik, 9530077C05Rik,Anln,Armcx1,Arpp21,Aspm,Aurka,Bahcc1,Birc5, Brip1,Bub1,Bub1b,Casc5,Ccna2,Ccnb1,Ccnb2, Ccne2,Cdc45,Cdca2,Cdca5,Cdk1,Cenpe,Cenpf,Chek1, Ckap2,Ckap2I,Depdc1a,Dntt,DtI,E2f7,Emilin1,Esco2,Espl1,F6300 43A04Rik,Fam64a,Gas2I3,Gins1,Hist1h2ab, Hist1h2af,Hist1h2ai,Hist1h2ak,Hist1h2ao,Hist2h2ac, Igf2bp3,Igsf3,II17rb,Kif11,Kif14,Kif18a,Kif18b,Kif20a,Kif2c,Kif4,Ma stl,Mex3a,Myb,Ncapg,Ndc80,Neil3,Nek2,Nt5dc2, Pbk,Pitpnm2,Ppil5,Psrc1,Rad51ap1,Rad54b,Rag1,Rrm2, Sgol1,Sgol2,Shcbp1,Smo,Sox4,Spc25,Stmn1,Tacc3, Top2a,Tpx2,Tyms,Tyms-ps,Vegfa,Zfp704,Zfp820
miR-29b* Reprimido em timócitos (NOD pré- diabético/ 1 mês de idade)	Nenhum mRNA reprimido em timócitos (NOD pré-diabético/ 1 mês de idade)
	33 mRNAs induzidos em timócitos (NOD pré-diabético/ 1 mês de idade)
	Anln,Arpp21,Aspm,Bahcc1,Brip1,Bub1,Ccnb1,Ccne2, Cdc45,Cdca5,Chek1,Ckap2,Depdc1a,Dntt,Dtl,E2f7, Fam64a,Hist1h2ab,Igf2bp3,Igsf3,II17rb,Kif11,Kif14,Kif4, Ncapg,Nt5dc2,Pitpnm2,Rag1,Shcbp1,Smo,Sox4,Top2a, Zfp820
miR-146a Reprimido em timócitos (NOD pré- diabético/ 1 mês de idade)	Nenhum mRNA reprimido em timócitos (NOD pré-diabético/ 1 mês de idade)
	37 mRNAs induzidos em timócitos (NOD pré-diabético/ 1 mês de idade)
	Anln,Arpp21,Aspm,Bahcc1,Brip1,Bub1,Ccnb1,Ccne2, Cdc45,Cdca5,Chek1,Ckap2,Depdc1a,Dntt,Dtl,E2f7, Fam64a,Gas2l3,Hist1h2ab,Igf2bp3,Igsf3,II17rb,Kif11,Kif14,Kif2c,K if4,Mastl,Ncapg,Nt5dc2,Pitpnm2,Rag1,Shcbp1, Smo,Sox4,Top2a,Tpx2,Zfp820

MicroRNA	mRNAs Alvos
miR-150 Reprimido em timócitos (NOD pré- diabético/ 1 mês de idade)	Nenhum mRNA reprimido em timócitos (NOD pré-diabético/ 1 mês de idade)
	35 mRNAs induzidos em timócitos (NOD pré-diabético/ 1 mês de idade)
	Anln,Arpp21,Aspm,Bahcc1,Brip1,Bub1,Ccnb1,Ccne2, Cdc45,Cdca5,Chek1,Ckap2,Depdc1a,Dntt,Dtl,E2f7, Fam64a,Hist1h2ab,Igf2bp3,Igsf3,II17rb,Kif11,Kif14,Kif2c, Kif4,MastI,Ncapg,Nt5dc2,Pitpnm2,Rag1,Shcbp1,Smo, Top2a,Tpx2,Zfp820
miR-342-3p Reprimido em timócitos (NOD pré- diabético/ 1 mês de idade)	Nenhum mRNA reprimido em timócitos (NOD pré-diabético/ 1 mês de idade)
	22 mRNAs induzidos em timócitos (NOD pré-diabético/ 1 mês de idade)
	Anln,Arpp21,Aspm,Bahcc1,Ccne2,Cdca5,Chek1,Depdc1a,Dntt,Dt I,E2f7,Fam64a,Igf2bp3,Kif11,Kif14,Kif4,Ncapg, Nt5dc2,Rag1,Smo,Top2a,Zfp820
miR-30b* Reprimido em timócitos (NOD pré- diabético/ 1 mês de idade)	Nenhum mRNA reprimido em timócitos (NOD pré-diabético/ 1 mês de idade)
	59 mRNAs induzidos em timócitos (NOD pré-diabético/ 1 mês de idade)
	9530077C05Rik,Anln,Arpp21,Aspm,Bahcc1,Brip1,Bub1, Bub1b,Casc5,Ccnb1,Ccnb2,Ccne2,Cdc45,Cdca5,Cdk1, Cenpe,Chek1,Ckap2,Ckap2l,Depdc1a,Dntt,Dtl,E2f7, F630043A04Rik,Fam64a,Gas2l3,Hist1h2ab,Hist1h2af, Igf2bp3,Igsf3,II17rb,Kif11,Kif14,Kif18a,Kif18b,Kif20a,Kif2c,Kif4,Ma stl,Mex3a,Myb,Ncapg,Neil3,Nt5dc2,Pitpnm2,Ppil5,Psrc1,Rad54b, Rag1,Sgol2,Shcbp1,Smo,Sox4,Spc25, Top2a,Tpx2,Tyms,Zfp704,Zfp820

Seguindo o conceito do mecanismo de ação de um microRNA no qual ele é capaz de controlar negativamente um determinado mRNA alvo inibindo sua tradução em proteína ou até mesmo sua propiciando sua degradação, procurouse analisar cada um dos casos em que os microRNAs selecionados (tabela III), estivessem com perfil de indução em determinada amostra e consequentemente, seus mRNAs alvos estivessem com um perfil de repressão. O mesmo foi considerado para os microRNAs reprimidos e mRNAs alvos induzidos. Isto seria indicativo de que estando o microRNA pouco expresso, sua probabilidade de interação com seu mRNA alvo seria menor e esse último apresentaria um perfil de indução.

Todos os microRNAs estudados nesse trabalho, demonstraram esse perfil de expressão antagônico (microRNA induzido e mRNA alvo reprimido, e viceversa) comparando timócitos e linfócitos T CD3⁺ periféricos.

Sendo assim, surgiu o interesse em classificar tais mRNAs alvos que estariam sob o controle de determinados microRNAs de acordo com os processos biológicos ao qual estão associados.

Como o *software GeneSpring* não permite a análise de *Gene Ontology* de microRNAs, os mRNAs alvos dos microRNAs aqui estudados foram identificados de acordo com os processos biológicos por análise comparativa entre os dados encontrados para a GO dos mRNAs diferencialmente expressos e os resultados das redes de interações microRNAs-mRNAs.

Procurou-se analisar, principalmente, os processos biológicos relacionados ao sistema imune, a diferenciação e ativação celular e de linfócitos T e a apoptose, bem como a outros processos relacionados a resposta imune. Com exceção dos microRNAs let-7f* e miR-200b, todos os demais microRNAs apresentaram mRNAs alvos para os processos associados ao presente estudo. Os resultados dessa classificação podem ser conferidos observando as figuras 29 a 53.



Figura 29. Processos biológicos associados a interação do miR-7a* que fora induzido em linfócitos ativados (isolados de camundongos NOD diabéticos) com seus respectivos mRNAs alvos que se apresentaram reprimidos.



Figura 30. Processos biológicos associados a interação do miR-669-5p que fora induzido em linfócitos näives (isolados de camundongos NOD pré-diabéticos com 1 mês de idade) com seus respectivos mRNAs alvos que se apresentaram reprimidos.



Figura 31. Processos biológicos associados a interação do miR-712 que fora induzido em linfócitos näives (isolados de camundongos NOD pré-diabéticos com 1 mês de idade) com seus respectivos mRNAs alvos que se apresentaram reprimidos.



Figura 32. Processos biológicos associados a interação do miR-24-2* que fora induzido em linfócitos näives (isolados de camundongos NOD pré-diabéticos com 1 mês de idade) com seus respectivos mRNAs alvos que se apresentaram reprimidos.



Figura 33. Processos biológicos associados a interação do mcmv-miR-M23-1-5p que fora induzido em linfócitos näives (isolados de camundongos NOD pré-diabéticos com 1 mês de idade) com seus respectivos mRNAs alvos que se apresentaram reprimidos.



Figura 34. Processos biológicos associados a interação do miR-125a-3p que fora induzido em linfócitos näives (isolados de camundongos NOD pré-diabéticos com 1 mês de idade) com seus respectivos mRNAs alvos que se apresentaram reprimidos.



Figura 35. Processos biológicos associados a interação do miR-33 que fora reprimido em linfócitos näives (isolados de camundongos NOD pré-diabéticos com 1 mês de idade) com seus respectivos mRNAs alvos que se apresentaram induzidos.



Figura 36. Processos biológicos associados a interação do miR-30a que fora reprimido em linfócitos näives (isolados de camundongos NOD pré-diabéticos com 1 mês de idade) com seus respectivos mRNAs alvos que se apresentaram induzidos.



Figura 37. Processos biológicos associados a interação do miR-181c que fora induzido em timócitos (isolados de camundongos NOD pré-diabéticos com 1 mês de idade) com seus respectivos mRNAs alvos que se apresentaram reprimidos.



Figura 38. Processos biológicos associados a interação do miR-128 que fora induzido em timócitos (isolados de camundongos NOD pré-diabéticos com 1 mês de idade) com seus respectivos mRNAs alvos que se apresentaram reprimidos.



Figura 39. Processos biológicos associados a interação do miR-301a que fora induzido em timócitos (isolados de camundongos NOD pré-diabéticos com 1 mês de idade) com seus respectivos mRNAs alvos que se apresentaram reprimidos.



Figura 40. Processos biológicos associados a interação do miR-494 que fora induzido em timócitos (isolados de camundongos NOD pré-diabéticos com 1 mês de idade) com seus respectivos mRNAs alvos que se apresentaram reprimidos.



Figura 41. Processos biológicos associados a interação do miR-363 que fora induzido em timócitos (isolados de camundongos NOD pré-diabéticos com 1 mês de idade) com seus respectivos mRNAs alvos que se apresentaram reprimidos.



Figura 42. Processos biológicos associados a interação do miR-18a que fora induzido em timócitos (isolados de camundongos NOD pré-diabéticos com 1 mês de idade) com seus respectivos mRNAs alvos que se apresentaram reprimidos.



Figura 43. Processos biológicos associados a interação do miR-101b que fora induzido em timócitos (isolados de camundongos NOD pré-diabéticos com 1 mês de idade) com seus respectivos mRNAs alvos que se apresentaram reprimidos.



Figura 44. Processos biológicos associados a interação do miR-18a* que fora induzido em timócitos (isolados de camundongos NOD pré-diabéticos com 1 mês de idade) com seus respectivos mRNAs alvos que se apresentaram reprimidos.


Figura 45. Processos biológicos associados a interação do miR-139-5p que fora reprimido em timócitos (isolados de camundongos NOD pré-diabéticos com 1 mês de idade) com seus respectivos mRNAs alvos que se apresentaram induzidos.



Figura 46. Processos biológicos associados a interação do miR-223 que fora reprimido em timócitos (isolados de camundongos NOD pré-diabéticos com 1 mês de idade) com seus respectivos mRNAs alvos que se apresentaram induzidos.



Figura 47. Processos biológicos associados a interação do miR-29a* que fora reprimido em timócitos (isolados de camundongos NOD pré-diabéticos com 1 mês de idade) com seus respectivos mRNAs alvos que se apresentaram induzidos.



Figura 48. Processos biológicos associados a interação do miR-101a que fora reprimido em timócitos (isolados de camundongos NOD pré-diabético com 1 mês de idade) com seus respectivos mRNAs alvos que se apresentaram induzidos.



Figura 49. Processos biológicos associados a interação do miR-29b* que fora reprimido em timócitos (isolados de camundongos NOD pré-diabético com 1 mês de idade) com seus respectivos mRNAs alvos que se apresentaram induzidos.



Figura 50. Processos biológicos associados a interação do miR-146a que fora reprimido em timócitos (NOD pré-diabético com 1 mês de idade) com seus respectivos mRNAs alvos que se apresentaram induzidos.



Figura 51. Processos biológicos associados a interação do miR-150 que fora reprimido em timócitos (isolados de camundongos NOD pré-diabético com 1 mês de idade) com seus respectivos mRNAs alvos que se apresentaram induzidos.



Figura 52. Processos biológicos associados a interação do miR-342-3p que fora reprimido em timócitos (isolados de camundongos NOD pré-diabéticos com 1 mês de idade) com seus respectivos mRNAs alvos que se apresentaram induzidos.



Figura 53. Processos biológicos associados a interação do miR-30b que fora reprimido em timócitos (isolados de camundongos NOD pré-diabético com 1 mês de idade) com seus respectivos mRNAs alvos que se apresentaram induzidos.

Para reforçar os dados obtidos nas redes de interações microRNAsmRNAs, fizemos uso dos bancos de dados mirBase (http://www.mirbase.org/) e microRNA.org (http://www.microrna.org) para descrever interações encontradas no estudo e já conhecidas, e apresentar interações ainda não descritas. A tabela V traz o resultado dessas interações de 18 mRNAs alvos que apareceram com mais frequência nos processos biológicos avaliados anteriormente (Figuras 29 a 53) e que serão abordados na discussão. Para as interações conhecidas apresentamos um valor para a energia de ligação (mirSVR score) de acordo com o banco de dados microRNA.org. **Tabela V.** Principais mRNAs alvos envolvidos nos processos biológicos relacionados ao sistema imune e suas interações com os microRNAs.

mRNA alvo	Interações microRNAs- mRNAs encontradas mas já conhecidas		Interações microRNAs-mRNAs descritas neste trabalho
	microRNA	mirSVR score	
Rag1	miR-33 miR-150	- 0,1971 - 0,7296	miR-7a*, miR-18a, miR-18a*, miR-29a*, miR-29b*, miR-30a, miR-30b*, miR-101a, miR-101b, miR-139-5p, miR-146a, miR-181c, miR-223, miR-301a, miR-342-3p, miR-363, miR-494
Sox4			miR-7a*, miR-18a*, miR-29a*, miR-29b*, miR-30a, miR-30b*, miR-33, miR-101a, miR-101b, miR-139-5p, miR-146a, miR-223, miR-301a, miR-494
Smo	miR-18a	- 0,7695	miR-7a*, miR-18a*, miR-29a*, miR-29b*, miR-30a, miR-30b*, miR-33, miR-101a, miR-101b, miR-139-5p, miR-146a, miR-150, miR-223, miR-301a, miR-342-3p, miR-363, miR-494
Ckap2			miR-7a*, miR-18a, miR-18a*, miR-29a*, miR-29b*, miR-30a, miR-30b*, miR-33, miR-101a, miR-101b, miR-139-5p, miR-146a, miR-150, miR-223, miR-301a, miR-363, miR-494
Bub1			miR-7a*, miR-18a, miR-18a*, miR-29a*, miR-29b*, miR-30a, miR-30b*, miR-33, miR-101a, miR-101b, miR-139-5p, miR-146a, miR-150, miR-223, miR-301a, miR-363, miR-494
Ccnb1	miR-30a	- 0,2419	miR-7a*, miR-18a*, miR-29a*, miR-29b*, miR-30b*, miR-33, miR-101a, miR-101b, miR-139-5p, miR-146a, miR-150, miR-223, miR-301a, miR-363, miR-494
Tpx2	miR-18a	- 0,2136	miR-7a*, miR-18a*, miR-29a*, miR-30a, miR-30b*, miR-33, miR-101a, miR-101b, miR-139-5p, miR-146a, miR-150, miR-301a, miR-363, miR-494

mRNA alvo	Interações microRNAs- mRNAs encontradas mas já conhecidas		Interações microRNAs-mRNAs descritas neste trabalho
	microRNA	mirSVR score	
E2f7	miR-181c miR-301a	- 0,6625 - 0,1122	miR-7a*, miR-18a, miR-18a*, miR-29a*, miR-29b*, miR-30a, miR-30b*, miR-33, miR-101a, miR-101b, miR-128, miR-139-5p, miR-146a, miR-150, miR-223, miR-342-3p, miR-363, miR-494
Ly6d			miR-24-2*, miR-125a-3p, miR-712, mcmv-miR-M23-1-5p
Cdk1	miR-30a	- 0,1668	miR-7a*, miR-18a*, miR-29a*, miR-30b*, miR-33, miR-101a, miR-101b, miR-139-5p, miR-301a, miR-494
Aspm			miR-7a*, miR-18a, miR-18a*, miR-29a*, miR-29b*, miR-30a, miR-30b*, miR-33, miR-101a, miR-101b, miR-139-5p, miR-146a, miR-150, miR-223, miR-301a, miR-342-3p, miR-363, miR-494
Bub1b			miR-7a*, miR-30a, miR-30b*, miR-33, miR-101a, miR-101b, miR-139-5p, miR-301a, miR-494
Krt8			miR-24-2*, miR-125a-3p, miR-669h-5p, miR-712, mcmv-miR-M23-1-5p
Chek1	miR-18a miR-101a miR-101b miR-128 miR-146a miR-223	- 0,3024 - 0,1306 - 0,1321 - 0,2889 - 0,5732 - 0,2700	miR-7a*, miR-18a*, miR-29a*, miR-29b*, miR-30a, miR-30b*, miR-33, miR-139-5p, miR-150, miR-181c, miR-301a, miR-342-3p, miR-363, miR-494
Ccnb2		1	miR-7a*, miR-18a*, miR-30a, miR-30b*, miR-33, miR-101a, miR-101b, miR-139-5p, miR-301a, miR-494

mRNA alvo	Interações microRNAs- mRNAs encontradas mas já conhecidas		Interações microRNAs-mRNAs descritas neste trabalho
	microRNA	mirSVR score	
Fcer2a			miR-24-2*, miR-125a-3p, miR-669h-5p, miR-712, mcmv-miR-M23-1-5p
Tacc3			miR-7a*, miR-30a, miR-101a, miR-139-5p, miR-301a, miR-494
Top2a	miR-33	- 1,3499	miR-7a*, miR-18a, miR-18a*, miR-29a*, miR-29b*, miR-30a, miR-30b*, miR-101a, miR-101b, miR-128, miR-139-5p, miR-146a, miR-150, miR-181c, miR-223, miR-301a, miR-342-3p, miR-363, miR-494

6.8 Análise da expressão gênica por PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

Os dados de *microarrays* foram confirmados por qPCR de cinco mRNAs que se apresentaram diferencialmente expressos entre timócitos e linfócitos CD3⁺ periféricos que são: Fasl, Tlr3, Tlr4, Foxp3 e Themis. Tais mRNAs estão associados a indução de apoptose por sinais extracelulares (Fasl), estão envolvidos na resposta inflamatória (Tlr3 e Tlr4), na diferenciação celular de células T regulatórias (Tregs) e na regulação positiva da indução de tolerância das células T (Foxp3) e na diferenciação de células T em CD4 e CD8 (Themis).

O tipo de modulação (induzido ou reprimido) obtidos por qPCR foram comparáveis aos dados encontrados com a técnica de *microarrays*. Os resultados mostrados na figura 54 indicam que os genes Fasl, Tlr3 e Tlr4 estão reprimidos nos timócitos de animais pré-diabéticos. Já o gene Foxp3 está induzido nos linfócitos de animais diabéticos (linfócitos ativados) enquanto que o gene Themis está induzido em timócitos de animais pré-diabéticos.



Figura 54. Confirmação dos dados de *microarrays* por PCR quantitativa em tempo real para mRNAs diferencialmente expressos entre timócitos e linfócitos CD3⁺ periféricos.



7. DISCUSSÃO

7.1 Avaliação da insulite em camundongos NOD

O diabetes tipo 1 (DM-1) é uma doença autoimune de origem multigênica com alterações metabólicas sistêmicas causadas pelo acúmulo de glicose no sangue. É decorrente do comprometimento da produção de insulina resultante da destruição das células β pancreáticas causada por efetores pró-inflamatórios e pró-apoptóticos da imunidade inata e da adaptativa (MOORE *et al.*, 2010a). Esse é um processo progressivo que pode durar em torno de 20 semanas em camundongos NOD e muitos anos em humanos (REGNAULT *et al.*, 2009).

Durante a fase inicial em que as células β pancreáticas são destruídas ocorrem lesões conhecidas como insulite envolvendo células dendríticas, macrófagos, células T CD4⁺ e CD8⁺ e células B, seguida pela fase diabética propriamente dita, com a progressiva e seletiva destruição das células β . Dentre as agressões autoimunes nas células β , os linfócitos CD4⁺ autorreativos representam um importante fator (CÔRTE-REAL *et al.*, 2009; LEHUEN *et al.*, 2010).

Como em humanos, o progresso da doença em camundongos NOD é definido em pelo menos dois estágios. No primeiro deles, a infiltração das ilhotas do pâncreas pelas células T autorreativas começa entre 4 e 8 semanas de idade e torna-se progressivamente mais extensa. No segundo estágio, tipicamente entre 12 a 20 semanas de idade, eventos desconhecidos provocam insulite que progride para a destruição das células βpancreáticas (Figura 6) (KODAMA *et al.*, 2008).

Visando acompanhar o avanço da infiltração dos linfócitos T junto às células β do pâncreas e a consequente destruição dessas pela insulite, realizouse nesse trabalho uma análise histológica para a observação do processo ao longo do tempo e concomitante aparecimento do diabetes em camundongos NOD.

Para o estudo, foram removidos pâncreas de camundongos NOD prédiabéticos a partir de 1 mês de idade e em outras 7 idades subsequentes, inclusive de animais diabéticos. Observou-se que os camundongos com 1 mês de idade apresentaram pouco infiltrado inflamatório em torno das células β as quais estavam envolvidas por ácinos exócrinos mistos normais (ilhotas de Langerhans) (Figura 16A).

Tal fato nos fez considerar que os linfócitos T periféricos dos camundongos NOD com 1 mês de idade fossem ainda considerados como *naive*, uma vez que encontram-se na fase de recrutamento e/ou ainda no início da ativação.

Aos três meses de idade, verificou-se aumento da presença de linfócitos nos limites externos das ilhotas de Langerhans (Figura 16B), passando-se para invasão mais intensa nos meses subsequentes, principalmente aos 4,5, aos 6 e aos 8 meses (Figuras 16C-G). Os camundongos com diabetes comprovada apresentaram ausência de ilhotas de Langerhans no pâncreas (Figura 16H).

Por tudo isso, nossos resultados quanto a avaliação da insulite em camundongos NOD corroboram com o estudo de KODAMA e colaboradores (2008), que demonstraram ao longo de 20 semanas todo o infiltrado linfocitário durante a insulite ao longo do desenvolvimento do diabetes tipo 1.

7.2 Emergência de diabetes mellitus (DM-1) em camundongos NOD

A incidência do diabetes espontâneo em NOD é de 60% a 80% em fêmeas e de 20% a 30% em machos. A incidência da doença aumenta quando os camundongos são mantidos em ambiente livre de patógenos e decresce dramaticamente em condições normais (não estéreis) de manutenção (SINGH & RABINOVITCH, 1993; BOWMAN *et al.*, 1994). O início do diabetes 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 após 4 semanas de idade quando os animais começam a demonstrar a peri-insulite (ANDERSON & BLUESTONE, 2005; KODAMA *et al.*, 2008).

Durante o andamento deste trabalho adequou-se a manutenção dos camundongos NOD em condições SPF (*specific patogen free*) em nosso próprio laboratório, utilizando mini-isoladores estéreis, o que possibilitou o desenvolvimento do diabetes tipo 1 (DM-1) entre os camundongos provenientes do biotério da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB UNICAMP).

Foram adquiridos camundongos fêmeas NOD com 1 mês de idade (prédiabéticos), dentre os quais algumas foram imediatamente utilizadas para a obtenção de timócitos e linfócitos T CD3⁺ periféricos, enquanto que as demais fêmeas foram monitoradas a partir dos 4 meses em relação a glicemia para a obtenção de animais diabéticos. Ao longo de 8 meses, 21 animais se tornaram diabéticos (Figura 17) e foram utilizados para a obtenção de linfócitos T CD3⁺ periféricos.

Nossos resultados, assim como os da literatura, confirmam a grande incidência do diabetes tipo 1 em fêmeas de camundongos NOD quando mantidas em condições SPF. Ao longo de 8 meses, todas as fêmeas que foram acompanhadas e monitoradas acabaram por desenvolver a doença.

7.3 Avaliação das populações celulares por citometria de fluxo

Procurando avaliar o grau de pureza das células por separação de timócitos através de membrana de *nylon* e isolamento dos linfócitos T CD3⁺ periféricos provenientes do baço por meio de esferas magnéticas, foram realizados ensaios com o uso de anticorpos anti-CD3 marcados com ficoeritrina através da citometria de fluxo.

A análise das populações de células T oriundas do timo e do baço de camundongos NOD por citometria de fluxo, mostra a eficiência dos métodos utilizados na obtenção de populações puras. Para os timócitos a pureza detectada foi de 93% de células (Figura 18A) enquanto que para os linfócitos T CD3⁺ foi de aproximadamente 87% (Figura 18B).

Em relação a população de linfócitos T $CD3^+$ obtida por isolamento com esferas magnéticas e provenientes de baço de camundongos NOD pré-diabéticos e diabéticos, procurou-se ainda caracterizá-los em linfócitos T CD4 ou CD8. Tal interesse se deve, principalmente, ao fato de que vários mecanismos podem contribuir para a destruição das células β do pâncreas incluindo reações mediadas por linfócitos T CD4⁺ autorreativos.

Em camundongos NOD, o gene Prss16, que corresponde a um importante elemento que atua na seleção positiva, codifica uma serino-protease específica do timo (Tssp) que regula o desenvolvimento do DM-1 por meio da seleção do repertório de células T CD4⁺ autorreativos (VIRET *et al.*, 2011).

O gene Prss16, em particular, despertou nosso interesse em um estudo paralelo com camundongos C57BL/6 Prss16-*knockout* (KO) no qual, utilizamos o perfil de expressão do gene Prss16 (reprimido em KO) para identificar genes adicionais com o mesmo perfil de expressão e que fossem também codificadores

de peptidases. Nossos resultados sugeriram novos genes candidatos envolvidos na geração de autopeptídeos no timo o que é importante para o processo de seleção positiva (FORNARI *et al.*, 2011a).

A importância das células T na patogênese do diabetes está bem estabelecida. Estudos utilizando anticorpos contra CD3 indicaram que o diabetes tipo 1 em camundongos NOD é uma doença mediada por células T (HAYWARD & SHREIBER, 1989).

Em camundongos NOD, tanto os linfócitos CD4 quanto os CD8 desempenham um papel no desenvolvimento da doença. De fato, o diabetes não ocorre na ausência de células CD4 (SHIZURU *et al.*, 1988; WONG *et al.*, 1998) e nem em camundongos que são deficiente em células CD8 ou em β -2 microglobulina (KATZ *et al.*, 1993; SERREZE *et al.*, 1994; SUMIDA *et al.*, 1994; WICKER *et al.*, 1994; WANG *et al.*, 1996). Um estudo recente mostrou que o desenvolvimento de células de memória T CD8⁺ autorregulatórias é dependente de células T CD4⁺ (SHAMELI *et al.*, 2011).

Estudos recentes tem revelado o envolvimento da interleucina 2 (IL2) como um regulador importante da sobrevivência e da função supressora de nTreg. Defeitos quanto ao número e a função de células T CD4⁺ imunorregulatórias (nTregs) desempenham um papel fundamental na quebra de tolerância imunológica em camundongos NOD e em humanos com susceptibilidade genética para o DM-1 (CHENTOUFI *et al.*, 2011).

A avaliação das populações de linfócitos T CD3⁺ periféricos evidenciou, nos nossos resultados, a predominância de linfócitos CD4 tanto em camundongos NOD pré-diabéticos quanto nos animais diabéticos (Figura 19) sugerindo que o desbalanço entre o número de células T CD4 e CD8 estaria associado a quebra de tolerância e consequentemente ao desenvolvimento da DM-1 nesses animais.

7.4 Análise dos mRNAs diferencialmente expressos

Um grande progresso tem ocorrido nos últimos anos envolvendo a técnica *microarrays* para a análise de expressão gênica em grande escala.

A tecnologia dos *microarrays* mostrou ser uma ferramenta poderosa e muito difundida nos estudos de expressão gênica com aplicações no estudo de vários organismos tanto em situações normais como patológicas (WHITNEY & BECKER, 2001). Além disso, tal tecnologia permite a análise da expressão de centenas ou

mesmo de milhares de genes simultaneamente e fornece assinaturas moleculares das atividades celulares nos estudos de doenças multigênicas como é o caso das doenças autoimunes (FATHMAN *et al.*, 2005).

Pelo conhecimento do perfil de expressão gênica, é possível responder importantes questões, tais como, quantos genes e quais suas intensidades de expressão estão envolvidos num determinado processo biológico. Além disso, reflete o perfil transcricional de milhares de genes em resposta a um estímulo farmacológico, a uma resposta imune, entre outros (KURELLA *et al.*, 2001).

Os dados de mRNAs diferencialmente expressos aqui apresentados, foram utilizados com o intuito de identificar, por meio de redes de interações microRNAs-mRNAs, as prováveis modificações ocorridas na expressão gênica e no controle pós-transcricional, exercido pelos microRNAs, ao longo do processo de diferenciação dos linfócitos T de camundongos NOD durante o desenvolvimento do DM-1.

No estudo atual, os perfis dos linfócitos T periféricos em diferentes fases do desenvolvimento foram comparados com o perfil dos timócitos e após as análises já mencionadas, foram identificados 2.771 mRNAs (Figura 22).

Esses mRNAs foram analisados segundo a Gene Ontology (GO) dos processos biológicos nos quais estão envolvidos (Tabela II).

A modulação do perfil transcricional de genes envolvidos em processos imunológicos durante a maturação dos timócitos em linfócitos T periféricos no DM-1, nos levou a realizar um estudo com o objetivo de avaliar as possíveis alterações ocorridas ao longo desse processo (FORNARI *et al.*, 2011b).

Nesse estudo, relatamos que o surgimento do DM-1 segue o padrão da atividade transcricional dessas células, envolvendo genes associados à seleção negativa de timócitos, maturação de células T, diferenciação e autorreatividade.

A figura 22 (grupos 1 a 4) e a tabela II mostram o padrão da expressão gênica observado em timócitos e linfócitos T CD3⁺ periféricos de animais prédiabéticos com 1 mês de idade caracterizando o que acontece no primeiro estágio da doença. É possível notar repressão de genes envolvidos com a ativação do sistema imune e da resposta adaptativa, com a ativação celular, com a cascata NF-Kappa β , com os processos de resposta imune e efetora, com a resposta inflamatória, com a ativação linfocitária, com a regulação da produção de interferon-gama, com a apoptose, com a comunicação celular e com a transdução de sinal. Em conjunto, esses processos biológicos são necessários para o desenvolvimento da diferenciação e autorreatividade dos linfócitos.

Durante a sua permanência dentro do timo, os timócitos ativam um mecanismo complexo de desenvolvimento devido a proximidade com o estroma tímico. As células epiteliais tímicas medulares (mTECs), que formam o compartimento do estroma medular, apresentam antígenos tecidos periféricos (PTAs) para os timócitos para eliminar clones autorreativos induzindo apoptose (seleção negativa), levando a indução de tolerância (KYEWSKI & DERBINSKI, 2004; MAGALHÃES *et al.*, 2006).

Uma falha na expressão de genes específicos de PTAs no estroma tímico está fortemente associada com a autoimunidade agressiva como observado recentemente na artrite induzida por colágeno em camundongos DBA-1/J (DONATE *et al.*, 2011) e durante o desenvolvimento de DM1 em camundongos NOD (FORNARI *et al.*, 2010). Os camundongos NZB apresentam arquitetura tímica defectiva comparável ao do NOD, além da expressão deficiente de Aire, queratina e outros genes de PTAs (FLETCHER *et al.*, 2009). Tudo isso pode facilitar a sobrevivência de clones de timócitos autorreativos que, uma vez que na periferia medeiam o ataque autoimune das estruturas alvo, como por exemplo, as células β pancreáticas.

Nosso trabalho (FORNARI *et al.*, 2010) contribuiu com o estudo das anormalidades moleculares no estroma tímico em doenças autoimunes como foi revisado por FLETCHER e colaboradores (2011), na qual incluíram nossos resultados ao mencionarem que os camundongos NOD apresentam redução na expressão do gene Aire e de PTAs no estroma timico.

Precisávamos estudar agora outro aspecto importante da regulação da expressão gênica que é a participação dos microRNAs (miRNAs). Para entender melhor o controle da atividade transcricional dos timócitos especificamente associados com a indução de tolerância e com a seleção negativa no timo ou com a citotoxicidade e a resposta inflamatória em linfócitos T periféricos, nós propusemos novos experimentos para avaliar a participação dos microRNAs, que uma vez desregulados, podem estar associados ao surgimento do DM-1.

Nesse trabalho, identificamos os perfis de expressão e as redes de interação entre um conjunto de microRNAs e seus respectivos mRNAs alvos nos timócitos e nos linfócitos T CD3⁺ periféricos durante o desenvolvimento do DM-1 em camundongos NOD.

7.5 Reação de polimerização em cadeia em tempo real (qPCR)

Os timócitos de animais pré-diabeticos de 1 mês de idade apresentaram genes (mRNAs) com baixa expressão (reprimidos) associados a vários processos biológicos que tiveram sua expressão gradualmente aumentada (induzidos) em linfócitos T CD3⁺ periféricos de animais pré-diabéticos (1 mês e 7 meses de idade) e de animais diabéticos (mais do que 7 meses de idade) (Figura 22 e Tabela II).

Dentre esses processos biológicos е seus respectivos genes, selecionamos 5 deles para a confirmação dos dados de microarrays por qPCR e para a discussão, devido a associação desses com a autoimunidade. Os genes selecionados que apresentaram mRNAs diferencialmente expressos entre timócitos e linfócitos CD3⁺ periféricos foram: Fasl, Tlr3, Tlr4, Foxp3 e Themis (Figura 54). Tais mRNAs estão associados a indução de apoptose por sinais extracelulares (Fasl), estão envolvidos na resposta inflamatória (TIr3 e TIr4), na diferenciação celular de células T regulatórias (Tregs) e na regulação positiva da indução de tolerância das células T (Foxp3) e na diferenciação de células T em CD4 e CD8 (Themis).

O processo de apoptose inclui genes como Fas ligante (Fasl), fator associado ao receptor de TNF (Traf1 e Traf5), proteína 2 interagindo com Traf3 (Traf3ip2) e fator de necrose tumoral membro 8 da superfamília (ligante) (Tnfsf8 ou TRAIL). Como a apoptose é o estágio final da seleção negativa de timócitos no timo (HOLLÄNDER, 2007), a baixa regulação desses genes pode favorecer a sobrevivência de clones de timócitos autorreativos, incluindo aqueles que reconhecem os autoantígenos das células β pancreáticas.

Os receptores tipo *Toll* (TLRs) são moléculas essenciais para o sistema imune inato, pois estimulam numerosas vias inflamatórias e harmonizam a defesa sistêmica contra uma vasta gama de patógenos. Além disso, os TLRs, incluindo TIr3 e TIr4, parecem reconhecer proteínas próprias e ácidos nucléicos endógenos. Muitos estudos tem mostrado que um estímulo inapropriado das vias TLRs por ligantes endógenos ou exógenos, em modelos animais ou em humanos, tem levado a indução e/ou prolongamento da resposta autoimune e da injúria do tecido (TAKEUCHI & AKIRA, 2010; ABDELSADIK & TRAD, 2011). Em nossos resultados, constatamos uma maior expressão dos mRNAs de TIr3 e TIr4 em animais diabéticos em relação a expressão dos mesmos em timócitos, o que estaria contribuindo para a resposta inflamatória.

O processo de indução de tolerância caracterizou-se pelo gene Foxp3, que se encontra reprimido em timócitos de animais pré-diabéticos com 1 mês de idade. Esse gene está envolvido na indução de tolerância através de células T CD4⁺ CD25⁺ regulatórias (Tregs) (FONTENOT *et al.*, 2003; HORI *et al.*, 2003; BUCKNER, 2010), um processo que, diretamente, ativa qualquer uma das etapas necessárias para a tolerância, um estado fisiológico em que o sistema imunológico não reage destrutivamente contra o próprio. Assim, a sua desregulação poderia prejudicar a supressão da autoimunidade agressiva mediada pelas células T regulatórias, favorecendo a sobrevivência dos timócitos autorreativos no timo.

Finalmente, encontramos o gene Themis, um gene associado a seleção de timócitos que é expresso no timo e em menor grau no baço, sendo não detectável em tecidos não linfóides. Este gene é altamente expresso em timócitos entre o pré-receptor de antígenos de células T (pré-TCR) e os *checkpoints* da seleção positiva sendo pouco expresso nas células T maduras (no nível de proteína) (FU *et al.,* 2009).

O gene Themis é um componente crítico no desenvolvimento de células T, pois estaria sustentando e/ou integrando sinais necessários para o comprometimento e maturação da linhagem adequada bem como no desenvolvimento de timócitos CD4SP e CD8SP (LESOURNE *et al.*, 2009).

Em nossos resultados constatamos uma alta expressão dos mRNAs do gene Themis em timócitos atingindo um menor valor nos linfócitos T CD3⁺ periféricos de animais diabéticos.

7.6 Análise dos microRNAs diferencialmente expressos

Os microRNAs diferencialmente expressos aqui apresentados, foram utilizados com o intuito de identificar, por meio de redes de interações microRNAs-mRNAs, as prováveis modificações ocorridas na expressão gênica e no controle pós-transcricional, exercido pelos microRNAs, ao longo do processo de diferenciação dos linfócitos T de camundongos NOD durante o desenvolvimento da DM-1.

No presente estudo, os perfis dos linfócitos T periféricos em diferentes fases do desenvolvimento foram comparados com o perfil dos timócitos e após as análises já mencionadas, foram obtidos 116 microRNAs (Figura 23).

Apesar do grande número de microRNAs diferencialmente expressos, selecionamos 27 microRNAs (Tabela III) que se destacaram em apenas uma fase da maturação dos linfócitos.

O perfil de expressão dos microRNAs dos linfócitos dos camundongos NOD mostra um grande número de microRNAs reprimidos ao longo de todo o processo de maturação e desenvolvimento dos timócitos em linfócitos T periféricos. Outros microRNAs, aparecem induzidos em todas as fases do processo.

Por esse motivo, fizemos uma seleção daqueles que estiveram diferencial e exclusivamente modulados em uma única fase, caracterizando-a melhor e sugerindo possíveis modificações pontuais em determinada fase do desenvolvimento dos linfócitos.

7.7 Redes de interação microRNAs-mRNAs

O estudo das redes de interação microRNA-mRNA foi realizado com o intuito de identificar prováveis mRNAs alvos e o controle pós-transcricional exercido pelos microRNAs, ao longo do processo de diferenciação dos linfócitos T durante o desenvolvimento do DM-1.

Para o estudo, foram considerados os 2.771 mRNAs diferencialmente expressos e os 27 microRNAs selecionados que geraram cinco perfis de expressão diferentes. No primeiro, um único microRNA (miR-7a*) induzido em linfócitos ativados (NOD diabético). No segundo, notamos 5 microRNAs induzidos em linfócitos näive (NOD pré-diabético com 1 mês de idade). No terceiro, encontramos 2 microRNAs reprimidos para os mesmos linfócitos näive. No quarto perfil, obtivemos 10 microRNAs induzidos em timócitos (NOD pré-diabéticos com 1 mês de idade) e no quinto e último foram encontrados 9 microRNAs reprimidos para os mesmos linfócitos para os mesmos foram encontrados 9 microRNAs reprimidos para os mesmos foram encontrados 9 microRNAs reprimidos para os mesmo timócitos.

As redes de interações microRNAs-mRNAs (Figuras 24 a 28 e Tabela IV), se tornaram o foco principal do nosso estudo, porque a partir delas, conseguimos explorar os resultados e responder a nossa hipótese de que um grupo específico de microRNAs estaria envolvido no processo autoimune e que seu perfil de expressão estaria diferente nos timócitos em relação aos linfócitos T CD3⁺ periféricos estabelecendo interações com seus mRNAs alvos durante a transição do estado pré-diabético para o diabético.

Para responder nossa hipótese, procuramos identificar os mRNAs alvos que estivessem relacionados com sistema imune, a diferenciação e ativação

celular e de linfócitos T e a apoptose, bem como a outros processos relacionados com resposta imune (Figuras 29 a 53).

Com a ajuda de bancos de dados, conseguimos encontrar interações já conhecidas e apresentar interações ainda não descritas. A tabela V traz o resultado dessas interações para os 18 mRNAs alvos que apareceram com mais frequência nos processos biológicos avaliados anteriormente e que se tornaram foco da nossa discussão.

O gene Rag1, cujo mRNA apareceu com maior frequência como alvo dos microRNAs estudados, atua na recombinação V(D)J que gera a diversidade dos receptores de antígeno (TCR) e é o processo central em torno do qual a maturação do linfócito está organizado (SCHATZ & JI, 2011). O gene Rag1 apareceu como alvo dos microRNAs miR-33 e miR-150 em nossos resultados, validando as predições dos bancos de dados. Esses microRNAs também participam do controle do metabolismo do colesterol (MOORE *et al.*, 2010b) e do desenvolvimento de células T (GHISI et al., 2011), respectivamente.

O gene Smo codifica um receptor acoplado a proteína G na via *hedgehog* do desenvolvimento embrionário (RUIZ-GÓMEZ *et al.*, 2007) mas pode ainda funcionar como um oncogene, estando associado inclusive ao câncer pancreático (CHEN *et al.*, 2010; ONISHI *et al.*, 2011). O gene Smo, de acordo com os bancos de dados e com as nossas redes, é um dos alvos do miR-18a, um membro do cluster miR-17-92 considerado oncogênico e que tem o gene da enzima Dicer também como alvo (TAO *et al.*, 2011).

O gene Ccnb1 codifica uma proteína regulatória envolvida na mitose que age conjuntamente com Cdk1 (KIM *et al.*, 2011), um outro gene cujo mRNA foi encontrado em nossas redes. Ambos os mRNAs foram tidos como alvos para o miR-30a associado em alguns estudos a adipogênese (ZARAGOSI *et al.*, 2011).

O gene Tpx2 tem sua função associada ao fuso dos microtúbulos durante a apoptose e mais recentemente tem sido um grande atrativo para a terapia do câncer pancreático (WARNER *et al.*, 2009). Tanto em nossas redes como nos bancos de dados, os mRNAs desse gene se tornaram alvos do miR-18a já mencionado.

O gene E2f7 é um fator de transcrição pertencente a família E2f cujos principais papéis são a proliferação celular, a diferenciação e a apoptose e no caso do E2f7 isso acontece em queratinócitos (ENDO-MUNOZ *et al.*, 2009). O mRNA desse gene se torno alvo para o miR-181c e para o miR-301a. O primeiro

teve seu papel comprovado na regulação da ativação de células T CD4⁺ (XUE *et al.*, 2011). O segundo tem sido relatado como um ativador de NF-Kappa β em células do câncer pancreático (LU *et al.*, 2011).

O gene Chek1 atua no ciclo celular em resposta a danos no DNA. Algumas alterações como deleção e metilação tem sido estudadas em carcinomas cervicais (MAZUMDER ' INDRA ' *et al.*, 2010) ou de mama (SINHA *et al.*, 2011). O mRNA desse gene apresentou-se como alvo para alguns microRNAs encontrados tanto nos bancos de dados quanto nos nossos resultados. Dentre eles destacamos o miR-18a, já descrito, o miR-101a que se mostrou desregulado em células T do baço em um estudo sobre lúpus sistêmico eritrematoso (SLE) sugerindo um papel exclusivo nessa doença (DAI *et al.*, 2010). O miR-101b também foi encontrado e tem sido pouco estudado, mas existe uma associação com doenças infecciosas em camundongos (DELIC *et al.*, 2011).

Ainda com relação ao gene Chek1, encontramos o miR-128, cuja expressão aberrante tem implicado em diferentes tipos de câncer, atuando ainda como indutor de apoptose sobre a proteína Bax (ADLAKHA & SAINI, 2011).

Os microRNAs miR-146a e miR-223 tem sido bastante estudados em inflamações crônicas (DAI *et al.*, 2008; SONKOLY *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2010) e em doenças autoimunes como o lúpus (BOSTJANCIC & GLAVAC, 2008; TANG *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2011) e a artrite reumatoide (RA) (CERIBELLI *et al.*, 2011; PAULEY & CHA, 2011).

O gene Top2a codifica a enzima topoisomerase 2 alfa que desempenha importante papel nos processo de replicação e empacotamento de DNA, quebrando suas duas fitas e tem sido bastante estudado em câncer de mama (ROMERO *et al.*, 2011). O mRNA desse gene foi dado com alvo do miR-33, tanto nesse trabalho quanto nos bancos de dados.

Os demais mRNAs alvo citados na tabela V correspondem aqueles ainda não estudados sendo, portanto, inéditos e sugerem novos estudos. Mas por meio dos dados biológicos, podemos sugerir que as interações microRNAs-mRNAs encontrados em nossos estudos estariam de alguma forma associadas ao controle da maturação dos linfócitos T periféricos e ao surgimento do DM-1.



8. CONCLUSÕES

- A linhagem de camundongos NOD apresentou expressão diferenciada de mRNAs e microRNAs em timócitos de animais pré-diabéticos.
- 2) Os camundongos NOD apresentaram expressão diferenciada de mRNAs e microRNAs em linfócitos T CD3⁺ periféricos durante o desenvolvimento do diabetes mellitus do tipo 1 (DM-1), incluindo animais pré-diabéticos com 1 mês e 7 meses de idade e animais diabéticos.
- 3) As diferenças nos perfis transcricionais encontradas envolvem expressão de genes (mRNAs) relacionados ao sistema imune, a diferenciação e ativação de linfócitos T e a apoptose, bem como a outros processos relacionados a resposta imune.
- 4) A maior incidência de células T CD4⁺ nas populações celulares estudadas sugere que o desequilíbrio entre as populações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, leva a quebra da tolerância e consequentemente ao desenvolvimento do DM-1 nesses animais.
- 5) A análise histológica dos pâncreas dos camundongos NOD estudados demonstram que o processo de infiltração dos linfócitos durante a insulite, leva a mudanças com o avanço da idade e ao longo do desenvolvimento da doença que coincidem com a expressão diferenciada dos mRNAs e dos microRNAs das células T estudadas.
- Alguns microRNAs apresentaram perfil de expressão exclusivo de determinada fase do desenvolvimento das células T.
- 7) As redes de interação microRNAs-mRNAs identificaram modificações ocorridas na expressão gênica e no controle pós-transcricional, exercido pelos microRNAs, ao longo do processo de diferenciação dos linfócitos T de camundongos NOD durante o desenvolvimento do DM-1.

- 8) As redes de interação microRNAs-mRNAs exibiram um grande número de mRNAs alvos relacionados a processos biológicos como diferenciação e ativação de linfócitos T, apoptose, resposta imune, desenvolvimento do sistema imune, dentre outras.
- 9) As redes de interação microRNAs-mRNAs encontradas no presente trabalho, evidenciam interações anteriormente preditas e, além disso, apresentam novas interações, mostrando a participação de um grupo de microRNAs que estão atuando no controle pós-transcricional do diabetes do tipo 1 em camundongos NOD.

Referências Bibliográficas

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELSADIK, A. & TRAD, A. Toll-like receptors on the fork roads between innate and adaptive immunity. **Human Immunology**. 2011. No prelo.

ADAMSON, K. A.; PEARCE, S. H.; LAMB, J. R.; SECKL, J. R.; HOWIE, S. E. A comparative study of mRNA and protein expression of the autoimmune regulator gene (Aire) in embryonic and adult murine tissues. **The Journal of Pathology**. v.202, n.2, p.180-187, 2004.

ADLAKHA, Y. K. & SAINI, N. MicroRNA-128 downregulates Bax and induces apoptosis in human embrionic kidney cells. **Cellular and Molecular Life Science.** v.68, n.8, p.1415-1428, 2011.

AKIYAMA, T.; SHIMO, Y.; YANAI, H.; QIN, J.; OHSHIMA, D.; MARUYAMA, Y.; ASAUMI, Y.; KITAZAWA, J.; TAKAYANAGI, H.; PENNINGER, J. M.; MATSUMOTO, M.; NITTA, T.; TAKAHAMA, Y.; INOUE, J. The tumour necrosis factor family receptors RANK and CD40 cooperatively establish the thymic medullary microenvironment and self-tolerance. **Immunity.** v.29, n.3, p.423–437, 2008.

AMBROS, V. & HORVITZ, H. R. Heterochronic mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Science**. v.226, n.4673, p.409–416, 1984.

ANDERSON, G. & JENKINSON, E. J. Lymphostromal interactions in thymic development and function. **Nature Reviews Immunology.** v.1, n.1, p.31-40, 2001.

ANDERSON, G.; JENKINSON, W. E.; JONES, T.; PARNELL, S. M.; KINSELLA, F. A. M.; WHITE, A. J.; PONGRAC'Z, J. E.; ROSSI, S. W.; JENKINSON, E. J. Establishment and functioning of intrathymic microenvironments. **Immunological Reviews**. v.209, p.10-27, 2006.

ANDERSON, G.; LANE, P. J.; JENKINSON, E. J. Generating intrathymic microenvironments to establish T-cell tolerance. **Nature Reviews Immunology.** v.7, n.12, p.954-963, 2007.

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. Projection of an immunological self-shadow within the thymus by the aire protein. **Science**. v.298, n.5597, 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, n.2, p.227-239, 2005.

ANDERSON, M. S. & BLUESTONE, J. A. The NOD mouse: a model of immune dysregulation. **Annual Review of Immunology.** v.23, p.447-485, 2005.

ARAI, T.; MORIYAMA, H.; SHIMIZU, M.; SASAKI, H.; KISHI, M.; OKUMACHI, Y.; YASUDA, H.; HARA, K.; YOKONO, K.; NAGATA, M. Administration of a determinant of preproinsulin can induce regulatory T cells and suppress anti-islet autoimmunity in NOD mice. **Clinical Immunology.** v.136, n.1, p.74-82, 2010.

ATKINSON, M. A & LEITER, E. H. The NOD mouse model of type 1 diabetes: as good as it gets? **Nature Medicine.** v.5, n.6, p.601-604, 1999.

BABAD, J.; GELIEBTER, A.; DILORENZO, T. P. T-cell autoantigens in the nonobese diabetic mouse model of autoimmune diabetes. **Immunology**. v.131, n.4, p.459–465, 2010.

BACH, J. F. Infections and autoimmune diseases. **Journal of Autoimmunity**. v.25, p.74-80, 2005.

BALTIMORE, D.; BECKER, Y.; DARNELL, J. E. Virus-specific double stranded RNA in poliovirus-infected cells. **Science.** v.143, p.1034–1036, 1964.

BARTEL, D. P. MicroRNAs. Genomics, biogenesis, mechanism and function. **Cell**. v.116, n.2, p.281–297, 2004.

BARTEL, D. P. & CHEN, C. Z. Micromanagers of gene expression: the potentially widespread influence of metazoan microRNAs. **Nature Reviews Genetics.** v.5, n.5, p.396–400, 2004.

BARTHLOTT ,T.; KELLER, M. P.; KRENGER, W.; HOLLÄNDER, G. A. A short primer on early molecular and cellular events in thymus organogenesis and replacement. **Swiss Medical Weekly**. v.136, n.23-24, p.365-369, 2006.

BETEL, D.; WILSON, M.; GABOW, A.; MARKS, D. S.; SANDER, C. The microRNA.org resource: targets and expression. **Nucleic Acids Research.** v.36, p.149-153, 2008.

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

BLEUL, C. C.; CORBEAUX, T.; REUTER, A.; FISCH, P.; MÖNTING, J. S.; BOEHM, T. Formation of a functional thymus initiated by a postnatal epithelial progenitor cell. **Nature.** v.441, n.7096, p.992-996, 2006.

BOCKMAN, D. E. & KIRBY, M. L. Dependence of thymus development on derivatives of the neural crest. **Science**. v.223, n.4635, p.498–500, 1984.

BODEY, B.; BODEY, B. JR.; SIEGEL, S. E.; KAISER, H. E. Involution of the mammalian thymus, one of the leading regulators of aging. **In Vivo.** v.11, n.5, p.421-440, 1997.

BOEHM, T.; SCHEU, S.; PFEFFER, K.; BLEUL, C. C. Thymic medullary epithelial cell differentiation, thymocyte emigration, and the control of autoimmunity require lympho-epithelial cross talk via LTbetaR. **The Journal of Experimental Medicine.** v.198, n.5, p.757-769, 2003.

BOEHM, T. & BLEUL, C. C. Thymus-homing precursors and the thymic microenvironment. **Trends in Immunology.** v.27, n.10, p.477-484, 2006.

BOSTJANCIC, E. & GLAVAC, D. Importanceof microRNAs in skin morphogenesis and diseases. **Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat.** v.17, n.3, p.95-102, 2008.

BOWMAN, M. A.; LEITER, E. H.; ATKINSON, M. A. Prevention of diabetes in the NOD mouse: implications for therapeutic intervention in human disease. **Immunology Today.** v.15, n.3, p.115-120, 1994.

BUCKNER, J. H. Mechanisms of impaired regulation by CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ regulatory T cells in human autoimmune diseases. **Nature Reviews Immunology.** v.10, n.12, p.849–859, 2010.

CAI, Y.; YU, X.; HU, S.; YU, J. A brief review on the mechanisms of miRNA regulation. **Genomics Proteomics Bioinformatics.** v.7, n.4, p.147-54, 2009.

CARDOSO, R. S.; JUNTA, C. M.; MACEDO, C.; MAGALHÃES, D. A.; SILVEIRA, E. L.; PAULA, M. O.; MARQUES, M. M.; MELLO, S. S.; ZÁRATE-BLADÉS, C. R.; NGUYEN, C.; HOULGATTE, R.; DONADI, E. A.; SAKAMOTO-HOJO, E. T.; PASSOS, G. A. Hybridization signatures of gamma-irradiated murine fetal thymus organ culture (FTOC) reveal modulation of genes associated with T-cell receptor V(D)J recombination and DNA repair. **Molecular Immunology.** v.43, n.5, p.464-472, 2006.

CARISSIMI, C.; FULCI, V.; MACINO, G. MicroRNAs: novel regulators of immunity. **Autoimmunity Reviews.** v.8, n.6, p.520-524, 2009.

CARTHEW, R. W. & SONTHEIMER, E. J. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. **Cell.** v.136, n.4, p.642–655, 2009.

CERIBELLI, A.; NAHID, M. A.; SATOH, M.; CHAN, E. K. MicroRNAs in rheumatoid arthritis. **FEBS Letters.** 2011. No prelo.

CHALFIE, M.; HORVITZ, H. R.; SULSTON, J. E. Mutations that lead to reiterations in the cell lineages of C. elegans. **Cell.** v.24, n.1, p.59–69, 1981.

CHEN, X. L.; CHENG, Q. Y.; SHE, M. R.; WANG, Q.; HUANG, X. H.; CAO, L. Q.; FU, X. H.; CHEN, J. S. Expression of sonic hedgehog signaling components in hepatocellular carcinoma and cyclopamine-induced apoptosis through Bcl-2 downregulation in vitro. **Archives of Medical Research.** v.41, n.5, p.315-323, 2010.

CHENG, C.; BHARDWAJ, N.; GERSTEIN, M. The relationship between the evolution of microRNA targets and the length of their UTRs. **BMC Genomics.** v.10, p.431-436, 2009.

CHENTOUFI, A. A.; GAUDREAU, S.; NGUYEN, A.; SABHA, M.; AMRANI, A.; ELGHAZALI, G. Type I diabetes-associated tolerogenic properties of interleukin-2. **Clinical and Developmental Immunology.** v.2011, p.289343, 2011.

CIOFANI, M. & ZÚÑIGA-PFLÜCKER, J. C. The thymus as an inductive site for T lymphopoiesis. **Annual Review of Cell and Developmental Biology.** v.23, p.463–493, 2007.

COBB, B. S.; HERTWECK, A.; SMITH, J.; O'CONNOR, E.; GRAF, D.; COOK, T.; SMALE, S. T.; SAKAGUCHI, S.; LIVESEY, F. J.; FISHER, A. G.; MERKENSCHLAGER, M. A role for Dicer in immune regulation. **The Journal of Experimental Medicine**. v.203, n.11 p.2519–2527, 2006.

CORDIER, A. C. & HAUMONT, S. M. Development of thymus, parathyroids, and ultimo-branchial bodies in NMRI and nude mice. **American Journal of Anatomy.** v.157, n.3, p.227-263, 1980.

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 Sciences.** v.1173, p.442-448, 2009.

CULLEN, B. R. Transcription and processing of human microRNAs precursors. **Molecular Cell.** v.16, n.6, p.861-865, 2004.

DAI, R.; PHILLIPS, R. A.; ZHANG, Y.; KHAN, D.; CRASTA, O.; AHMED, S. A. Suppression of LPS-induced Interferon-gamma and nitric oxide in splenic lymphocytes by select estrogen-regulated microRNAs: a novel mechanism of immune modulation. **Blood.** v.112, n.12, p.4591-4597, 2008.

DAI, R.; ZHANG, Y.; KHAN, D.; HEID, B.; CAUDELL, D.; CRASTA, O.; AHMED, S. A. Identification of common lupus disease associated microRNA expression pattern in three different murine models of lupus. **PLoS One.** v.5, n.12, p.e14302, 2010.

DAI, R. & AHMED, S. A. MicroRNA, a new paradigm for understanding immunoregulation, inflammation and autoimmune diseases. **Translational Research.** v.157, n.4, p.163-179, 2011.

DAVIS-DUSENBERY, B. N. & HATA, A. Mechanisms of control of microRNA biogenesis. **The Journal of Biochemistry.** v.148, n.4, p.381-392, 2010.

DELIC, D.; DKHIL, M.; AL-QURAISHY, S.; WUNDERLICH, F. Hepatic miRNA expression reprogrammed by Plasmodium chabaudi malaria. **Parasitology Research.** v.108, n.5, p.1111-1121, 2011.

DERBINSKI, J.; SCHULTE, A.; KYEWSKI, B.; KLEIN, L. Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. **Nature Immunology.** v.2, n.11, p.1032-1039, 2001.

DERBINSKI, J. & KYEWSKI, B. Linking signalling pathways, thymic stroma integrity and autoimmunity. **Trends in Immunology.** v.26, n.10, p.503-506, 2005.

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, n.1, p.33-45, 2005.

DEVOSS, J.; HOU, Y.; JOHANNES, K.; LU, W.; LIOU, GI.; RINN, J.; CHANG, H.; CASPI, R. R.; FONG, L.; ANDERSON, M. S. Spontaneous autoimmunity prevented by thymic expression of a single self-antigen. **The Journal of Experimental Medicine.** v.203, n.12, p.2727-2735, 2006.

DOENCH, J. G.; PETERSEN, C. P.; SHARP, P. A. siRNAs can function as miRNAs. **Genes & Development.** v.17, n.4, p.438–442, 2003.

DOENCH, J. G. & SHARP, P. A. Specificity of microRNA target selection in translational repression. **Genes & Development.** v.18, n.5, p.504-511, 2004.

DONATE, P. B.; FORNARI, T. A.; JUNTA, C. M.; MAGALHÃES, D. A.; MACEDO, C.; CUNHA, T. M.; NGUYEN, C.; CUNHA, F. Q.; PASSOS, G. A. Collagen induced arthritis (CIA) in mice features regulatory transcriptional network connecting major histocompatibility complex (MHC H2) with autoantigen genes in the thymus. **Immunobiology.** v.216, n.5, 591-603, 2011.

DUGGAN, D. J.; BITTNER, M.; CHEN, Y.; MELTZER, P.; TRENT, J. M. Expression profiling using cDNA microarrays. **Nature Genetics.** v.21, n.1, p.10-14, 1999.

ENDO-MUNOZ, L.; DAHLER, A.; TEAKLE, N.; RICKWOOD, D.; HAZAR-RETHINAM, M.; ABDUL-JABBAR, I.; SOMMERVILLE, S.; DICKINSON, I.; KAUR, P.; PAQUET-FIFIELD, S.; SAUNDERS, N. E2F7 can regulate proliferation, differentiation, and apoptotic responses in human keratinocytes: implications for cutaneous squamous cell carcinoma formation. **Cancer Research.** v.69, n.5, p.1800-1808, 2009.

FARAONI, I.; ANTONETTI, F. R.; CARDONE, J.; BONMASSAR, E. miR-155 gene: a typical multifunctional microRNA. **Biochimica et Biophysica Acta.** v.1792, n.6, p.497-505, 2009.

FARH, K. K.; GRIMSON, A.; JAN, C.; LEWIS, B. P.; JOHNSTON, W. K.; LIM, L. P.; BURGE, C. B.; BARTEL, D. P. The widespread impact of mammalian MicroRNAs on mRNA repression and evolution. **Science.** v.310, n.5755, p.1817-1821, 2005.

FATHMAN, C. G.; SOARES, L.; CHAN, S. M.; UTZ, P. J. An array of possibilities for the study of autoimmunity. **Nature.** v.435, n.7042, p.605-611, 2005.

FILIPPI, C. & VON HERRATH, M. How viral infections affect the autoimmune process leading to type 1 diabetes. **Cell Immunology.** v.233, n.2, p.125-132, 2005.

FLETCHER, A. L.; SEACH, N.; REISEGER, J. J.; LOWEN, T. E.; HAMMETT, M. V.; SCOTT, H. S.; BOYD, R. L. Reduced thymic Aire expression and abnormal NF-kappa B2 signaling in a model of systemic autoimmunity. **The Journal of Immunology.** v.182, n.5, p.2690-2699, 2009.

FLETCHER, A. L.; CALDER, A.; HINCE, M. N.; BOYD, R. L.; CHIDGEY, A. P. The contribution of thymic stromal abnormalities to autoimmune disease. **Critical Reviews in Immunology.** v.31, n.3, p.171-187, 2011.

FONTENOT, J. D.; GAVIN, M. A.; RUDENSKY, A. Y. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. **Nature Immunology.** v.4, n.4, p.330-336, 2003.

FORNARI, T.A.; DONATE, P. B.; MACEDO, C.; MARQUES, M. M.; 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, n.1-2, p.21-28, 2010.

FORNARI, T. A.; MARQUES, M. M.; NGUYEN, C.; CARRIER, A.; PASSOS, G. A. Transcription profiling of Prss16 (Tssp) can be used to find additional peptidase genes that are candidates for self-peptide generation in the thymus. **Molecular Biology Reports.** 2011a. No prelo.

FORNARI, T. A.; DONATE, P. B.; MACEDO, C.; SAKAMOTO-HOJO, E. T.; DONADI, E. A.; PASSOS, G. A. Development of type 1 diabetes mellitus in nonobese diabetic mice follows changes in thymocyte and peripheral T lymphocyte transcriptional activity. **Clinical and Developmental Immunology.** v.2011, p.158735, 2011b.

FU, G.; VALLÉE, S.; RYBAKIN, V.; MCGUIRE, M. V.; AMPUDIA, J.; BROCKMEYER, C.; SALEK, M.; FALLEN, P. R.; HOERTER, J. A.; MUNSHI, A.; HUANG, Y. H.; HU, J.; FOX, H. S.; SAUER, K.; ACUTO, O.; GASCOIGNE, N. R. Themis controls thymocyte selection through regulation of T cell antigen receptor-mediated signaling. **Nature Immunology.** v.10, n.8, p.848-856, 2009.

FUJIO, K.; OKAMURA, T.; OKAMOTO, A.; YAMAMOTO, K. T cell receptor gene therapy for autoimmune diseases. **Annals of the New York Academy of Sciences.** v.1110, p.222-232, 2007.

FURER, V.; GREENBERG, J. D.; ATTUR, M.; ABRAMSON, S. B.; PILLINGER, M. H. The role of microRNA in rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. **Clinical Immunology.** v.136, n.1, p.1-15, 2010.

GARDNER, J. M.; FLETCHER, A. L.; ANDERSON, M. S.; TURLEY, S. J. AIRE in the thymus and beyond. **Current Opinion in Immunology.** v.21, n.6, p.582-589, 2009.

GAVANESCU, I.; KESSLER, B.; PLOEGH, H.; BENOIST, C.; MATHIS, D. Loss of Aire-dependent thymic expression of a peripheral tissue antigen renders it a target of autoimmunity. **Proc Natl Acad Sci USA.** v.104, n.11, p.4583-4587, 2007.

GERMERAAD, W. T.; KAWAMOTO, H.; ITOI, M.; JIANG, Y.; AMAGAI, T.; KATSURA, Y.; VAN EWIJK, W. Development of thymic microenvironments in vitro is oxygen-dependent and requires permanent presence of T-cell progenitors. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry.** v.51, n.9, p.1225-1235, 2003.

GHISI, M.; CORRADIN, A.; BASSO, K.; FRASSON, C.; SERAFIN, V.; MUKHERJEE, S.; MUSSOLIN, L.; RUGGERO, K.; BONANNO, L.; GUFFANTI, A.; DE BELLIS, G.; GEROSA, G.; STELLIN, G.; D'AGOSTINO, D. M.; BASSO, G.; BRONTE, V.; INDRACCOLO, S.; AMADORI, A.; ZANOVELLO, P. Modulation of microRNA expression in human T-cell development: targeting of NOTCH3 by miR-150. **Blood.** v.117, n.26, p.7053-7062, 2011.

GIANANI, R. & SARVETNICK, N. Viruses, cytokines, antigens, and autoimmunity. **Proc Natl Acad Sci USA.** v.93, n.6, p.2257-2259, 1996.

GORDON, J.; BENNETT, A. R.; BLACKBURN, C. C.; MANLEY, N. R. Gcm2 and Foxn1 mark early parathyroid- and thymus-specific domains in the developing third pharyngeal pouch. **Mechanisms of Development.** v.103, n.1-2, p.141-143, 2001.

GORDON, J.; WILSON, V. A.; BLAIR, N. F.; SHERIDAN, J.; FARLEY, A.; WILSON, L.; MANLEY, N. R.; BLACKBURN, C. C. Functional evidence for a single endodermal origin for the thymic epithelium. **Nature Immunology.** v.5, n.5, p.546-553, 2004.

GOTTER, J.; BRORS, B.; HERGENHAHN, M.; KYEWSKI, B. Medullary epithelial cells of the human thymus express a highly diverse selection of tissue-specific genes co-localized in chromosomal clusters. **The Journal of Experimental Medicine.** v.199, n.2, p.155-166, 2004.

GRAY, D. H.; CHIDGEY, A. P.; BOYD, R. L. Analysis of thymic stromal cell populations using flow cytometry. **Journal of Immunological Methods.** v.260, n.1-2, p.15-28, 2002.

GRAY, D. H.; SEACH, N.; UENO, T.; MILTON, M. K.; LISTON, A.; LEW, A. M.; GOODNOW, C. C.; BOYD, R. L. Developmental kinetics, turnover, and stimulatory capacity of thymic epithelial cells. **Blood.** v.108, n.12, p.3777-3785, 2006.

GRIMSON, A.; FARH, K. K.; JOHNSTON, W. K.; GARRETT-ENGELE, P.; LIM, L. P.; BARTEL, D. P. MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. **Molecular Cell**. v.27, n.1, p.91-105, 2007.

GUAY, C.; ROGGLI, E.; NESCA, V.; JACOVETTI, C.; REGAZZI, R. Diabetes mellitus, a microRNA-related disease? **Translational Research.** v.157, n.4, p.253-264, 2011.

HALONEN, M.; PELTO-HUIKKO, M.; ESKELIN, P.; PELTONEN, L.; ULMANEN, I.; KOLMER, M. Subcellular location and expression pattern of autoimmune regulator (Aire), the mouse orthologue for human gene defective in autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy (APECED). Journal of Histochemistry and Cytochemistry. v.49, n.2, p.197-208, 2001.

HAKS, M. C.; KRIMPENFORT, P.; BORST, J.; KRUISBEEK, A. M. The CD3 gamma chain is essential for development of both the TCR alpha beta and TCR gamma delta lineages. **The EMBO Journal.** v.17, n.7, p.1871-1882, 1998.

HARMAN, B. C.; JENKINSON, W. E.; PARNELL, S. M.; ROSSI, S. W.; JENKINSON, E. J.; ANDERSON, G. T/B lineage choice occurs prior to intrathymic Notch signaling. **Blood.** v.106, n.3, p.886-892, 2005.

HAYWARD, A. R & SHREIBER, M. Neonatal injection of CD3 antibody into nonobese diabetic mice reduces the incidence of insulitis and diabetes. **The Journal of Immunology.** v.143, n.5, p.1555–1559, 1989.

HENNESSY, E. & O'DRISCOLL, L. Molecular medicine of microRNAs: structure, function and implications for diabetes. **Expert Reviews in Molecular Medicine.** v.10, p.e24, 2008.

HIKOSAKA, Y.; NITTA, T.; OHIGASHI, I.; YANO, K.; ISHIMARU, N.; HAYASHI, Y.; MATSUMOTO, M.; MATSUO, K.; PENNINGER, J. M.; TAKAYANAGI, H.; YOKOTA, Y.; YAMADA, H.; YOSHIKAI, Y.; INOUE, J.; AKIYAMA, T.; TAKAHAMA, Y. The cytokine RANKL produced by positively selected thymocytes fosters medullary thymic epithelial cells that express autoimmune regulator. **Immunity.** v.29, n.3, p.438–450, 2008.

HOLLÄNDER, G. A. Claudins provide a breath of fresh Aire. **Nature Immunology.** v.8, n.3, p.234-236, 2007.

HORI, S.; NOMURA, T.; SAKAGUCHI, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. **Science.** v.299, n.5609, p.1057-1061, 2003.

HU, Y.; NAKAGAWA, Y.; PURUSHOTHAM, K. R.; HUMPHREYS-BEHER, M. G. Functional changes in salivary glands of autoimmune disease-prone NOD mice. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism.** v.263, p.E607-614, 1992.

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, n.5, p.550-563, 2007.

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. Autoantigen-specific interactions with CD4⁺ thymocytes control mature medullary thymic epithelial cell cellularity. **Immunity.** v.29, n.3, p.451–463, 2008.

ITOI, M.; KAWAMOTO, H.; KATSURA, Y.; AMAGAI, T. Two distinct steps of immigration of hematopoietic progenitors into the early thymus anlage. **International Immunology**. v.13, n.9, p.1203-1211, 2001.

JAMESON, S. C & BEVAN, M. J. T-cell selection. Current Opinion in Immunology. v.10, n.2, p.214–219, 1998.

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, n.6, p. 805-815, 2005.

JIMENO, R.; GOMARIZ, R. P.; GUTIÉRREZ-CAÑAS, I.; MARTÍNEZ, C.; JUARRANZ, Y.; LECETA, J. New insights into the role of VIP on the ratio of T-cell subsets during the development of autoimmune diabetes. **Immunology & Cell Biology.** v.88, n.7, p.734-745, 2010.

JOGLEKAR, M. V.; JOGLEKAR, V. M.; HARDIKAR, A. A. Expression of isletspecific microRNAs during human pancreatic development. **Gene Expression Patterns**. v.9, n.2, p.109-113, 2009.

JOLICOEUR, C.; HANAHAN, D.; SMITH, K. M. T-cell tolerance toward a transgenic beta-cell antigen and transcription of endogenous pancreatic genes in thymus. **Proc Natl Acad Sci USA.** v.91, n.14, p.6707-6711, 1994.

JORDAN, B. R. Large-scale expression measurement by hybridization methods: from high-density membranes to "DNA chips". **The Journal of Biochemistry.** v.124, n.2, p.251-258, 1998.

KAMRADT, T. & MITCHISON, N. A. Tolerance and autoimmunity. **The New England Journal of Medicine.** v.344, n.9, p.655-664, 2001.

KATZ, J.; BENOIST, C.; MATHIS, D. Major histocompatibility complex class I molecules are required for the development of insulitis in non-obese diabetic mice. **European Journal of Immunology**. v.23, n.12, p.3358–3360, 1993.

KIM, K. C.; OH, W. J.; KO, K. H.; SHIN, C. Y.; WELLS, D. G. Cyclin b1 expression regulated by cytoplasmic polyadenylation element binding protein in astrocytes. **The Journal of Neuroscience.** v.31, n.34, p.12118-12128, 2011.

KISHIMOTO, H. & SPRENT, J. Several different cell surface molecules control negative selection of medullary thymocytes. **The Journal Experimental Medicine.** v.190, n.1, p.65–73, 1999.

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

KLEIN, L. & KYEWSKI, B. Self-antigen presentation by thymic stromal cells: a subtle division of labor. **Current Opinion in Immunology.** v.12, n.2, p.179-186, 2000a.

KLEIN, L. & KYEWSKI, B. "Promiscuous" expression of tissue antigens in the thymus: a key to T-cell tolerance and autoimmunity? **Journal of Molecular Medicine.** v.78, n.9, p.483-494, 2000b.

KLEIN, L.; HINTERBERGER, M.; WIRNSBERGER, G.; KYEWSKI, B. Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. **Nature Reviews Immunology.** v.9, n.12, p.833–844, 2009.

KODAMA, 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, n.2, p.195-201, 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, n.1, p.25-33, 2008.

KRANGEL, M. S. Mechanics of T cell receptor gene rearrangement. **Current Opinion in Immunology.** v.21, n.2, p.133–139, 2009.

KREK, A.; GRÜN, D.; POY, M. N.; WOLF, R.; ROSENBERG, L.; EPSTEIN, E. J.; MACMENAMIN, P.; DA PIEDADE, I.; GUNSALUS, K. C.; STOFFEL, M.; RAJEWSKY, N. Combinatorial microRNA target predictions. **Nature Genetics.** v.37, n.5, p.495-500, 2005.

KREUWEL, H. T.; BIGGS, J. A.; PILIP, I. M.; PAMER, E. G.; LO, D.; SHERMAN, L. A. Defective CD8⁺ T cell peripheral tolerance in nonobese diabetic mice. **Journal of Immunology.** v.167, n.2, p.1112-1117, 2001.

KROL, J.; LOEDIGE, I.; FILIPOWICZ, W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. **Nature Reviews Genetics**. v.11, n.9, p.597-610, 2010.

KUMAR, P. G.; LALORAYA, M.; WANG, C. Y.; RUAN, Q. G.; DAVOODI-SEMIROMI, A.; KAO, K. J.; SHE, J. X. The autoimmune regulator (Aire) is a DNA binding protein. **The Journal of Biological Chemistry.** v.276, n.44, p.41357-41364, 2001.
KURELLA, M.; HSIAO, L. L.; YOSHIDA, T.; RANDALL, J. D.; CHOW, G.; SARANG, S. S.; JENSEN, R. V.; GULLANS, S. R. DNA microarray analysis of complex biologic processes. **Journal of the American Society of Nephrology**. v.12, n.5, p.1072-1078, 2001.

KUROBE, H.; LIU, C.; UENO, T.; SAITO, F.; OHIGASHI, I.; SEACH, N.; ARAKAKI, R.; HAYASHI, Y.; KITAGAWA, T.; LIPP, M.; BOYD, R. L.; TAKAHAMA, Y. CCR7dependent cortex-to-medulla migration of positively selected thymocytes is essential for establishing central tolerance. **Immunity**. v.24, n.2, p.165–177, 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.; TAKAHAMA, Y.; UCHIDA, D.; SUN, S.; KAJIURA, F.; MOURI, Y.; HAN, H.; MATSUSHIMA, A.; YAMADA, G.; MATSUMOTO, M. Development of autoimmunity against transcriptionally unrepressed target antigen in the thymus of Aire-deficient mice. **The Journal of Immunology.** v.174, n.4, p.1862-1870, 2005.

KWAN, J. & KILLEEN, N. CCR7 directs the migration of thymocytes into the thymic medulla. **The Journal of Immunology.** v.172, n.7, p.3999-4007, 2004.

KYEWSKI, B. & DERBINSKI, J. Self-representation in the thymus: an extended view. **Nature Reviews Immunology.** v.4, n.9, p.688–698, 2004.

LAGOS-QUINTANA, M.; RAUHUT, R.; LENDECKEL, W.; TUSCHL, T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. **Science.** v.294, n.5543, p.853–858, 2001.

LAU, N. C.; LIM, L. P.; WEINSTEIN, E. G.; BARTEL, D. P. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. **Science**. v.294, n. 5543, p.858–862, 2001.

LE DOUARIN, N. M.; JOTEREAU, F. V. Tracing of cells of the avian thymus through embryonic life in interspecific chimeras. **The Journal of Experimental Medicine.** v.142, n.1, p.17–40, 1975.

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

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.

LESOURNE, R.; UEHARA, S.; LEE, J.; SONG, K. D.; LI, L.; PINKHASOV, J.; ZHANG, Y.; WENG, N. P.; WILDT, K. F.; WANG, L.; BOSSELUT, R.; LOVE, P. E. Themis, a T cell-specific protein important for late thymocyte development. **Nature Immunology.** v.10, n.8, p.840-847, 2009.

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, n.1, 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, n.1, p.147-161, 2007.

LIM, L. P.; LAU, N. C.; GARRETT-ENGELE, P.; GRIMSON, A.; SCHELTER, J. M.; CASTLE, J.; BARTEL, D. P.; LINSLEY, P. S.; JOHNSON, J. M. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. **Nature.** v.433, n.7027, p.769-773, 2005.

LIPSHUTZ, R. J.; FODOR, S. P.; GINGERAS, T. R.; LOCKHART, D. J. High density synthetic oligonucleotide arrays. **Nature Genetics.** v.21, n.1, p.20-24, 1999.

LISTON, A.; GRAY, D. H.; 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 Experimental Medicine.** v.200, n.8, p.1015-1026, 2004a.

LISTON, A.; LESAGE, S.; GRAY, D. H.; O'REILLY, L. A.; STRASSER, A.; FAHRER, A. M.; BOYD, R. L.; WILSON, J.; BAXTER, A. G.; GALLO, E. M.; CRABTREE, G. R.; PENG, K.; WILSON, S. R.; GOODNOW, C. C. Generalized resistance to thymic deletion in the NOD mouse; a polygenic trait characterized by defective induction of Bim. **Immunity.** v.21, n.6, p.817-830, 2004b.

LODISH, H. F.; ZHOU, B.; LIU, G.; CHEN, C. Z. Micromanagement of the immune system by microRNAs. **Nature Reviews Immunology.** v.8, n.2, p.120-130, 2008.

LU, Z.; LI, Y.; TAKWI, A.; LI, B.; ZHANG, J.; CONKLIN, D. J.; YOUNG, K. H.; MARTIN, R.; LI, Y. miR-301a as an NF-κB activator in pancreatic cancer cells. **The EMBO Journal.** v.30, n.1, p.57-67, 2011.

LUSTIG, A.; CARTER, A.; BERTAK, D.; ENIKA, D.; VANDANMAGSAR, B.; WOOD, W.; BECKER, K. G.; WEERARATNA, A. T.; TAUB, D. D. Transcriptome analysis of murine thymocytes reveals age-associated changes in thymic gene expression. **International Journal of Medical Sciences.** v.6, n.1, p.51-64, 2009.

LYONS, P. A.; HANCOCK, W. W.; DENNY, P.; LORD, C. J.; HILL, N. J.; ARMITAGE, N.; SIEGMUND, T.; TODD, J. A.; PHILLIPS, M. S.; HESS, J. F.; CHEN, S. L.; FISCHER, P. A.; PETERSON, L. B.; WICKER. L. S. The NOD Idd9 genetic interval influences the pathogenicity of insulitis and contains molecular variants of Cd30, Tnfr2, and Cd137. **Immunity.** v.13, n.1, p.107-115, 2000.

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. Evidence for a network transcriptional control of promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells. **Molecular Immunology.** v.46, n.16, p.3240-3244, 2009.

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, n.2-4, p.81-99, 2006.

MAIER, L. M. & WICKER, L. S. Genetic susceptibility to type 1 diabetes. **Current Opinion in Immunology.** v.17, n.6, p.601-608, 2005.

MAKEYEV, E. V. & MANIATIS, T. Multilevel regulation of gene expression by microRNAs. **Science.** v.319, n.5871, p.1789-1790, 2008.

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

MANLEY, N. R. Thymus organogenesis and molecular mechanisms of thymic epithelial cell differentiation. **Seminars in Immunology.** v.12, n.5, p.421-428, 2000.

MANLEY, N. R & BLACKBURN, C. C. A developmental look at thymus organogenesis: where do the non-hematopoietic cells in the thymus come from? **Current Opinion in Immunology.** v.15, n.2, p.225-232, 2003.

MANY, M. C.; MANIRATUNGA, S.; DENEF, J. F. The non-obese diabetic (NOD) mouse: an animal model for autoimmune thyroiditis. **Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes.** v.104, n.3, p.17-20, 1996.

MAZUMDER ' INDRA ', D.; MITRA, S.; SINGH, R. K.; DUTTA, S.; ROY, A.; MONDAL, R. K.; BASU, P. S.; ROYCHOUDHURY, S.; PANDA, C. K. Inactivation of CHEK1 and EI24 are associated with the development of invasive cervical carcinoma: Clinical and prognostic implications. **International Journal of Cancer.** 2010. No prelo.

MCCAUGHTRY, T. M.; WILKEN, M. S.; HOGQUIST, K. A. Thymic emigration revisited. **The Journal of Experimental Medicine.** v.204, n.11, p.2513–2520, 2007.

MENDES-DA-CRUZ, D. A.; SMANIOTTO, S.; KELLER, A. C.; DARDENNE, M.; SAVINO, W. Multivectorial abnormal cell migration in the NOD mouse thymus. **The Journal of Immunology.** v.180, n.7, p.4639–4647, 2008.

MONTAGNIER, L. & SANDERS, F. K. Replicative form of encephalomyocarditis virus ribonucleic acid. **Nature.** v.199, p.664–667, 1963.

MONTECINO-RODRIQUEZ, E.; MIN, H.; DORSHKIND, K. Reevaluating current models of thymic involution. **Seminars in Immunology.** v.17, n.5, p.356-361, 2005.

MONTICELLI, S.; ANSEL, K. M.; XIAO, C.; SOCCI, N. D.; KRICHEVSKY, A. M.; THAI, T. H.; RAJEWSKY, N.; MARKS, D. S.; SANDER, C.; RAJEWSKY, K.; RAO, A.; KOSIK, K. S. MicroRNA profiling of the murine hematopoietic system. **Genome Biology.** v.6, n.8, p.R71, 2005.

MOORE, D. J.; ZIENKIEWICZ, J.; KENDALL, P. L.; LIU, D.; LIU, X.; VEACH, R. A.; COLLINS, R. D.; HAWIGER, J. In vivo islet protection by a nuclear import inhibitor in a mouse model of type 1 diabetes. **PLoS One.** v.5, n.10, p.e13235, 2010a.

MOORE, K. J.; RAYNER, K. J.; SUÁREZ, Y.; FERNÁNDEZ-HERNANDO, C. MicroRNAs and cholesterol metabolism. **Trends in Endocrinology and Metabolism.** v.21, n.12, p.699-706, 2010b.

NEHLS, M.; KYEWSKI, B.; MESSERLE, M.; WALDSCHÜTZ, R.; SCHÜDDEKOPF, K.; SMITH, A. J.; BOEHM, T. Two genetically separable steps in the differentiation of thymic epithelium. **Science.** v.272, n.5263, p.886-889, 1996.

NEILSON, J. R.; ZHENG, G. X.; BURGE, C. B.; SHARP, P. A. Dynamic regulation of miRNA expression in ordered stages of cellular development. **Genes & Development.** v.21, n.5, p.578–589, 2007.

NITTA, T.; OHIGASHI, I.; NAKAGAWA, Y.; TAKAHAMA, Y. Cytokine crosstalk for thymic medulla formation. **Current Opinion in Immunology.** v.23, n.2, p.190-197, 2011.

OLENA, A. F & PATTON, J. G. Genomic organization of microRNAs. **Journal of Cellular Physiology.** v.222, n.3, p.540-545, 2010.

ONISHI, H.; KAI, M.; ODATE, S.; IWASAKI, H.; MORIFUJI, Y.; OGINO, T.; MORISAKI, T.; NAKASHIMA, Y.; KATANO, M. Hypoxia activates the hedgehog signaling pathway in a ligand-independent manner by upregulation of Smo transcription in pancreatic cancer. **Cancer Science.** v.102, n.6, p.1144-1150, 2011.

OSADA, H. & TAKAHASHI, T. MicroRNAs in biological processes and carcinogenesis. **Carcinogenesis.** v.28, n.1, p.2-12, 2007.

PANDEY, A. K.; AGARWAL, P.; KAUR, K.; DATTA, M. MicroRNAs in diabetes: tiny players in big disease. **Cellular Physiology and Biochemistry.** v.23, n.4-6, p.221-232, 2009.

PARK, N. J.; ZHOU, H.; ELASHOFF, D.; HENSON, B. S.; KASTRATOVIC, D. A.; ABEMAYOR, E.; WONG, D. T. Salivary microRNA: Discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection. **Clinical Cancer Research.** v.15, n.17, p.5473-7, 2009.

PAULEY, K. M & CHAN, E. K. MicroRNAs and their emerging roles in immunology. **Annals of the New York Academy of Sciences.** v.1143, p.226-239, 2008.

PAULEY, K. M & CHA, S. miRNA-146a in rheumatoid arthritis: a new therapeutic strategy. **Immunotherapy.** v.3, n.7, p.829-831, 2011.

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

PAUL, W. E. Fundamental Immunology. 3th Ed. Raven Press Ltd. New York, 1993.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research.** v.29, n.9, p.e45, 2001.

PITKÄNEN, J. & PETERSON, P. Autoimmune regulator: from loss of function to autoimmunity. **Genes & Immunity.** v.4, n.1, p.12-21, 2003.

POY, M. N.; ELIASSON, L.; KRUTZFELDT, J.; KUWAJIMA, S.; MA, X.; MACDONALD, P. E.; PFEFFER, S.; TUSCHL, T.; RAJEWSKY, N.; RORSMAN, P.; STOFFEL, M. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. **Nature.** v.432, n.7014, p.226–230, 2004.

RAJEWSKY, N. MicroRNA target predictions in animals. **Nature Genetics.** v.38, p. S8-13, 2006.

RAMIALISON, M.; MOHR, E.; NAL, B.; SABOUL, T.; CARRIER, A.; TAGETT, R.; GRANJEAUD, S.; NGUYEN, C.; GAUTHERET, D.; JORDAN, B. R.; FERRIER, P. Expression profiling in mouse fetal thymus reveals clusters of coordinately expressed genes that mark individual stages of T-cell ontogeny. **Immunogenetics.** v.54, n.7, p.469-478, 2002.

RAMKISSOON, S. H.; MAINWARING, L. A.; OGASAWARA, Y.; KEYVANFAR, K.; MCCOY, J. P. JR.; SLOAND, E. M.; KAJIGAYA, S.; YOUNG, N. S. Hematopoietic-specific microRNA expression in human cells. **Leukemia Research.** v.30, n.5, p.643–647, 2006.

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, p.63, 2009.

REINHART, B. J.; SLACK, F. J.; BASSON, M.; PASQUINELLI, A. E.; BETTINGER, J. C.; ROUGVIE, A. E.; HORVITZ, H. R.; RUVKUN, G. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. **Nature.** v.403, n.6772, p.901–906, 2000.

REYNIER, F.; PACHOT, A.; PAYE, M.; XU, Q.; TURREL-DAVIN, F.; PETIT, F.; HOT, A.; AUFFRAY, C.; BENDELAC, N.; NICOLINO, M.; MOUGIN, B.; THIVOLET, C. Specific gene expression signature associated with development of autoimmune type-I diabetes using whole-blood microarray analysis. **Genes & Immunity.** v.11, n.3, p.269-278, 2010.

RODEWALD, H. R. Thymus organogenesis. **Annual Review Immunology.** v.26, p.355-388, 2008.

RODRIGUEZ, A.; VIGORITO, E.; CLARE, S.; WARREN, M. V.; COUTTET, P.; SOOND, D. R.; VAN DONGEN, S.; GROCOCK, R. J.; DAS, P. P.; MISKA, E. A.; VETRIE, D.; OKKENHAUG, K.; ENRIGHT, A. J.; DOUGAN, G.; TURNER, M.; BRADLEY, A. Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. **Science.** v.316, n.5824, p.608-611, 2007.

ROMERO, A.; MARTÍN, M.; CHEANG, M. C.; LÓPEZ GARCÍA-ASENJO, J. A.; OLIVA, B.; HE, X.; DE LA HOYA, M.; GARCÍA SÁENZ, J. A.; ARROYO FERNÁNDEZ, M.; DÍAZ RUBIO, E.; PEROU, C. M.; CALDÉS LLOPIS, T. Assessment of Topoisomerase II α status in breast cancer by quantitative PCR, gene expression microarrays, immunohistochemistry, and fluorescence in situ hybridization. **The American Journal of Pathology.** v.178, n.4, p.1453-1460, 2011.

ROSSI, S. W.; JENKINSON, W. E.; ANDERSON, G.; JENKINSON, E. J. Clonal analysis reveals a common progenitor for thymic cortical and medullary epithelium. **Nature.** v.441, n.7096, p.988-991, 2006.

ROSSI, S. W.; KIM, M. Y.; LEIBBRANDT, A.; PARNELL, S. M.; JENKINSON, W. E.; GLANVILLE, S. H.; MCCONNELL, F. M.; SCOTT, H. S.; PENNINGER, J. M.; JENKINSON, E. J.; LANE, P. J.; ANDERSON, G. RANK signals from CD4⁺3– inducer cells regulate development of Aire-expressing epithelial cells in the thymic medulla. **The Journal of Experimental Medicine.** v.204, n.6, p.1267-1272, 2007.

RUIZ-GÓMEZ, A.; MOLNAR, C.; HOLGUÍN, H.; MAYOR, F.; DE CELIS, J. F. The cell biology of Smo signalling and its relationships with GPCRs. **Biochimica et Biophysica Acta.** v.1768, n.4, p.901–912, 2007.

SAETROM, P.; HEALE, B. S.; SNØVE, O. JR.; AAGAARD, L.; ALLUIN, J.; ROSSI, J. J. Distance constraints between microRNA target sites dictate efficacy and cooperativity. **Nucleic Acids Research.** v.35, n.7, p.2333–2342, 2007.

SANDBERG, R.; NEILSON, J. R.; SARMA, A.; SHARP, P. A.; BURGE, C. B. Proliferating cells express mRNAs with shortened 3 untranslated regions and fewer microRNA target sites. **Science.** v.320, n.5883, p.1643-1647, 2008.

SANTAMARIA, P. The long and winding road to understanding and conquering type 1 diabetes. **Immunity.** v.32, n.4, p.437–445, 2010.

SAKAMOTO-HOJO, E. T.; MELLO, S. S.; CARDOSO, R. S.; PASSOS, G. A. S. Utilização de genômica funcional e proteômica em mutagênese (Cap. 12). Mutagênese Ambiental. Ed. ULBRA, 356p, 2003.

SALOMON, B.; LENSCHOW, D. J.; RHEE, L.; ASHOURIAN, N.; SINGH, B.; SHARPE, A.; BLUESTONE, J. A. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. **Immunity.** v.12, n.4, p.431-440, 2000.

SALOMON, B.; RHEE, L.; BOUR-JORDAN, H.; HSIN, H.; MONTAG, A.; SOLIVEN, B.; ARCELLA, J.; GIRVIN, A. M.; PADILLA, J.; MILLER, S. D.; BLUESTONE, J. A. Development of spontaneous autoimmune peripheral polyneuropathy in B7-2-deficient NOD mice. **The Journal of Experimental Medicine.** v.194, n.5, p.677-684, 2001.

SAVINO, W.; AYRES MARTINS, S.; NEVES-DOS-SANTOS, S.; SMANIOTTO, S.; OCAMPO, J. S.; MENDES-DA-CRUZ, D. A.; TERRA-GRANADO, E.; KUSMENOK, O.; VILLA-VERDE, D. M. Thymocyte migration: an affair of multiple cellular interactions? **Brazilian Journal of Medical and Biological Research.** v.36, n.8, p.1015-1025, 2003.

SAVINO, W. The thymus is a common target organ in infectious diseases. **PLoS Pathogens.** v.2, n.6, p.e62, 2006.

SAVINO, W. Intrathymic T cell migration is a multivectorial process under a complex neuroendocrine control. **Neuroimmunomodulation.** v.17, n.3, p.142-145, 2010.

SCHATZ, D. G. & JI, Y. Recombination centres and the orchestration of V(D)J recombination. **Nature Reviews of Immunology.** v.11, n.4, p.251-263, 2011.

SEBASTIANI, G.; VENDRAME, F.; DOTTA, F. MicroRNAs as new tools for exploring type 1 diabetes: relevance for immunomodulation and transplantation therapy. **Transplantation Proceedings.** v.43, n.1, p.330-332, 2011.

SERREZE, D. V.; LEITER, E. H.; CHRISTIANSON, G. J.; GREINER, D.; ROOPENIAN, D. C. Major histocompatibility complex class I-deficient NOD-B2mnull mice are diabetes and insulitis resistant. **Diabetes.** v.43, n.3, p.505–509, 1994.

SEVIGNANI, C.; CALIN, G. A.; SIRACUSA, L. D.; CROCE, C. M. Mammalian microRNAs: a small world for fine-tuning gene expression. **Mammalian Genome.** v.17, n.3, p.189-202, 2006.

SHAMELI, A.; CLEMENTE-CASARES, X.; WANG, J.; SANTAMARIA, P. Development of memory-like autoregulatory CD8⁺ T cells is CD4⁺ T cell dependent. **The Journal of Immunology.** v.187, n.6, p.2859-2866, 2011.

SHANNON, P.; MARKIEL, A.; OZIER, O.; BALIGA, N.; WANG, J.; RAMAGE, D.; AMIN, N.; SCHWIKOWSKI, B.; IDEKER, T. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. **Genome Research.** v.13, n.11, p.2498-2504, 2003.

SHIZURU, J. A.; TAYLOR-EDWARDS, C.; BANKS, B. A.; GREGORY, A. K.; FATHMAN, C. G. Immunotherapy of the nonobese diabetic mouse: treatment with an antibody to T-helper lymphocytes. **Science.** v.240, n.4852, p.659–662, 1988.

SINGH, B. & RABINOVITCH, A. Influence of microbial agents on the development and prevention of autoimmune diabetes. Autoimmunity. 15(3):209-213, 1993.

SINHA, S.; SINGH, R. K.; BHATTACHARYA, N.; MUKHERJEE, N.; GHOSH, S.; ALAM, N.; ROY, A.; ROYCHOUDHURY, S.; PANDA, C. K. Frequent alterations of LOH11CR2A, PIG8 and CHEK1 genes at chromosomal 11q24.1-24.2 region in breast carcinoma: Clinical and prognostic implications. **Molecular Oncology.** v.5, n.5, p.454-464, 2011.

SLACK, F. J.; BASSON, M.; LIU, Z.; AMBROS, V.; HORVITZ, H. R.; RUVKUN, G. The lin-41 RBCC gene acts in the C. elegans heterochronic pathway between the let-7 regulatory RNA and the LIN-29 transcription factor. **Molecular Cell.** v.5, n.4, p.659–669, 2000.

SMITH, E. & SIGVARDSSON, M. The roles of transcription factors in B lymphocyte commitment, development, and transformation. **Journal of Leukocyte Biology.** v.75, n.6, p.973-981, 2004.

SPRENT, J. Central tolerance of T cells. **International Reviews of Immunology.** v.13, n.2, p.95–105, 1995.

SONKOLY, E.; STÅHLE, M.; PIVARCSI, A. MicroRNAs and immunity: novel players in the regulation of normal immune function and inflammation. **Seminars in Cancer Biology.** v.18, n.2, p.131-140, 2008.

SONKOLY, E. & PIVARCSI, A. Advances in microRNAs: implications for immunity and inflammatory diseases. **Journal of Cellular and Molecular Medicine.** v.13, n.1, p.24–38, 2009.

SOSPEDRA, M.; FERRER-FRANCESCH, X.; DOMÍNGUEZ, O.; JUAN, M.; FOZ-SALA, M.; PUJOL-BORRELL, R. Transcription of broad range of self-antigens in human thymus suggests a role for central mechanisms in tolerance toward peripheral antigens. **The Journal of Immunology.** v.161, n.11, p.5918-5929, 1998.

SOUSA CARDOSO, R.; MAGALHÃES, D. A.; BAIÃO, A. M.; JUNTA, C. M.; MACEDO, C.; MARQUES, M. M.; SAKAMOTO-HOJO, E. T.; DONADI, E. A.; PASSOS, G. A. Onset of promiscuous gene expression in murine fetal thymus organ culture. **Immunology.** v.119, n.3, p.369-375, 2006.

SRIVATSAN, S. & PENG, S. L. Cutting edge: Foxj1 protects against autoimmunity and inhibits thymocyte egress. **The Journal of Immunology.** v.175, n.12, p.7805–7809, 2005.

STRATMANN, T.; MARTIN-OROZCO, N.; MALLET-DESIGNE, V.; POIROT, L.; MCGAVERN, D.; LOSYEV, G.; DOBBS, C. M.; OLDSTONE, M. B.; YOSHIDA, K.; KIKUTANI, H.; MATHIS, D.; BENOIST, C.; HASKINS, K.; TEYTON, L. Susceptible MHC alleles, not background genes, select an autoimmune T cell reactivity. **Journal of Clinical Investigation.** v.112, n.6, p.902-914, 2003.

SUMIDA, T.; FURUKAWA, M.; SAKAMOTO, A.; NAMEKAWA, T.; MAEDA, T.; ZIJLSTRA, M.; IWAMOTO, I.; KOIKE, T.; YOSHIDA, S.; TOMIOKA, H.; TANIGUCHI, M. Prevention of insulitis and diabetes in beta 2-microglobulindeficient non-obese diabetic mice. **International Immunology.** v.6, n.9, p.1445–1449, 1994.

SUZUKI, E.; KOBAYASHI, Y.; KAWANO, O.; ENDO, K.; HANEDA, H.; YUKIUE, H.; SASAKI, H.; YANO, M.; MAEDA, M.; FUJII, Y. Expression of AIRE in thymocytes and peripheral lymphocytes. **Autoimmunity.** v.41, n.2, p.133-139, 2008.

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.

TAKEUCHI, O. & AKIRA, S. Pattern recognition receptors and inflammation. **Cell.** v.140, n.6, p.805-820, 2010.

TANG, Y.; LUO, X.; CUI, H.; NI, X.; YUAN, M.; GUO, Y.; HUANG, X.; ZHOU, H.; DE VRIES, N.; TAK, P. P.; CHEN, S.; SHEN, N. MicroRNA-146a contributes to abnormal activation of type I interferon pathway in human lupus by targeting the key signaling protein. **Arthritis & Rheumatism.** v.60, n.4, p.1065-1075, 2009.

TAO, J.; WU, D.; LI, P.; XU, B.; LU, Q.; ZHANG, W. microRNA-18a, a member of the oncogenic miR-17-92 cluster, targets Dicer and suppresses cell proliferation in bladder cancer T24 cells. **Molecular Medicine Reports.** 2011. No prelo.

TARNER, I. H. & FATHMAN, C. G. Gene therapy in autoimmune disease. **Current Opinion in Immunology.** v.13, n.6, p.676-682, 2001.

TSAI, L. M. & YU, D. MicroRNAs in common diseases and potential therapeutic applications. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology.** v.37, n.1, p.102-107, 2010.

VAN EWIJK, W. T-cell differentiation is influenced by thymic microenvironments. **Annual Review of Immunology.** v.9, p.591-615, 1991.

VAN EWIJK, W.; SHORES, E. W.; SINGER, A. Crosstalk in the mouse thymus. **Immunology Today.** v.15, n.5, p.214-217, 1994.

VAN EWIJK, W.; HOLLÄNDER, G.; TERHORST, C.; WANG, B. Stepwise development of thymic microenvironments in vivo is regulated by thymocyte subsets. **Development.** v.127, n.8, p.1583-1591, 2000.

VAN HAL, N. L.; VORST, O.; VAN HOUWELINGEN, A. M.; KOK, E. J.; PEIJNENBURG, A.; AHARONI, A.; VAN TUNEN, A. J.; KEIJER, J. The application of DNA microarrays in gene expression analysis. **Journal of Biotechnology.** v.78, n.3, p.271-280, 2000.

VELLA, M. C.; CHOI, E. Y.; LIN, S.Y.; REINERT, K.; SLACK, F. J. The C. elegans microRNA let-7 binds to imperfect let-7 complementary sites from the lin-41 3'UTR. **Genes & Development.** v.18, n.2, p.132–137, 2004.

VILLA-VERDE, D. M.; MELLO-COELHO, V.; LAGROTA-CÂNDIDO, J. M.; CHAMMAS, R.; SAVINO, W. The thymic nurse cell complex: an in vitro model for extracellular matrix-mediated intrathymic T cell migration. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research.** v.28, n.8, p.907-912, 1995.

VIRET, C.; LEUNG-THEUNG-LONG, S.; SERRE, L.; LAMARE, C.; VIGNALI, D. A.; MALISSEN, B.; CARRIER, A.; GUERDER, S. Thymus-specific serine protease controls autoreactive CD4 T cell development and autoimmune diabetes in mice. **Journal of Clinical Investigation.** v.121, n.5, p.1810-1821, 2011.

VON HERRATH, M.; SANDA, S.; HEROLD, K. Type 1 diabetes as a relapsingremitting disease? **Nature Reviews Immunology.** v.7, n.12, p.988-994, 2007.

WANG, B.; GONZALEZ, A.; BENOIST, C.; MATHIS, D. The role of CD8⁺ T cells in the initiation of insulin-dependent diabetes mellitus. **European Journal of Immunology**. v.26, n.8, p.1762–1769, 1996.

WANG, J. F.; YU, M. L.; YU, G.; BIAN, J. J.; DENG, X. M.; WAN, X. J.; ZHU, K. M. Serum miR-146a and miR-223 as potential new biomarkers for sepsis. **Biochemical and Biophysical Research Communications.** v.394, n.1, p.184-188, 2010.

WANG, Y.; JOSHI, T.; ZHANG, X. S.; XU, D.; CHEN, L. Inferring gene regulatory networks from multiple microarray datasets. **Bioinformatics.** v.22, n.19, p.2413-2420, 2006.

WARNER, S. L.; STEPHENS, B. J.; NWOKENKWO, S.; HOSTETTER, G.; SUGENG, A.; HIDALGO, M.; TRENT, J. M.; HAN, H.; VON HOFF, D. D. Validation of TPX2 as a potential therapeutic target in pancreatic cancer cells. **Clinical Cancer Research.** v.15, n.21, p.6519-6528, 2009.

WESSNER, B.; GRYADUNOV-MASUTTI, L.; TSCHAN, H.; BACHL, N.; ROTH, E. Is there a role for microRNAs in exercise immunology? A synopsis of current literature and future developments. **Exercise Immunology Review.** v.16, p.22-39, 2010.

WHITNEY, L. W. & BECKER, K. G. Radioactive 33-P probes in hybridization to glass cDNA microarrays using neural tissues. **Journal of Neuroscience Methods.** v.106, n.1, p.9-13, 2001.

WICKER, L. S.; LEITER, E. H.; TODD, J. A.; RENJILIAN, R. J.; PETERSON, E.; FISCHER, P. A.; PODOLIN, P. L.; ZIJLSTRA, M.; JAENISCH, R.; PETERSON, L. B. Beta 2-microglobulin-deficient NOD mice do not develop insulitis or diabetes. **Diabetes.** v.43, n.3, p.500–504, 1994.

WINTER, J.; JUNG, S.; KELLER, S.; GREGORY, R. I.; DIEDERICHS, S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. **Nature Cell Biology.** v.11, n.3, p.228–234, 2009.

WONG, F. S.; VISINTIN, I.; WEN, L.; GRANATA, J.; FLAVELL, R.; JANEWAY, C. A. The role of lymphocyte subsets in accelerated diabetes in non-obese diabetic rat insulin promoter-B7-1 (NOD-RIP-B7-1) mice. **The Journal of Experimental Medicine.** v.187, n.12, p.1985–1993, 1998.

WU, H.; NEILSON, J. R.; KUMAR, P.; MANOCHA, M.; SHANKAR, P.; SHARP, P. A.; MANJUNATH, N. miRNA profiling of naïve, effector and memory CD8 T cells. **PLoS ONE.** v.2, n.10, p.e1020, 2007.

XIANG, C. C. & CHEN, Y. cDNA microarray technology and its applications. **Biotechnology Advances.** v.18, n.1, p.35-46, 2000.

XUE, Q.; GUO, Z. Y.; LI, W.; WEN, W. H.; MENG, Y. L.; JIA, L. T.; WANG, J.; YAO, L. B.; JIN, B. Q.; WANG, T.; YANG, A. G. Human activated $CD4(^{+})$ T lymphocytes increase IL-2 expression by downregulating microRNA-181c. **Molecular Immunology.** v.48, n.4, p.592-599, 2011.

YE, S. Q.; USHER, D. C.; ZHANG, L. Q. Gene expression profiling of human diseases by serial analysis of gene expression. **Journal of Biomedical Science**. v.9, n.5, p.384-394, 2002.

ZAMISCH, M.; MOORE-SCOTT, B.; SU, D. M.; LUCAS, P. J.; MANLEY, N.; RICHIE, E. R. Ontogeny and regulation of IL-7-expressing thymic epithelial cells. **The Journal of Immunology.** v.174, n.1, p.60-67, 2005.

ZARAGOSI, L. E.; WDZIEKONSKI, B.; BRIGAND, K. L.; VILLAGEOIS, P.; MARI, B.; WALDMANN, R.; DANI, C.; BARBRY, P. Small RNA sequencing reveals miR-642a-3p as a novel adipocyte-specific microRNA and miR-30 as a key regulator of human adipogenesis. **Genome Biology.** v.12, n.7, p.R64, 2011.

ZHANG, J.; YANG, B.; YING, B.; LI, D.; SHI, Y.; SONG, X.; CAI, B.; HUANG, Z.; WU, Y.; WANG, L. Association of pre-microRNAs genetic variants with susceptibility in systemic lupus erythematosus. **Molecular Biology Reports.** v.38, n.3, p.1463-1468, 2011.

ZHAO, T.; LI, G.; MI, S.; LI, S.; HANNON, G. J.; WANG, X. J.; QI, Y. A complex system of small RNAs in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. **Genes & Development.** v.21, n.10, p.1190–1203, 2007.

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, n.3, p.385-396, 2005.

ZUKLYS, S.; BALCIUNAITE, G.; AGARWAL, A.; FASLER-KAN, E.; PALMER, E.; HOLLÄNDER, G. A. Normal thymic architecture and negative selection are associated with Aire expression, the gene defective in the autoimmune-polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED). **The Journal of Immunology.** v.165, n.4, p.1976-1983, 2000.

Súmula Curricular

CURRICULUM VITAE (Outubro 2011)

Thaís Arouca Fornari Bióloga E-mail: thaisfornari@rge.fmrp.usp.usp.br thaisfornari@yahoo.com.br

DADOS PESSOAIS:

Nome: Thaís Arouca Fornari Endereço: Rua Lafaiete, 898 ap 074 – Centro. Ribeirão Preto - SP CEP: 14015-080 Fone: (16) 8148-9147/ (11) 7156-1111/ (35) 5321-8846 Filiação: Francisco Antonio Fornari e Rosane Maria Peres Arouca Fornari Nacionalidade: Brasileira Data de Nascimento: 23/06/1979 Passos - MG, Brasil. Estado Civil: solteira

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO:

Carteira de identidade: MG-10.926.433, SSPMG – 03/09/1996 Cadastramento de pessoa física: 039.372.786-64 Título de eleitor: 1308724502/81

FUNÇÃO ATUAL

Doutorado: Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, Campus de Ribeirão Preto, com bolsa de pesquisa CNPq (141463/2008-2). Área de concentração: **Genética**.

ESCOLARIDADE

Doutor em Ciências (em andamento) pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Área de concentração: Genética. Sub-área: Imunogenética Molecular – Projeto de Doutorado: *Avaliação do papel dos microRNAs no controle póstranscricional de timócitos e de linfócitos periféricos de camundongos NOD (Non Obese Diabetic).* **Mestre em Ciências** pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Área de concentração: Genética. Sub-área: Imunogenética Molecular – Dissertação: *Análise da expressão gênica promíscua no timo de camundongos NOD (non obese diabetic) durante a emergência do Diabetes mellitus tipo 1.* Período de 2006 a 2008 – Diploma Registrado sob N^O 083947, processo 2008.5.282.17.7.

Licenciada em Ciências Biológicas pela Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (USP), no período de 2001 a 2005 – Diploma Registrado sob N^o 1409472, processo 2005.1.1325.59.7.

CURSOS DE EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA

- ✓ "Difusão: Radioproteção para uso, preparo e manuseio de fontes radioativas", realizado na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, no período de 27 de novembro a 08 de dezembro de 2006, com carga horária de 50 horas.
- ✓ "From Statistical Tools to Different Analisys Methods Apllied to Transcriptome Studies", INSERM Research Beatrice Loriod e Geneviève Victorero – Marseille, França, realizado pelo Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, no período de 05 a 09 de junho de 2006, com carga horária total de 20 horas.
- ✓ "Aconselhamento Genético do Câncer", no Workshop realizado pelo Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP e Hospital das Clínicas - FMRP nos dias 05 e 06 de maio de 2005, com carga horária de 12 horas.
- ✓ "Genoma, Proteoma e o Universo Celular", realizado no Curso de Férias no Hemocentro de Ribeirão Preto – USP, de 19 a 30 de janeiro de 2004, com carga horária de 80 horas.
- ✓ "Polimorfismos de DNA, identificação individual e de populações", realizado durante a XXIX Semana de Bio-estudos na FFCLRP-USP, de 13 a 17 de agosto de 2001, com carga horária de 20 horas.

ESTÁGIOS

 Laboratório de Imunogenética Molecular do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP – sob orientação do Prof. Dr. Geraldo A.S. Passos, no período de fevereiro de 2005 a dezembro de 2005.

• Laboratório de Cultura Celular do Centro de Terapia Celular do Hemocentro de Ribeirão Preto da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP – sob orientação da Profa. Dra. Aparecida Maria Fontes, no período de dezembro de 2003 a novembro de 2004.

• Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP – sob orientação do Prof. Dr. Jorge Cury de Almeida, no período de outubro de 2001 a agosto de 2002.

MONITORIAS E AULAS PRÁTICAS

1) Instituição: FMRP-USP

IV Curso de Inverno de Imunologia: Departamento de Imunologia Básica e Aplicada

Data: 25 a 29 de julho de 2011.

Monitoria de Estágio no Laboratório de Imunogenética Molecular.

2) Instituição: FMRP-USP

III Curso de Inverno de Imunologia: Departamento de Imunologia Básica e Aplicada

Data: 26 a 30 de julho de 2010.

Monitoria de Estágio no Laboratório de Imunogenética Molecular.

3) Instituição: FMRP-USP

II Curso de Inverno de Imunologia: Departamento de Imunologia Básica e Aplicada

Data: 13 a 17 de julho de 2009.

Monitoria de Estágio no Laboratório de Imunogenética Molecular.

4) Instituição: FMRP-USP

XIV Curso de Verão em Genética: Departamento de Genética (graduação)

Data: 19 a 30 de janeiro de 2009.

Monitoria de Estágio no Laboratório de Imunogenética Molecular.

5) Instituição: FMRP-USP

Análise da Expressão Gênica por Microarrays realizado pela Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental (SBMCTA): Departamento de Genética

Data: 08 a 11 de dezembro de 2008.

Aula prática: "A metodologia de microarrays" no Laboratório de Imunogenética Molecular.

6) Instituição: FMRP-USP

XIII Curso de Verão em Genética: Departamento de Genética (graduação) Data: 14 a 25 de janeiro de 2008.

Aula teórico-prática e monitoria no Laboratório de Imunogenética Molecular.

7) Instituição: FMRP-USP

XII Curso de Verão em Genética: Departamento de Genética (graduação) Data: 22 de janeiro a 02 de fevereiro de 2007.

Aula teórico-prática no Laboratório de Imunogenética Molecular.

8) Instituição: FFCLRP-USP
Disciplina "Biologia Celular" – Departamento de Biologia (graduação)
Data: 1º sementre de 2002.
Monitora Voluntária de Estágio teórico-prático.

PALESTRAS E MINI-CURSOS PROFERIDOS

- Palestra intitulada "Utilização das técnicas de cDNA microarray para a definição de assinaturas de expressão gênica do sistema imune" apresentada durante o XV Curso de Verão em Genética no Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP realizada no período de 18 a 29 de janeiro de 2010.
- Mini-Curso intitulado "Microarrays", durante a IV Semana da Informática Biomédica organizada pelo Centro Estudantil da Informática Biomédica em parceria com o Departamento de Física e Matemática da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP realizada no período de 23 a 27 de outubro de 2006.
- Palestra intitulada "Microarray: Câncer e Autoimunidade" apresentada durante a III Semana de Ciência e Tecnologia no Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP realizada no período de 16 a 20 de outubro de 2006.

EXPERIÊNCIA DIDÁTICA

Estágio de Licenciatura com carga horária de 360 horas distribuídos em colégios de Ensino Fundamental e Médio, da rede pública de ensino de Ribeirão Preto, São Paulo, com aplicações práticas das teorias dos Cursos de Graduação: "Didática I e II", "Programação de Curso", "Prática de Ensino em Ciências" e "Prática de Ensino em Biologia".

PRODUÇÃO CIENTÍFICA

A) APRESENTAÇÃO DE TRABALHOS

1) **Fornari TA**; Donate PB; Macedo C; Donadi EA; Sakamoto-Hojo ET; Passos GAS. Development of type 1 Diabetes mellitus (T1D) in NOD mice is characterized by distinct transcriptional profiling of T lymphocytes. I Workshop de Imunologia nos dias 26 e 27 de novembro de 2010, Ribeirão Preto.

2) Dernowsek JA; Macedo C; **Fornari TA**; Passos-Bueno MR; Passos GA. Identification of microRNA-mRNA associations occuring during osteoblast differentiation of human mesenchymal stem cells. I Workshop de Imunologia nos dias 26 e 27 de novembro de 2010, Ribeirão Preto.

3) Donate PB; **Fornari TA**; Magalhães DA; Marques MMC; Cunha T; Cunha FQ; Passos GAS. Post-transcriptional regulation in autoimmunity: expression of microRNAs by T cells during immunization of DBA mice with collagen: a model-system of susceptibility/resistance to rheumatoid arthritis. VII Workshop de Imunologia no período de 09 a 11 de julho de 2008, Ribeirão Preto.

4) Donate PB; **Fornari TA**; Cunha T; Cunha FQ; Passos GAS. Analysis of promiscuous gene expression in the thymus of DBA-1 and DBA-2 mice during immunization with collagen: a model-system to study susceptibility/resistance to rheumatoid arthritis. VI Workshop de Imunologia no período de 02 a 04 de agosto de 2006, Ribeirão Preto.

B) TRABALHOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS (COMPLETO)

1) **Fornari TA**, Marques MM, Nguyen C, Carrier A, Passos GA. Transcription profiling of Prss16 (Tssp) can be used to find additional peptidase genes that are candidates for self-peptide generation in the thymus. Molecular Biology Reports, Epub ahead of print. 2011

2) **Fornari TA**, Donate PB, Macedo C, Sakamoto-Hojo ET, Donadi EA, Passos GA. Development of type 1 diabetes mellitus in nonobese diabetic mice follows changes in thymocyte and peripheral T lymphocyte transcriptional activity. Clinical & Developmental Immunology 2011:158735.

3) Donate PB, **Fornari TA**, Junta CM, Magalhães DA, Macedo C, Cunha TM, Nguyen C, Cunha FQ, Passos GA. Collagen induced arthritis (CIA) in mice features regulatory transcriptional network connecting major histocompatibility complex (MHC H2) with autoantigen genes in the thymus. Immunobiology (Jena. 1979), v.216(5), p.591 - 603, 2011.

4) **Fornari TA**, Donate PB, Macedo C, Marques MMC, Magalhães DA, Passos GA. 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(1-2), p.21 - 28, 2010.

5) Macedo C, Evangelista AF, Magalhães DA, **Fornari TA**, Linhares LL, Junta CM, Silva GL, Sakamoto-Hojo ET, Donadi EA, Savino W, Passos GA. Evidence for a network transcriptional control of promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells. Molecular Immunology, v.46(16), p.3240 - 3244, 2009.

C) TRABALHOS PUBLICADOS EM ANAIS (RESUMOS) EM CONGRESSOS NO BRASIL

1) Donate PB; **Fornari TA**; Macedo C; Cunha T; Cunha FQ; Passos GAS. Differentially expressed microRNAs in T cells might contribute to the resistance/susceptibility in collagen induced arthritis (CIA) in mice. *In:* XXXVI Congress of the Brazilian Society for Immunology, IV ESCI – Extra Section of Clinical Immunology, Effector Immune Responses and viral Immunity, no período de 15 a 19 de outubro de 2011, Foz do Iguaçu - PR.

2) Macedo C; Oliveira EH; Almeida RS; Donate PB; **Fornari TA**; Sakamoto-Hojo ET; Donadi EA; Passos GAS. Participation of micro-rnas in the post-transcriptional control of tissue specific antigens in medullary thymic epithelial cells of nod mice. *In:* XXXVI Congress of the Brazilian Society for Immunology, IV ESCI – Extra Section of Clinical Immunology, Effector Immune Responses and viral Immunity, no período de 15 a 19 de outubro de 2011, Foz do Iguaçu - PR.

3) Almeida RS; Macedo C; **Fornari TA**; Evangelista AF; Sakamoto-Hojo ET; Donadi EA; Passos GAS. Comparative analysis of human-mouse gene expression focusing on type 1 diabetes susceptibility regions. 57° Congresso Brasileiro de Genética no período de 30 de agosto a 02 de setembro de 2011, Águas de Lindóia - SP. 4) **Fornari TA**; Donate PB; Macedo C; Donadi EA; Sakamoto-Hojo ET; Passos GAS. Distinct transcription profiling of T lymphocytes characterize the development of type 1 Diabetes mellitus (T1D) in NOD mice. XXXV Congress of the Brazilian Society for Immunology / III Extra Section of Clinical Immunology, no período de 03 a 06 de novembro de 2010, Porto Alegre - RS.

5) Donate PB; **Fornari TA**; Macedo C; Cunha T; Cunha FQ; Passos GAS. Thymocyte signaling cascade mRNAs are differentially expressed between DBA-1/J and DBA-2/J mouse strains as a result from post-transcriptional regulation by microRNAs. XXXV Congress of the Brazilian Society for Immunology / III Extra Section of Clinical Immunology, no período de 03 a 06 de novembro de 2010, Porto Alegre - RS.

6) Macedo C; Evangelista AF; **Fornari TA**; Donate PB; Dernowsek JA; Sakamoto-Hojo ET; Donadi EA; Savino W; Passos GAS. Promiscuous Gene Expression in medullary thymic epithelial cells is synergistically controlled by Aire and microRNAs. XXXV Congress of the Brazilian Society for Immunology / III Extra Section of Clinical Immunology, no período de 03 a 06 de novembro de 2010, Porto Alegre - RS.

7) Macedo C; Adorni F; **Fornari TA**; Donate PB; Silva S; Felipe MS; Calich V; Savino W; Passos GAS. The mouse thymic stroma expresses autoantigen mRNAs that cross-hybridize with *Paracoccidioides brasiliensis* cDNAs. XXXV Congress of the Brazilian Society for Immunology / III Extra Section of Clinical Immunology, no período de 03 a 06 de novembro de 2010, Porto Alegre - RS.

8) Rostock ACM; Macedo C; **Fornari TA**; Donate PB; Evangelista AF; Passos GAS. Aire transcription factor may control the expression of tumor antigen genes in medullary thymic epithelial cells (mTECs). XXXV Congress of the Brazilian Society for Immunology / III Extra Section of Clinical Immunology, no período de 03 a 06 de novembro de 2010, Porto Alegre - RS.

9) **Fornari TA**; Donate PB; Macedo C; Marques MMC; Magalhães DAR; Passos GAS. Deregulation of promiscuous gene expression in the thymus of NOD (non obese diabetic) mice is associated to the development of type 1 Diabetes mellitus. XXXIII Congress of the Brazilian Society for Immunology / II Extra Section of Clinical Immunology, no período de 18 a 22 de outubro de 2008, Ribeirão Preto - SP.

10) Donate PB; **Fornari TA**; Marques MMC; Magalhães DAR; Macedo C; Cunha T; Cunha FQ; Passos GAS. Altered promiscuous gene expression in the thymus during collagen induced arthritis in DBA-1/J and DBA-2/J strains correlates with evolution of autoimmunity. XXXIII Congress of the Brazilian Society for Immunology / II Extra Section of Clinical Immunology, no período de 18 a 22 de outubro de 2008, Ribeirão Preto - SP.

11) Macedo C; **Fornari TA**; Magalhães DAR; Junta CM; Silva GL; Linhares LL; Savino S; Sakamoto-Hojo ET; Donadi EA; Nguyen C; Passos GAS;. Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells is connected in network where the Aire gene is an upstream modulator. XXXIII Congress of the Brazilian Society for Immunology / II Extra Section of Clinical Immunology, no período de 18 a 22 de outubro de 2008, Ribeirão Preto - SP.

12) Rassi DM; Junta CM; Magalhães DA; Silva GL; Evangelista AF; Donate PB; Fornari TA; Wastowski IJ; Crispim JO; Martelli-Palomino G; Fernandes APM; Foss-Freitas MC; Deghaide NNHS; Foss MC; Soares CP; Sakamoto-Hojo ET; EA. Passos GAS: Donadi Modulated immune system aenes in lymphomononuclears cells of recently diagnosed type 1 Diabetes mellitus patients. XXXIII Congress of the Brazilian Society for Immunology / II Extra Section of Clinical Immunology, no período de 18 a 22 de outubro de 2008, Ribeirão Preto -SP.

13) **Fornari TA**; Donate PB; Marques MMC; Macedo C; Magalhães DAR; Passos GAS. Promiscuous gene expression in the thymus of NOD (non obese diabetic) mice during onset of type 1 diabetes mellitus (DM-1). 54° Congresso Brasileiro de Genética no período de 16 a 19 de setembro de 2008, Salvador - BA.

14) **Fornari TA**; Donate PB; Marques MMC; Junta CM; Passos GAS. Failure of the promiscuous gene expression in the thymus of NOD (non obese diabetic) mice is followed by onset of type 1 diabetes mellitus (DM-1). 53° Congresso Brasileiro de Genética no período de 02 a 05 de setembro de 2007, Águas de Lindóia - SP.

15) Donate PB; **Fornari TA**; Marques MMC; Junta CM; Cunha T; Cunha FQ; Passos GAS. Repression of genes coding for extracellular matrix specific antigens in the thymus may be a cause of the rheumatoid arthritis. 53° Congresso Brasileiro de Genética no período de 02 a 05 de setembro de 2007, Águas de Lindóia - SP.

16) Donate PB; **Fornari TA**; Marques MMC; Junta CM; Cunha T; Cunha FQ; Passos GAS. Modulation of genes characterizing locomotory system in the thymus may be associated to rheumatoid arthritis susceptibility/resistance in mice. 13th International Congress of Immunology no período de 21 a 25 de agosto de 2007, Rio de Janeiro - RJ.

D) TRABALHOS PUBLICADOS EM CONGRESSOS E/OU REUNIÕES CIENTÍFICAS NO EXTERIOR

1) **Fornari TA**; Donate PB; Macedo C; Sakamoto-Hojo ET; Donadi EA; Passos GAS. The transcriptional modulation involving mRNAS and microRNAs during development of T cells is associated with the emergence of type 1 Diabetes mellitus in NOD mice. *In:* 47th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes (EASD), no período de 12 a 16 de setembro de 2011, Lisboa, Portugal.

2) Passos GA; Macedo C; Evangelista AF; **Fornari TA**; Sakamoto-Hojo ET; Donadi EA; Linhares LL; Savino W. Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells is under network regulation involving Aire and microRNA-mRNA interactions. *In:* 14th International Congress of Immunology, no período de 22 a 27 de agosto de 2010, Kobe, Japão.

3) Macedo C; **Fornari TA**; Evangelista AF; Magalhães DAR; Junta CM; Silva GL; Linhares LL; Savino W; Sakamoto-Hojo ET; Donadi EA; Nguyen C; Passos GAS. Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells is connected in network where the Aire gene is an upstream modulator. *In:* 2nd European Congress of Immunology, no período de 13 a 16 de setembro de 2009, Berlim, Alemanha.

4) Macedo C; Magalhães DAR; **Fornari TA**; Junta CM; Silva GL; Linhares LL; Savino W; Sakamoto-Hojo ET; Donadi EA; Passos GAS. Evidence for a network post-transcriptional control of promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells. *In:* Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology: MicroRNA and Cancer, no período de 10 a 15 de junho de 2009, Keystone, Colorado, USA.

MENÇÃO HONROSA

Menção Honrosa concedido pela participação no Prêmio Pós-Graduação com o trabalho intitulado: Repression of genes coding for extracellular matrix specific antigens in the thymus may be a cause of the rheumatoid arthritis autoria de Donate PB; **Fornari TA**; Marques MMC; Junta CM; Cunha T; Cunha FQ; Passos GAS apresentado durante o 53° Congresso Brasileiro de Genética no período de 02 a 05 de setembro de 2007, Águas de Lindóia - SP.

RELATOR DE TRABALHOS

 Atuação como avaliadora na área de Genética, no 18° SIICUSP- Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo- Áreas Ciências Biológicas, realizado no Centro de Convenções de Ribeirão Preto nos dias 17 e 18 de novembro de 2010.

- Atuação como debatedora na área de Genética, no 17° SIICUSP- Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo- Áreas Ciências Biológicas, realizado no Centro de Convenções de Ribeirão Preto nos dias 10 e 11 de novembro de 2009.
- Atuação como avaliadora na área de Genética, no 14° SIICUSP- Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo- Áreas Ciências Biológicas, realizado no Centro de Convenções de Ribeirão Preto nos dias 13 e 14 de novembro de 2006.

PARTICIPAÇÃO EM CONGRESSOS E REUNIÕES CIENTÍFICAS NO BRASIL

- V Seminário sobre Rotas Tecnológicas da Biotecnologia realizado pela FIPASE, no período de 06 a 08 de junho de 2011.
- I Workshop do Programa de Pós-graduação em Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, nos dias 26 e 27 de novembro de 2010.
- Seminário: Soluções avançadas para separação, enriquecimento e depleção celular, realizado pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, no dia 24 de maio de 2010.
- VII Workshop de Imunologia, realizado pelo Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, no período de 09 a 11 de julho de 2008.
- XXXIII Congress of the Brazilian Society for Immunology / II Extra Section of Clinical Immunology, realizado pelo Departamento de Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, no período de 18 a 22 de outubro de 2008.
- Palestra Técnica: "Microarray como ferramenta para análise de expressão gênica, alterações cromossômicas, microRNA", realizado no 54º Congresso Brasileiro de Genética em Salvador - BA no dia 18 de setembro de 2008.
- 54º Congresso Brasileiro de Genética, realizado em Salvador BA no período de 16 a 19 de setembro de 2008.

- Il Fórum Regional de Ética em Pesquisa e Experimentação Animal, realizado no Centro Universitário Barão de Mauá em Ribeirão Preto - SP nos dias 12 e 13 de maio de 2008.
- 53º Congresso Brasileiro de Genética, realizado em Águas de Lindóia SP no período de 02 a 05 de setembro de 2007.
- 52º Congresso Brasileiro de Genética, realizado em Foz do Iguaçu PR no período de 03 a 06 de setembro de 2006.
- VI Workshop de Imunologia, realizado pelo Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, no período de 02 a 04 de agosto de 2006.
- 4º Simpósio sobre Ética no Uso de Animais, realizado em Ribeirão Preto-SP, no Espaço Cultural do *Campus* nos dias 27 e 28 de abril de 2006.
- I Simpósio Satélite da Regional de São Paulo, realizado em Ribeirão Preto- SP, no Anfiteatro do COC no dia 07 de abril de 2006.
- 51º Congresso Brasileiro de Genética, realizado em Águas de Lindóia SP no período de 07 a 10 de setembro de 2005.
- VI Simpósio Nacional de Biologia Molecular Aplicada à Medicina, realizado em Santos - SP nos dias 08 e 09 de abril de 2005.

PARTICIPAÇÃO EM CONGRESSOS NO EXTERIOR

 47th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes (EASD), no período de 12 a 16 de setembro de 2011, Lisboa, Portugal.

BOLSAS DE ESTUDO

• Bolsa de Mestrado concedida pela FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), para o desenvolvimento do projeto: *Perfis de Expressão Gênica Promíscua no Timo de Camundongos NOD (Non Obese Diabetic) durante a emergência do Diabetes melittus Tipo 1 (DM-1)* (Processo 05/57231 - 8), sob a orientação do Prof. Dr. Geraldo A. S. Passos.

• **Bolsa de Doutorado** concedida pelo CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) na área de Genética, para o desenvolvimento do projeto: *Avaliação do papel dos microRNAs no controle pós-transcricional de timócitos e de linfócitos periféricos de camundongos NOD (Non Obese Diabetic)* (Processo 141463/2008-2), sob a orientação do Prof. Dr. Geraldo A. S. Passos.

Thaís Arouca Fornari



Publicações resultantes do assunto desta Tese

Hindawi Publishing Corporation Clinical and Developmental Immunology Volume 2011, Article ID 158735, 12 pages doi:10.1155/2011/158735

Research Article

Development of Type 1 Diabetes Mellitus in Nonobese Diabetic Mice Follows Changes in Thymocyte and Peripheral T Lymphocyte Transcriptional Activity

Thais A. Fornari,¹ Paula B. Donate,¹ Claudia Macedo,¹ Elza T. Sakamoto-Hojo,^{1, 2} Eduardo A. Donadi,^{1, 3} and Geraldo A. Passos^{1, 4}

¹ Molecular Immunogenetics Group, Department of Genetics, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo (USP), 14040-900, School Ribeirão Preto, SP, Brazil

² Department of Biology, School of Philosophy, Science and Letters of Ribeirão Preto, USP, 14040-900 Ribeirão Preto, SP, Brazil
³ Department of Clinical Medicine, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, USP, 14040-900, Ribeirão Preto, SP, Brazil

⁴Disciplines of Genetics and Molecular Biology, Department of Morphology (DMEF), School of Dentistry of Ribeirão Preto, USP, 14040-900 Ribeirão Preto, SP, Brazil

Correspondence should be addressed to Geraldo A. Passos, passos@rge.fmrp.usp.br

Received 13 January 2011; Revised 21 March 2011; Accepted 22 March 2011

Academic Editor: Vincent Geenen

Copyright © 2011 Thais A. Fornari et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

As early as one month of age, nonobese diabetic (NOD) mice feature pancreatic infiltration of autoreactive T lymphocytes, which destruct insulin-producing beta cells, producing autoimmune diabetes mellitus (T1D) within eight months. Thus, we hypothesized that during the development of T1D, the transcriptional modulation of immune reactivity genes may occur as thymocytes mature into peripheral T lymphocytes. The transcriptome of thymocytes and peripheral CD3⁺ T lymphocytes from prediabetic or diabetic mice analyzed through microarray hybridizations identified 2,771 differentially expressed genes. Hierarchical clustering grouped mice according to age/T1D onset and genes according to their transcription profiling. The transcriptional activity of thymocytes feedpoing into peripheral T lymphocytes revealed sequential participation of genes involved with CD4⁺/CD8⁺ T-cell differentiation (Themis), tolerance induction by Tregs (Foxp3), and apoptosis (Fasl) soon after T-cell activation (IL4), while the emergence of T1D coincided with the expression of cytotoxicity (Crtam) and inflammatory response genes (Tlr) by peripheral T lymphocytes.

1. Introduction

Type 1 diabetes (T1D) is an autoimmune disease that results in the destruction of pancreatic insulin-producing beta cells [1, 2]. This destruction is a progressive process that occurs over five to eight months in the nonobese diabetic (NOD) mouse or several years in human patients [3]. The early stages of T1D pathogenesis are characterized by insulitis, an inflammation of the beta cells of the pancreas caused by lymphocyte infiltration. Nevertheless, the molecular genetics regulating the progress of beta cell failure and factors determining time of presentation of clinical diabetes are still poorly understood. The NOD mouse is an autoimmune mouse strain and is a primary animal model used to dissect the mechanisms of lack of immune tolerance and autoimmune T1D, which reflects at least a part of human T1D [4–6]. The most important genetic determinants in susceptibility to diabetes lie in the major histocompatibility complex (MHC). Within the MHC locus, the class II molecules DQ8 and DQ2 in humans and the mouse homologue I-Ag⁷ in the NOD mouse are thought to be particularly crucial [7]. In addition, many other genes have been identified that contribute to the development of diabetes in the NOD mouse [8].

In this murine strain, it is now clear that both the $\rm CD4^+$ and $\rm CD8^+$ subsets of T-cells play a role in the development of





FIGURE 1: Fluorescent-activated cell sorting (FACS) analysis of thymocytes (approx. 93% purity) (a) and of peripheral CD3⁺ T lymphocytes (approx. 87% purity).

disease. Diabetes does not occur in the absence of CD4⁺ cells, as shown by studies using anti-CD4 antibodies [9] as well as in mice that lack CD4⁺ T-cells [10], mice that are deficient in CD8⁺ cells, either by anti-CD8 antibody injection into young mice [11], or mice in which few CD8⁺ T-cells develop because of a genetic lack of Beta-2 microglobulin [12–14]. These findings support the idea that T1D is a function of the action of autoreactive CD3⁺ T-cells that feature either a CD4⁺ or CD8⁺ phenotype.

2

The BDC2.5 line, which derives from a CD4⁺ T-cell clone that is restricted by the NOD MHC class II A^{g7} molecule and specific for an unknown beta cell protein [15, 16], has been instrumental in the elucidation of several features of the immunoregulatory genes or cells that control the aggressively autoreactive T-cells in the periphery [17–20].

The differentiation into cytotoxic effector cells is the major function of CD8⁺ T-cells, which are able to recognize antigenic peptides in the context of MHC class I molecules. These peptides are produced through the endogenous antigen presenting pathways, though evidence suggests that exogenous antigens are also presented by MHC class I molecules [21, 22].

The thymus exerts an important role in controlling autoreactive T-cells. An extremely diverse repertoire of Tcells is generated through the random rearrangement of Tcell receptor (TCR) gene segments. This random process generates autoreactive T-cells that are eventually eliminated through negative selection, which occurs in the medullar compartment of the thymic stroma in close association with the medullary thymic epithelial cells (mTECs). The negative selection plays an essential role in preventing pathogenic autoimmune reactions and/or autoimmune diseases.

The mTECs are essentially self-antigen-presenting cells. These cells express most of the parenchymal organs' selfantigens, a phenomenon that has been termed promiscuous gene expression (PGE) [23, 24]. Thymocytes are in close interaction with mTECs, establishing the thymic cross-talk. In fact, the self-antigens are coded from peripheral tissue antigen (PTA) genes. The translated PTAs are trimmed into peptides that are presented to thymocytes by means of the MHC. Dendritic cells also participate in the negative selection process after they have acquired PTA peptides from mTECs [23, 25–31].

Thymocyte clones that recognize self-peptide antigens during the cross-talk phase trigger a death gene expression cascade and die by apoptosis. Accordingly, the escaping autoreactive thymocytes from negative selection may cause severe aggressive reactions in the peripheral tissues and/or organs, provoking aggressive autoimmunity/autoimmune diseases. Thus, an imbalance in the central tolerance may have important consequences in the pathogenesis of autoimmune diseases, including T1D.

The central tolerance imbalance may explain, at least in part, the results of early studies using anti-CD3 antibodies; the results indicated that T1D in the NOD mouse is a T-cellmediated disease [32].

We considered the following factors in our experiment: (1) peripheral T-cells represent the primary effectors in T1D autoreactivity in NOD mice; (2) the role played by autoreactive T-cells in the periphery may be a consequence of failure of the negative selection in the thymus; (3) the autoreactive phenotype of these cells may be a direct consequence of their transcriptional activity. Thus, our interest in this study was to analyze the transcriptome profile of thymocytes and peripheral CD3⁺ lymphocytes in the course of T1D in NOD mice to elucidate the sequential participation of genes associated with autoreactivity.

3



Clinical and Developmental Immunology

FIGURE 2: Experimental design of the work discriminating the biological samples used (animal groups and cell types), total RNA extraction, hybridizations, and microarray data analysis.

2. Materials and Methods

2.1. Animals, Thymocytes and Peripheral T CD3⁺ Lymphocyte Isolation. Female NOD mice were born in specific pathogenfree (SPF) conditions at the CEMIB-UNICAMP animal facility of the University of Campinas, SP, Brazil and maintained in SPF mini-isolators in our laboratory at the University of São Paulo, Campus of Ribeirão Preto, SP, Brazil during the experiment. We studied prediabetic 1-month-old and diabetic 7-month-old animals. Diabetes was confirmed by blood glucose levels (≥250 mg glucose/dL) using the Accu-Chek Active kit (Roche Diagnostics Brazil, São Paulo, Brazil).

The thymi from 1-month-old animals were dissected and trimmed of fat and connective tissue in DMEM/F10 medium, and thymocytes were obtained by 2-3 passages of the thymic fragments throughout a 10- μ m mesh nylon membrane (Sefar Inc. Depew, NY, USA). Pelleted thymocytes were resuspended in phosphate-buffered saline (PBS). Fluorescent-activated cell sorting (FACS) analysis in a BD-FACScalibur flow cytometer with phycoerythrin-(PE-) labeled anti-CD3 antibody indicated that this procedure yielded approximately 93% purity of the thymocyte population (Figure 1(a)). These cells were then used for total RNA preparation.

The peripheral T CD3⁺ lymphocytes from 1-monthold prediabetic, 7-month-old prediabetic, or 7-month-old diabetic animals were isolated from spleens using magnetic beads for negative selection (Pan T-cell isolation kit, mouse, Miltenyi Biotec) according to the manufacturer's instructions. FACS analysis with PE-labeled anti-CD3 antibody indicated that this procedure yielded approximately 87% purity of the CD3⁺ T lymphocyte population (Figure 1(b)). These cells were then used for total RNA preparation. The

Clinical and Developmental Immunology

TABLE 1: Clusters of the differentially expressed genes and their ontology.

Cluster	Biological process	Genes
	Activation of immune system	Cd55 Daf2 Fcer1g Klre1 Klrk1 Lax1 Lyn Malt1 Masp2 Plcg2 Tlr3 Tlr4 Tlr6 Unc93b1
	Adaptive immune response	Bcl3 Cd55 Cd74 Daf2 Fcer1g Fcgr3 Icam1 Icosl Lilrb3 Masp2 Pou2f2 Slc11a1 Tlr6
	Cell activation	Bank1 Bcl11a Bcl3 Btk Casp1 Cd74 Clcf1 Cplx2 Cxcr5 Elf4 Entpd1 Fcer1g Fcgr3 Fyb Gapt Gpr183 H2-M3 Hdac9 Hhex Icosl Il4 Irf1 Irf4 Itgax Klre1 Klrk1 Lax1 Lbp Lilrb3 Lyn Malt1 Plcg2 Pou2f2 Slc11a1 Tlr3 Tlr4 Tlr6 Vwf
	Defense response	Alox5 Bel3 Btk Ccl19 Ccl5 Ccr2 Ccr5 Cd163 Cd180 Cd36 Cd55 Cd74 Chst2 Ciita Clec4a2 Clec4d Cnr2 Daf2 Ddx58 Fcer1g Fcgr3 H2-K1 H2-M3 Hdac9 Il18rap Il1b Irf8 Lbp Lta Ly86 Lyn Malt1 Masp2 Mefv Ncf1 Neurod2 Pglyrp1 Prg2 Samhd1 Slc11a1 Tirap Tlr3 Tlr4 Tlr6
	I-kappa8 kinase/NF-kappa8 cascade	Btk Irak2 Malt1 Rel Tirap Tlr4
1	Immune effector process	Bcl3 Btk Cd55 Cd74 Cplx2 Daf2 Fcer1g Fcgr3 Icam1 Icosl Lax1 Lbp Lilrb3 Lyn Masp2 Ncf1 Pou2f2 Slc11a1
	Immune response	Bcl3 Btk Ccl19 Ccl5 Ccl9 Ccr2 Ccl180 Cd55 Cd74 Ciita Clec4a2 Clec4d Cplx2 Daf2 Ddx58 Enpp1 Fasl Fcert g Fcgr3 Fcgrt Gpr183 H2-D1 H2-K1 H2-M3 H2-Q10 H2-Q2 H2-Q7 H2-Q8 H2-T23 Hfe Icam1 Icosl Igj Il18rap Il1b Il4 Irf8 Irf8 Lax1 Lbp Lilrb3 Lta Ltb Ly86 Lyn Malt1 Masp2 Ncf1 Oas1b Pglyrp1 Plcg2 Pou2f2 Prg2 Samhd1 Slc11a1 Tirap Tlr3 Tlr4 Tlr6
	Immune response-activating signal transduction	Fcer1g Klre1 Klrk1 Lax1 Lyn Malt1 Plcg2 Tlr3 Tlr4 Tlr6 Unc93b1
	Immune system process	Bank1 Bcl11a Bcl3 Btk Casp1 Ccl19 Ccl5 Ccl9 Ccr2 Cd180 Cd300lf Cd55 Cd74 Ciita Clcf1 Clce4a2 Clce4d Cplx2 Crkl Csf1 Csf37 Cxcr5 Daf2 Ddx58 Dnase2a Elf4 Enpp1 Fasl Fcer1g Fcgr3 Fcgrt Fyb Gapt Gpr183 H2-D1 H2-K1 H2-M3 H2-Q10 H2-Q2 H2-Q7 H2-Q8 H2-T23 Hdac9 Hfe Hhex Icam1 Icosl Igj Il18rap Il1b Il4 Irf1 Irf4 Irf8 Itgax Kire1 Kirk1 Lax1 Lbp Lilrb3 Lta Ltb Ly86 Lyn Malt1 Masp2 Myo1e Ncf1 Oas1b Pglyrp1 Plcg2 Pou2f2 Prg2 Samhd1 Slc11a1 Terc Tirap Tir3 Tir4 Tir6 Tnfrsf1 3c Unc93b1
	Inflammatory response	Alox5 Btk Ccl19 Ccl5 Ccr2 Cd163 Cd180 Cd55 Chst2 Cnr2 Daf2 Fcgr3 Hdac9 II1b Lbp Lta Ly86 Lyn Masp2 Mefv Ncf1 Slc11a1 Tirap Tlr3 Tlr4 Tlr6
	Lymphocyte activation	Bank1 Bcl11a Bcl3 Cd74 Clcf1 Cxcr5 Elf4 Gapt Gpr183 H2-M3 Hdac9 Hhex Icosl Il4 Irf1 Itgax Klre1 Klrk1 Lax1 Malt1 Plcg2 Pou2f2 Slc11a1
	Lymphocyte activation during	Bcl3 Gpr183 H2-M3 Plcg2 Slc11a1
	Lymphocyte mediated immunity	Bcl3 Cd55 Cd74 Daf2 Fcer1g Fcgr3 Icam1 Icosl Lilrb3 Masp2 Pou2f2 Slc11a1
	Positive regulation of interferon-gamma production	Bcl3 H2-M3 Irf8 Klre1 Klrk1 Lta Slc11a1 Tlr4
	Regulation of defense response	Adrb2 Anxa1 Cadm1 Ccl5 Ccr5 Cnr2 Crtam Fcer1g Fcgr3 H2-Bl H2-M3 Klrb1b Klre1 Klrk1 Lta Nt5e Tgm2 Tlr3 Tlr4 Tlr6 Unc93b1
	Regulation of immune effector process	Cadm1 Crtam Fcer1g Fcgr3 H2-Bl H2-K1 H2-M3 Hmox1 Klrb1b Klre1 Klrk1 Lta
	Regulation of immune response	Btla Cadm1 Cd55 Crtam Daf2 Fcer1g Fcgr3 H2-Bl H2-K1 H2-M3 ll4 Klrb1b Klre1 Klrk1 Lax1 Lta Lyn Malt1 Masp2 Plcg2 Slc11a1 Tlr3 Tlr4 Tlr6 Tnfrsf13c Unc93b1
	Regulation of inflammatory response	Adrb2 Anxa1 Ccl5 Cnr2 Fcer1g Fcgr3 Lta Nt5e Tgm2 Tlr4
	Regulation of leucocyte mediated cytotoxicity	Cadm1 Crtam H2-Bl H2-K1 H2-M3 Klrb1b Klre1 Klrk1
	Apoptosis	Actc1 Bag3 Dapl1 Dedd2 Fasl Gramd4 Hipk2 Nfkb1 Nod1 Pea15a Pim2 Pmaip1 Psen2 Ripk1 Sgk1 Sgms1 Shisa5 Tmem173 Traf1 Traf3ip2 Traf5

Clinical and Developmental Immunology

5

TABLE 1: Continued.				
Cluster	Biological process	Genes		
	Immune response	B2m Ccl3 Ccl5 Cxcl9 Eomes Fasl Foxp3 H2-Q10 1118r1 111r11 117r Irgm1 Myo1f Pf4 Psen2 Tgtp1 Tlr1 Tmem173 Tnfaip812 Tnfsf8 Traf3ip2		
2	Immune system process	B2m Ccl3 Ccl5 Cxcl9 Eomes Fasl Flt3l Foxp3 Gimap5 H2-Q10 Il18r1 Il1rl1 Il2rb Il7r Irf1 Irgm1 Jak3 Myo1f Nfkb1 P2rx7 Pf4 Pik3cd Psen2 Slamf1 Tgfbr2 Tgtp1 Tlr1 Tmem173 Tnfaip8l2 Tnfsf8 Traf3ip2		
	Regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB cascade	Card6 Il1rl1 Nod1 Pim2 Tgm2		
	Regulation of signal transduction	Arhgef12 Arhgef3 Arrb1 Arrb2 Axin2 Card6 Cd44 Fasl Furin Il1rl1 Nod1 P2rx7 Pim2 Psen2 Rasa3 Rasgrp2 Rgs11 Runx2 S1pr1 Smad7 Socs3 Spry2 Tgm2 Zeb2		
3	Immune system process	Add2 Ahsp Ank1 Ccl4 Ccr2 Cd48 Cebpa Ctla4 Ctse Elane Epas1 Epb4.2 Gimap5 Gm5077 ld2 Ifng II1r1 II1rl1 II1rl2 Itgam Junb Klf1 Klf11 Mpo Plscr1 Polr3c Samhd1 Spna1 Tal1 Tgtp1 Trim10 Txnrd2 Zbtb32		
4	Cell communication	Atg1611 Bmp8a Cacna1c Cblc Chat Cldn5 Cxcr7 Drd5 Erbb3 Gad1 Gad2 Gast Gja5 Gnal Gpr12 Gpr173 Gpr82 Grp Grpr Hnf1b Itgax Kcnk2 Lin7a Mrgprb2 Ngfr Olfr1010 Olfr1022 Olfr1048 Olfr107 Olfr1090 Olfr1115 Olfr1161 Olfr128 Olfr1377 Olfr1384 Olfr1388 Olfr1459 Olfr1462 Olfr1469 Olfr1495 Olfr304 Olfr33 Olfr350 Olfr365 Olfr516 Olfr523 Olfr556 Olfr606 Olfr62 Olfr651 Olfr686 Olfr684 Olfr724 Olfr768 Olfr770 Olfr784 Olfr790 Olfr796 Olfr845 Olfr889 Olfr904 Olfr924 Olfr977 Park2 Pdx1 Pik3c2g Plat Pth Rab3b Rab3c Slc1a2 Slc6a4 Syn2 Taar4 Tacr1 Upk1a Vmn2r26 Vmn2r81 Xcr1		
	G-protein coupled receptor protein signaling pathway	Cxcr7 Drd5 Gast Gnal Gpr12 Gpr173 Gpr82 Grp Grpr Kcnk2 Mrgprb2 Olfr1010 Olfr1022 Olfr1048 Olfr107 Olfr1090 Olfr1115 Olfr1161 Olfr128 Olfr1377 Olfr1384 Olfr1388 Olfr1459 Olfr1462 Olfr1469 Olfr1495 Olfr304 Olfr303 Olfr365 Olfr365 Olfr365 Olfr523 Olfr566 Olfr606 Olfr62 Olfr651 Olfr68 Olfr684 Olfr724 Olfr768 Olfr770 Olfr784 Olfr790 Olfr796 Olfr685 Olfr6889 Olfr904 Olfr924 Olfr974 Pth Taart Tacr1 Vmn2r26 Vmn2r81 Xcr1		
	Signal transduction	Bmp8a Cblc Cxcr7 Drd5 Erbb3 Gast Gnal Gpr12 Gpr173 Gpr82 Grp Grpr Itgax Kcnk2 Mrgprb2 Ngfr Olfr1010 Olfr1022 Olfr1048 Olfr107 Olfr1090 Olfr1115 Olfr1161 Olfr128 Olfr1377 Olfr1384 Olfr1388 Olfr1459 Olfr1462 Olfr1469 Olfr1495 Olfr304 Olfr333 Olfr350 Olfr365 Olfr516 Olfr523 Olfr556 Olfr606 Olfr62 Olfr651 Olfr68 Olfr684 Olfr724 Olfr768 Olfr770 Olfr784 Olfr790 Olfr796 Olfr845 Olfr889 Olfr904 Olfr974 Pdx1 Pik3c2g Plat Pth Rab3b Rab3c Taar4 Tacr1 Upk1a Vmn2r26 Vmn2r81 Xcr1		
	Apoptosis, apoptosis regulation	Alms1 Bcl2l1 Birc5 Bub1 Bub1b Casp6 Ckap2 Cul7 E2f1 E2f2 Egln3 Epha2 Fas Ift57 Krt18 Krt8 Lig4 Phlda1 Rad21 Rtn3 Stk3 Tfdp1 Tia1 Tpx2 Traf4 Trp53inp1 Vdac1		
	Cell activation	Ada Bcl11b Ccnd3 Cd4 Cd8a Cxcl12 Fas Hdac7 Hells Lig4 Ly6d Msh6 Patz1 Rag1 Rorc Satb1 Sox4 Themis		
5	Cell cycle	1190002H23Rik Anapc5 Anln Aspm Aurka B230120H23Rik Birc5 Bub1 Bub1b C79407 Casc5 Ccdc99 Ccna2 Ccnb1 Ccnb2 Ccnd3 Ccne2 Ccnf Ccng2 Cdc20 Cdc25a Cdc25c Cdc45 Cdca2 Cdca3 Cdca5 Cdk1 Cdkn1a Cdkn2c Cdkn3 Cenpe Cenpj Cep55 Chek1 Ckap2 Ckap5 Cul7 E2f1 E2f2 E2f3 E2f7 Ercc6I Esco2 Espl1 F630043A04Rik Fam33a Fbxo5 Gas2l3 Gsg2 H2afx Haus2 Hells Kif1 Kif2c Kifc1 Lig4 Mad111 Mki67 Myb Ncapd2 Ncaph Ndc80 Nde1 Nek2 Nsl1 Nuf2 Nusap1 Pard6g Phgdh Prc1 Psrc1 Pttg1 Rad21 Rad51c Rbbp4 Rcc1 Sg01 Sg0l2 Skp2 Spag5 Spc25 Stmn1 Tacc2 Tacc3 Tfdp1 Tpx2 Trp53inn1 Tubb5 Tubg1 Uhe2(Librf1 Weet)		

Clinical and Developmental Immunology

ABLE	: Continued.

Cluster	Biological process	Genes
	Cell proliferation	Alms1 Aspm Bcl2l1 Ccnd3 Cxcl12 Gins1 Hells Hmgb1 Lig4 Lipa Mki67 Ncapg2 Nde1 Satb1 Tacc2 Tacc3 Uhrf1 Vegfa
	Lymphocyte activation	Ada Bcl11b Cend3 Cd4 Cd8a Cxcl12 Faz Hdac7 Hells Lig4 Ly6d Msh6 Patz1 Rag1 Rorc Satb1 Sox4 Themis
	Lymphocyte differentiation	Ada Bcl11b Cd4 Cd8a Fas Hdac7 Hells Lig4 Ly6d Patz1 Rag1 Rorc Satb1 Sox4 Themis
	T-cell activation	Bcl11b Cend3 Cd4 Cd8a Cxcl12 Fas Lig4 Patz1 Rag1 Rore Satb1 Sox4 Themis
	T-cell differentiation	Bcl11b Cd4 Cd8a Fas Lig4 Patz1 Rag1 Rorc Satb1 Sox4 Themis
	V(D)J recombination	Bcl11b Lig4 Rag1 Xrcc6
	CD8-positive, alpha-beta T-cell differentiation	Pax1 Satb1
	Cell differentiation	Acan Bcl11b Bcl2l1 Bcl6 Bmp7 Cby1 Cdkn1c Cux1 Cxcl12 Dyrk1b Ephb2 Gjc1 Gpc2 Hdac2 Id3 Ift81 Igfbp3 Lhx2 Lig4 Morc1 Msi2 Myh10 Notch1 Notch3 Ntn1 Paqr5 Pax1 Pias2 Pitx2 Ptprf Rag1 Rag2 Runx1 Satb1 Sox11 Spata6 Spo11 Stra8 Tbata Thy1 Whrn
6	Cell-cell adhesion	Acan Arvef Jup Lmo4 Meam Neam1 Ntn1 Ptprf Pvrl3 Vangl2
	Lymphocyte differentiation	Bcl11b Bcl6 Lig4 Pax1 Rag1 Rag2 Satb1
	Somatic diversification and recombination of T-cell receptor genes	Bcl11b Lig4
	T-cell activation	Bcl11b Cxcl12 Lig4 Pax1 Rag1 Rag2 Satb1 Sla2
	T-cell differentiation	Bcl11b Lig4 Pax1 Rag1 Rag2 Satb1
	T-cell receptor V(D)J recombination	Bcl11b Lig4
	V(D)J recombination	Bcl11b Lig4 Rag1 Rag2

animal experimental protocol was previously approved by the Commission for Ethics in Animal Research, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, USP, Brazil (Protocol no. 120/2008).

6

2.2. Total RNA Preparation. The total RNA was extracted from 1×10^7 thymocytes or peripheral T CD3⁺ lymphocytes using a mirVana total RNA isolation kit (Ambion) according to the manufacturer's instructions. RNA preparations were confirmed to be free of proteins and phenol by UV spectrophotometry. The state of degradation was assessed by microfluidic electrophoresis using Agilent RNA Nano 6000 chips and an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Only RNA samples that were free of proteins and phenol and featured an RNA Integrity Number (RIN) \geq 9.0 were used.

2.3. RNA Amplification, Labeling, Microarray Hybridization and, Data Analysis. Changes in gene expression were evaluated using the Agilent one-color (Cy3 fluorochrome) microarray-based gene expression platform according to the manufacturer's instructions. For hybridization onto whole mouse genome 4×44 K 60-mer oligonucleotide arrays (G4122F, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), 500 ng total RNA was used in the one-color Quick Amp labeling kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Samples of complementary RNA (cRNA) were hybridized for 18 h at 42°C in a rotator oven and were then 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 thymocytes (from 1-month-old prediabetic mice) or CD3⁺ peripheral lymphocytes (from 1-month-old prediabetic, 7-month-old prediabetic or 7-month-old diabetic mice) were analyzed through comparisons of the microarray hybridizations of the respective samples. Figure 2 depicts the experimental design for further comparison of the gene profiling.

A complete file that provides all of the genes present in the microarray used in this study, as well as the experimental conditions, is available online at the MIAME public database [33], ArrayExpress accession E-MEXP 3047.

The microarray numerical quantitative data were normalized to the 75th percentile and were analyzed using the GeneSpring GX bioinformatics platform [34] according to the default instructions allowing hierarchical clustering of samples of mice or genes based on ANOVA statistical analysis (P < .01) with a fold change >2.0 and an uncentered Pearson correlation metrics [35]. 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.

7

Clinical and Developmental Immunology



FIGURE 3: Hierarchical clustering of thymocytes and peripheral CD3⁺ lymphocytes of nonobese diabetic (NOD) mice based on microarray gene expression profiling. Dendrograms and heat maps were obtained using the Cluster-Tree View program within the GeneSpring GX (Agilent) platform. Red = upregulation, green = downregulation, and black = unmodulated (Pearson correlation metrics, 75 percentile). The 2,771 differentially expressed genes were divided in six clusters (clusters 1 to 6) according to their relative expression levels and ontology.

2.4. Gene Ontology. Microarray data analysis was used to identify gene expression based on combined information from the public databases DAVID [36] and SOURCE [37]. These databases show gene annotation enrichment analysis, functional annotation clustering, BioCarta and KEGG pathway mapping (DAVID), or microarray data and sequencing of cDNA clones from different organ/tissues (SOURCE), including GenBank accession number, chromosomal location and the molecular/biological function of each gene analyzed.

2.5. Oligonucleotide Primer Design and Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR). Microarray data were confirmed using qRT-PCR for the genes listed below that were differentially expressed between thymocytes and peripheral CD3+ T lymphocytes. The cDNA sequences of these genes were retrieved from the NCBI GenBank database (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/ GenbankSearch.html), and the Primer3 web tool (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi) was used to select pairs of oligonucleotide primers spanning an intron/exon junction and with consideration of the alternative transcripts. An optimal melting temperature of 60°C was standardized for all genes. The following forward and reverse sequences are given in the 5' to 3' orientation: Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1, accession number NM_000194.2, GACCAGTCAACAGGGGACAT' and CTGCATTGTTTTGCCAGTGT); Fas ligand (Fasl, accession number NM_000639, ACTCCGTGAGTTCACCAACC GTGGGGGTTCCCTGTTAAAT); Tolland like 3 (Tlr3, accession number receptor BC068487, TTGTCTTCTGCACGAACCTG and CCCGTTCCCAACTTTGTAGA); Toll-like receptor 4 (Tlr4, accession number NM_138554, TCAGAACTTCAGTG-GCTGGA CCTGGGGGAAAAACTCTGGAT); **P**3 (Foxp3, accession number TCTTCGAGGAGCCAGAAGAG Forkhead box NM_014009. GCTCCAGAGACTGCACCACT); and Thymocyte selection associated (Themis, accession number AAATGAAGCTCACCTTGCTCA NM_001164685. and ATCCTGGCCACTTTCATCTG). HPRT1 was used as the constitutively expressed gene. Transcriptional expression levels were determined using a StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA). The ΔΔCT relative normalization method was used as described previously. We used the GraphPad Prism 5.00 tool (http://www.graphpad.com/prism/Prism.html) to run one-way or two-way ANOVAs with Bonferroni's correction statistics.

3. Results

Although the expression pattern remained unchanged between thymocytes and peripheral T lymphocytes from prediabetic and diabetic animals for the majority of the 44,000 sequences tested, which presented a control/test ratio ≈ 1.0 (Pearson correlation), 2,771 genes were found to be


Clinical and Developmental Immunology

FIGURE 4: Confirmation of microarray data by qRT-PCR. The Fasl, Tlr3, and Tlr4 genes were downregulated in thymocytes from prediabetic animals, Foxp3 was upregulated in peripheral CD3⁺ lymphocytes from diabetic animals, and Themis was upregulated in thymocytes from prediabetic animals.

Clinical and Developmental Immunology

differentially expressed. Hierarchical clustering of the data allowed for the identification of clusters of upregulated (induced) and downregulated (repressed) genes. Changes in gene expression profile could be observed when comparing thymocytes from 1-month-old prediabetic mice with peripheral CD3⁺ lymphocytes from 1-month-old prediabetic, 7month-old prediabetic, or 7-month-old diabetic mice to observe the modulated genes that coincided with the development of T1D.

Hierarchical clustering analysis depicted in Figure 3 shows variability in the hybridization signatures between cell types. The upper horizontal dendrogram (cell samples) demonstrates that this variability could distinguish cells according to their developmental phase, namely, thymocytes (prediabetic animals) from peripheral CD3⁺ lymphocytes (prediabetic and diabetic animals). The left vertical dendrogram shows the genes that were differentially expressed (up- or downregulated) according to their respective biological function, and the genes were divided into six clusters (Figure 3 and Table 1). Clusters 1 to 4 contain genes downregulated in thymocytes and peripheral CD3⁺ lymphocytes from 1-month-old prediabetic animals and progressively upregulated in peripheral CD3⁺ lymphocytes from 7-month-old prediabetic and diabetic animals.

Cluster 1 comprises 767 differentially expressed genes, and the following genes were highlighted because they participate in immune processes potentially implicated in the pathogenesis of T1D: II.4, involved with T-cell activation, Crtam, involved in cytotoxicity and Tlr3, Tlr4, and Tlr6, involved in inflammatory response.

Cluster 2 comprises 340 differentially expressed genes, and the following genes were highlighted: Fasl, involved in the induction of apoptosis by extracellular signals and FoxP3, involved in CD25⁺ alpha-beta T-regulatory (Treg) cell differentiation and positive regulation of T-cell tolerance induction.

Cluster 3 comprises 435 differentially expressed genes, and the following genes were highlighted: Chemokine (C– C motif) ligand 4 gene (Ccl4) and Chemokine (C–C motif) receptor 2 gene (Ccr2), both involved in inflammatory response; CD48 antigen gene, involved in T-cell activation; Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 gene (Ctla4), involved in negative regulation of Treg cell differentiation; Interferon gamma gene (Ifng), involved in positive regulation of T-cell proliferation; Integrin alpha M gene (Itgam), involved in cell-cell adhesion.

Cluster 4 comprises 292 differentially expressed genes, and the following genes were highlighted: Integrin alpha X (Itgax) and Claudin 5 (Cldn5) gene, involved in cellcell adhesion; Gap junction protein, alpha 5 (Gja5) gene, involved in cell-cell signaling; HNF1 homeobox 1 transcription factor, involved in maturity onset diabetes of the young and circadian regulation of transcription; and Gastrin (Gast) and Guanine nucleotide-binding protein 1 (Gna1) gene, both involved in protein signaling pathway. Interestingly, this cluster comprises various members of the olfactory receptor (Olfr) gene family, which is involved with cell signaling pathways. Finally, clusters 5 and 6 comprise 610 and 327 genes, respectively, which feature a different expression pattern than those included in the previous clusters, that is, they were mainly upregulated in thymocytes from prediabetic mice and progressively downregulated in peripheral CD3⁺ lymphocytes from prediabetic and diabetic animals. These two clusters contain genes involved in CD4/CD8 cell differentiation (Themis) and V(D)J recombination (Rag1 and Rag2).

Using qRT-PCR, we assayed the expression levels of five differentially expressed genes (Fasl, Tlr3, Tlr4, Foxp3 and Themis) that are associated with thymocyte selection, T-cell differentiation, cell activation, or inflammation. The expression levels obtained with qRT-PCR method were comparable with microarrays, for example; the Fasl, Tlr3 and Tlr4 genes were downregulated in thymocytes from prediabetic animals, Foxp3 was upregulated in peripheral CD3⁺ lymphocytes from diabetic animals, and Themis (Figure 4).

4. Discussion

In this study, we assessed the hypothesis that the transcriptional modulation of immune reactivity genes may occur during the development of T1D as thymocytes mature into peripheral T lymphocytes. Consequently, the emergence of T1D might follow a pattern of the transcriptional activity of these cells, sequentially featuring genes associated with a negative selection of thymocytes, T-cell maturation, differentiation, and autoreactivity.

As discussed in a previous study [38], diabetes in NOD mice is similar to T1D patients, and the progress of diabetes in these animals occurs in two stages. In the first stage, autoreactive CD8⁺ T lymphocytes infiltrate the pancreatic islet by 1 month after the birth. However, most pancreatic islets are preserved at this phase, and the animals are clinically healthy. Stage one can persist for months because the autoimmune attack is under control and is relatively nondestructive. In the second stage, most of pancreatic islets are destructed and animals are often diabetic.

Because these animals spontaneously develop autoimmune diabetes mellitus that is similar to human T1D, including the presence of pancreas-specific autoantibodies and autoreactive CD4⁺ or CD8⁺ T-cells and synteny to human chromosomal linkage groups associated with T1D, they are a classical model system for investigating autoimmune T1D and/or failure in the tolerance mechanisms [4, 6, 28]. Thus, we chose to employ the NOD mouse as a model system given the difficulty of easily testing this theory in humans.

To exclude the influence of genetic backgrounds of nonautoimmune mouse strains, we compared only groups of NOD mice in two distinct phases of autoimmunity, namely, prediabetic (1- or 7-month-old) and diabetic (\geq 7-month-old).

Moreover, by establishing transcriptome comparisons between cells from prediabetic and diabetic animals or between thymocytes and peripheral T lymphocytes, it was

Clinical and Developmental Immunology

possible to find genes temporally regulated (because T1D emerges according to age) and regulated according to T-cell development.

The procedures for isolation of thymocytes and peripheral CD3⁺ T lymphocytes used in this work yielded purities (approximately 93% for thymocytes and 85% for peripheral CD3⁺ T lymphocytes) that are comparable to automated cell sorting of T-cells. Moreover, the peripheral CD3⁺ T lymphocytes were isolated by negative separation, minimizing eventual cell activation by artifacts.

Figure 3 (clusters 1 to 4) and Table 1 show the gene expression pattern observed in thymocytes and peripheral CD3⁺ lymphocytes from prediabetic 1-month-old animals. The gene expression in these cells could be considered to occur in the first stage of T1D, and this expression features the down-regulation of genes involved with the activation of the immune system/adaptive response, cell activation, NF-KappaB cascade, immune effector/immune response processes, inflammatory response, lymphocyte activation, the regulation of interferon-gamma production, the regulation of leukocyte-mediated cytotoxicity, apoptosis, cell communication, and signal transduction. Altogether, these biological processes are necessary for the development of lymphocyte differentiation and autoreactivity.

The thymocytes from prediabetic 1-month-old animals featured down-regulation of genes associated with several biological processes that were gradually upregulated in the peripheral CD3⁺ lymphocytes from prediabetic 1-monthold, prediabetic 7-month-old, and diabetic 7-month-old animals (Figure 3 and Table 1). Among these processes and their respective genes, we selected some of the most important to discuss because of their direct or indirect association with aggressive autoimmunity.

The apoptosis process featured genes including Fas ligand (Fasl), TNF receptor-associated factor (Traf1 and Traf5), Traf3 interacting protein 2 (Traf3ip2), and Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 8 (Tnfsf8 or TRAIL).

Because apoptosis is the final stage of the negative selection of thymocytes in the thymus [29], the downregulation of these genes may favor the survival of autoreactive thymocyte clones, including those that recognize pancreatic beta cell autoantigens.

A role for TRAIL in T1D in NOD mice has been evidenced by its blockade with consequent exacerbation of the disease [39] and by its systemic delivery indicating that T1D can be prevented by TRAIL overexpression through an enhancement of the tissue inhibitor of the metalloproteinase-1 (TIMP-1) function [40]. The authors concluded that elevated TIMP-1 production inhibits the activity of matrix metalloproteinases, which may contribute to the suppression of the transmigration of diabetogenic T-cells into the pancreatic islets and protects pancreatic beta cells from cytokineinduced apoptosis.

The tolerance induction process featured Forkhead box P3 (Foxp3) gene, which was also downregulated in thymocytes from 1-month-old prediabetic animals. This gene is involved in tolerance induction via CD4⁺CD25⁺ T-regulatory cells (Tregs) [41–43], a process that directly activates any of the steps required for tolerance, a physiologic state in which the immune system does not react destructively against self-components. Thus, their deregulation may impair the Treg-mediated suppression of aggressive autoimmunity, favoring the survival of autoreactive thymocytes in the thymus.

The T-cell activation process featured several downregulated genes in thymocytes from 1-month-old prediabetic animals, from which we highlight Chemokine (C–C ligand motif) ligand 4 (Ccl4), Chemokine (C–C motif) receptor 2 (Ccr2), Cd48 antigen and Interferon, gamma (Ifng), and Interleukin 4 (IIL4) genes. These genes were gradually upregulated in peripheral CD3+ lymphocytes from prediabetic to diabetic animals and may increase the activation of autoreactive T-cell clones in the periphery.

Interestingly, the G-protein-coupled receptor protein signaling pathway and signal transduction processes shared several members of the olfactory gene family (Olfr), which is involved in sensory perception of smell through receptor and signal transducer activity. The two pathways also shared bone morphogenetic protein 8a (Bmp8a) gene, which is involved in growth and ossification. These genes were downregulated in thymocytes from 1-month-old prediabetic animals and were gradually upregulated in peripheral CD3⁺ lymphocytes from prediabetic to diabetic animals. Despite their disparate biological processes in the context of T1D, these genes may play a role in the receptor-mediated signal transduction activity of peripheral T-cells in diabetic animals.

Dissimilar from the pattern of genes related to the processes discussed above, the T-cell receptor V(D)J recombination and $CD4^+/CD8^+$ T-cell differentiation featured genes were upregulated in thymocytes and $CD3^+$ peripheral T lymphocytes from prediabetic 1-month-old animals and were gradually downregulated in peripheral CD3+ lymphocytes from prediabetic and diabetic 7-month-old animals.

Among these genes, we highlight the recombination activating genes (Rag-1 and Rag-2) that code the recombinase catalytic complex involved in the recognition of recombination signal sequences (RSS) within the T-cell receptor loci (TCR alpha, beta, gamma or delta), cutting and recombining DNA during aleatory generation of TCR diversity. The generation of TCR diversity implies the production of T-cell clones directed to foreign antigens and also autoreactive clones. Autoreactive clones are normally eliminated by apoptosis throughout the negative selection process.

Also, Adenosine deaminase (Ada) gene, which is involved in a process that increases the frequency of T-cell differentiation in the thymus, and Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (Ctla4) gene, which in contrast to Ada gene, is involved in the negative regulation of T-cell proliferation, were both identified.

Finally, we found the Thymocyte selection associated (Themis) gene, which is expressed in the thymus and to a lesser extent in the spleen but is not detectable in nonlymphoid tissues. This gene is highly expressed in thymocytes between the pre-T-cell antigen receptor (pre-TCR) and positive-selection checkpoints and is expressed at a low level in mature T-cells (at the protein level). Themis is also implicated in the control of T-helper CD4+/cytotoxic

Clinical and Developmental Immunology

CD8+ cell fate. Moreover, the CD4 as well as CD8a antigen genes, which define the respective T-helper CD4⁺ or T cytotoxic CD8+ phenotypes, were also found.

During their permanence within the thymus, thymocytes activate a developmentally complex mechanism because of close contact with thymic stroma. The medullary thymic epithelial cells (mTECs), which form the stromal medullar compartment, present peripheral tissue antigens (PTAs) to thymocytes to eliminate autoreactive clones by inducing apoptosis (negative selection), leading to tolerance induction [23, 24].

Failure in the expression of specific PTA genes in the thymic stroma is strongly associated with aggressive autoimmunity as recently observed during the development of T1D in NOD mice [38] or collagen-induced arthritis in DBA-1/J mice [44]. This indeed led to survival of autoreactive thymocyte clones that once in the periphery, mediate autoimmune attack of target structures such as pancreatic beta cells.

To better understand the control of transcriptional activity of thymocytes specifically associated with the induction of tolerance and negative selection within the thymus or cytotoxicity and inflammatory response in peripheral T lymphocytes, we propose further experiments to evaluate the participation of microRNAs (miRNAs) that once dysregulated might be associated with aggressive autoimmunity of T1D.

5. Conclusion

In this study, we were able to construct a transcriptional profile of T-cell development comparing thymocytes with peripheral CD3+ lymphocytes in the context of the emergence of T1D. The sequential participation of genes involved with the main steps of T-cell development such as the generation of TCR diversity, CD4⁺/CD8⁺ cell fate, apoptosis, and negative selection demonstrated that the T1D autoimmune phenotype in NOD mice runs in parallel with transcriptome changes of T-cells. The results obtained confirm our initial hypothesis.

Acknowledgments

This study was funded by the following agencies: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). T. A. Fornari and Paula B. Donate are equally contributed to this work.

References

- A. L. Notkins and Å. Lernmark, "Autoimmune type 1 diabetes: resolved and unresolved issues," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 108, no. 9, pp. 1247–1252, 2001.
 B. Regnault, J. Osorio Y Fortea, D. Miao, G. Eisenbarth, and
- [2] B. Regnault, J. Osorio Y Fortea, D. Miao, G. Eisenbarth, and E. Melanitou, "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*, vol. 2, article no. 63, 2009.

- [3] E. H. Leiter, M. Prochazka, and D. L. Coleman, "The nonobese diabetic (NOD) mouse," *American Journal of Pathology*, vol. 128, no. 2, pp. 380–383, 1987.
- [4] M. A. Atkinson and E. H. Leiter, "The NOD mouse model of type I diabetes: as good as it gets?" *Nature Medicine*, vol. 5, no. 6, pp. 601–604, 1999.
- [5] M. S. Anderson and J. A. Bluestone, "The NOD mouse: a model of immune dysregulation," *Annual Review of Immunol*ogy, vol. 23, pp. 447–485, 2005.
- [6] J. P. Driver, D. V. Serreze, and Y. -G. Chen, "Mouse models for the study of autoimmune type 1 diabetes: a NOD to similarities and differences to human disease," *Seminars in Immunopathology*, vol. 33, no. 1, pp. 67–87, 2011.
- [7] H. Ikegami, S. Makino, E. Yamato et al., "Identification of a new susceptibility locus for insulin-dependent diabetes mellitus by ancestral haplotype congenic mapping," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 96, no. 4, pp. 1936–1942, 1995.
- [8] L. S. Wicker, J. A. Todd, and L. B. Peterson, "Genetic control of autoimmune diabetes in the NOD mouse," *Annual Review* of Immunology, vol. 13, pp. 179–200, 1995.
- [9] J. A. Shizuru, C. Taylor-Edwards, B. A. Banks, A. K. Gregory, and C. G. Fathman, "Immunotherapy of the nonobese diabetic mouse: treatment with an antibody to T-helper lymphocytes," *Science*, vol. 240, no. 4852, pp. 659–662, 1988.
- [10] F. S. Wong, I. Visintin, LI. Wen, J. Granata, R. Flavell, and C. A. Janeway, "The role of lymphocyte subsets in accelerated diabetes in nonobese diabetic-rat insulin promoter-B7-1 (NOD-RIP-B7-1) mice," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 187, no. 12, pp. 1985–1993, 1998.
- [11] BO. Wang, A. Gonzalez, C. Benoist, and D. Mathis, "The role of CD8 T cells in the initiation of insulin-dependent diabetes mellitus," *European Journal of Immunology*, vol. 26, no. 8, pp. 1762–1769, 1996.
- [12] J. Katz, C. Benoist, and D. Mathis, "Major histocompatibility complex class I molecules are required for the development of insulitis in non-obese diabetic mice," *European Journal of Immunology*, vol. 23, no. 12, pp. 3358–3360, 1993.
 [13] D. V. Serreze, E. H. Leiter, G. J. Christianson, D. Greiner,
- [13] D. V. Serreze, E. H. Leiter, G. J. Christianson, D. Greiner, and D. C. Roopenian, "Major histocompatibility complex class I-deficient NOD-B2m(null) mice are diabetes and insulitis resistant," *Diabetes*, vol. 43, no. 3, pp. 505–509, 1994.
- [14] T. Sumida, M. Furukawa, A. Sakamoto et al., "Prevention of insulitis and diabetes in β-microglobulin-deficient non-obese diabetic mice," *International Immunology*, vol. 6, no. 9, pp. 1445–1449, 1994.
- [15] J. D. Katz, B. Wang, K. Haskins, C. Benoist, and D. Mathis, "Following a diabetogenic T cell from genesis through pathogenesis," *Cell*, vol. 74, no. 6, pp. 1089–1100, 1993.
 [16] B. Bergman and K. Haskins, "Islet-specific T-cell clones from
- B. Bergman and K. Haskins, "Islet-specific T-cell clones from the NOD mouse respond to β-granule antigen," *Diabetes*, vol. 43, no. 2, pp. 197–203, 1994.
 A. Gonzalez, J. D. Katz, M. G. Mattei, H. Kikutani, C. Benoist,
- [17] A. Gonzalez, J. D. Katz, M. G. Mattei, H. Kikutani, C. Benoist, and D. Mathis, "Genetic control of diabetes progression," *Immunity*, vol. 7, no. 6, pp. 873–883, 1997.
- [18] O. Kanagawa, A. Militech, and B. A. Vaupel, "Regulation of diabetes development by regulatory T cells in pancreatic islet antigen-specific TCR transgenic nonobese diabetic mice," *Journal of Immunology*, vol. 168, no. 12, pp. 6159–6164, 2002.
- [19] L. Poirot, C. Benoist, and D. Mathis, "Natural killer cells distinguish innocuous and destructive forms of pancreatic islet autoimmunity," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 101, no. 21, pp. 8102–8107, 2004.
- [20] S. Zucchelli, P. Holler, T. Yamagata, M. Roy, C. Benoist, and D.

Clinical and Developmental Immunology

Mathis, "Defective central tolerance induction in NOD mice: genomics and genetics," Immunity, vol. 22, no. 3, pp. 385-396, 2005

- [21] K. L. Rock, S. Gamble, and L. Rothstein, "Presentation of exogenous antigen with class I major histocompatibility complex molecules," *Science*, vol. 249, no. 4971, pp. 918–921, 1990.
- [22] M. Kovacsovics-Bankowski and K. L. Rock, "Presentation of exogenous antigens by macrophages: analysis of major histocompatibility complex class I and II presentation and regulation by cytokines," *European Journal of Immunology*, vol. 24, no. 10, pp. 2421-2428, 1994. [23] B. Kyewski and J. Derbinski, "Self-representation in the
- thymus: an extended view," Nature Reviews Immunology, vol. 4, no. 9, pp. 688–698, 2004. [24] D. A. R. Magalhāes, E. L. V. Silveira, C. M. Junta et al.,
- Promiscuous gene expression in the thymus: the root of central tolerance," Clinical and Developmental Immunology, vol. 13, no. 2-4, pp. 81-99, 2006.
- [25] L. Klein and B. Kyewski, "Self-antigen presentation by thymic stromal cells: a subtle division of labor," Current Opinion in Immunology, vol. 12, no. 2, pp. 179–186, 2000. [26] J. Derbinski, A. Schulte, B. Kyewski, and L. Klein, "Promis-
- cuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self," Nature Immunology, vol. 2, no. 11, pp. 1032-1039, 2001.
- [27] B. Kyewski and L. Klein, "A central role for central tolerance," Annual Review of Immunology, vol. 24, pp. 571–606, 2006
- [28] Y. Takahama, "Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection," *Nature Reviews Immunol*egy, vol. 6, no. 2, pp. 127–135, 2006. [29] G. A. Hollönder, "Claudins provide a breath of fresh Aire,"
- Nature Immunology, vol. 8, no. 3, pp. 234–236, 2007. [30] M. Irla, S. Hugues, J. Gill et al., "Autoantigen-specific interac-
- tions with CD4* thymocytes control mature medullary thymic epithelial cell cellularity," Immunity, vol. 29, no. 3, pp. 451-463, 2008,
- [31] J. Villaseñor, W. Besse, C. Benoist, and D. Mathis, "Ectopic expression of peripheral-tissue antigens in the thymic epithelium: probabilistic, monoallelic, misinitiated," Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 105, no. 41, pp. 15854–15859, 2008.
- [32] A. R. Hayward and M. Shreiber, "Neonatal injection of CD3 antibody into nonobese diabetic mice reduces the incidence of insulitis and diabetes," Journal of Immunology, vol. 143, no. 5, pp. 1555-1559, 1989.
- [33] http://www.ebi.ac.uk/miamexpress.
- [34] www.agilent.com/chem/genespring.[35] M. B. Eisen, P. T. Spellman, P. O. Brown, and D. Botstein, "Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns," *Proceedings of the National Academy of Sciences of* the United States of America, vol. 95, no. 25, pp. 14863-14868, 1998
- [36] http://david.abcc.ncifcrf.gov
- [37] http://smd.stanford.edu/cgi-bin/source/sourceSearch.
- [38] T. A. Fornari, P. B. Donate, C. Macedo, M. M. C. Marques, D. A. Magalhães, and G. A. S. Passos, "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, vol. 342, no. 1-2, pp. 21-28, 2010.
- [39] Q. S. Mi, D. Ly, S. E. Lamhamedi-Cherradi et al., "Blockade of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand exacerbates type 1 diabetes in NOD mice," Diabetes, vol. 52,

no. 8, pp. 1967-1975, 2003.

- [40] S. Kang, E.-J. Park, Y. Joe et al., "Systemic delivery of TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL) elevates levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) and prevents type 1 diabetes in nonobese diabetic mice," *Endocrinology*, vol. 151, no. 12, pp. 5638-5646, 2010.
- [41] J. D. Fontenot, M. A. Gavin, and A. Y. Rudensky, "Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells," Nature Immunology, vol. 4, no. 4, pp. 330-336, 2003.
- [42] S. Hori, T. Nomura, and S. Sakaguchi, "Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3," *Science*, vol. 299, no. 5609, pp. 1057–1061, 2003.
- [43] J. H. Buckner, "Mechanisms of impaired regulation by CD4+ CD25⁺ FOXP3⁺ regulatory T cells in human autoimmune diseases," Nature Reviews Immunology, vol. 10, no. 12, pp. 849-859, 2010.
- [44] P. B. Donate, T. A. Fornari, C. M. Junta et al., "Collagen induced arthritis (CIA) in mice features regulatory transcriptional network connecting major histocompatibility complex (MHC H2) with autoantigen genes in the thymus, Immunobiology, vol. 216, no. 5, pp. 591-603, 2011.

Mol Biol Rep DOI 10.1007/s11033-011-1186-3

Transcription profiling of *Prss16* (Tssp) can be used to find additional peptidase genes that are candidates for self-peptide generation in the thymus

Thaís A. Fornari · Márcia M. Marques · Catherine Nguyen · Alice Carrier · Geraldo A. Passos

Received: 28 November 2010/Accepted: 7 July 2011 © Springer Science+Business Media B.V. 2011

Abstract Positive selection (PS) in the thymus involves the presentation of self-peptides that are bound to MHC class II on the surface of cortical thymus epithelial cells (cTECs). Prss16 gene corresponds to one important element regulating the PS of CD4⁺ T lymphocytes, which encodes Thymus-specific serine protease (Tssp), a cTEC serine-type peptidase involved in the proteolytic generation of self-peptides. Nevertheless, additional peptidase genes participating in the generation of self-peptides need to be found. Because of its role in the mechanism of PS and its expression in cTECs, the Prss16 gene might be used as a transcriptional marker to identify new genes that share the same expression profile and that encode peptidases in the thymus. To test this hypothesis, we compared the differential thymic expression of 4,500 mRNAs of wild-type (WT) C57BL/6 mice with their respective Prss16-knockout (KO) mutants by using microarrays. From these, 223 genes were differentially expressed, of which 115 had known molecular/biological functions. Four endopeptidase genes

T. A. Fornari · M. M. Marques · G. A. Passos (⊠) Molecular Immunogenetics Group, Department of Genetics, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP 14040-900, Brazil e-mail: passos@rge.fmrp.usp.br

C. Nguyen National Institute of Health and Medical Research (INSERM U928), Marseille, France

A. Carrier National Institute of Health and Medical Research (INSERM U624), Marseille, France

G. A. Passos Disciplines of Genetics and Molecular Biology (DMEF), Faculty of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo

(USP), Ribeirão Preto, SP, Brazil Published online: 20 July 2011 (*Casp1*, *Casp2*, *Psmb3* and *Tpp2*) share the same expression profile as the *Prss16* gene; i.e., induced in WT and repressed in KO while one endopeptidase gene, *Capns1*, features opposite expression profile. The *Tpp2* gene is highlighted because it encodes a serine-type endopeptidase functionally similar to the Tssp enzyme. Profiling of the KO mice featured down-regulation of *Prss16*, as expected, along with the genes mentioned above. Considering that the *Prss16*-KO mice featured impaired PS, the shared regulation of the four endopeptidase genes suggested their participation in the mechanism of self-peptide generation and PS.

Keywords Positive selection · Thymus · Expression profiling · Cortical thymus epithelial cells (cTECs)

Introduction

Positive selection (PS) of T cells is part of the central tolerance mechanism and occurs in the cortical compartment (cortex) of the thymus. It involves interaction of thymocytes with cortical thymic epithelial cells (cTECs), which display self-peptide antigens coupled to MHC-class I or -class II molecules (pMHC) at their cell surface.

Thymocytes that express T-cell receptors (TCR $\alpha\beta$) with no or very low affinity for pMHC complexes die by neglect, whereas very high affinity interactions also lead to death.

Only those thymocytes presenting an intermediate affinity undergo PS and CD4 or CD8 lineage commitment as part of the peripheral T-cell repertoire [1, 2].

However, PS in the thymus is no longer enough to guarantee central tolerance to the self. In a cooperative

Springer

manner that is rather redundant, the medullar compartment of the thymus (medulla) is the compartment in which surviving thymocytes from PS interact with medullary thymic epithelial cells (mTECs) and/or with dendritic cells through pMHC complexes. Such interactions are via TCR $\alpha\beta$ expressed at the surface of double-positive (DP) CD4⁺CD8⁺TCR $\alpha\beta^{low}$ thymocytes [3, 4].

In a process known as negative selection (NS), thymocytes that react to self-peptides (autoreactive thymocytes) die by apoptosis. Thus, NS is mediated by the thymic medulla, and the cortex mediates PS [1, 5, 6].

In fact, PS and NS of thymocytes occur in parallel with CD4 or CD8 lineage commitment, with pivotal participation of MHC molecules. Double-positive thymocytes positively selected from the interaction with self-pMHC class I mature into CD4⁻CD8⁺ single-positive (SP) cells, whereas those selected from self-pMHC class II interaction mature into CD4⁺CD8⁻ SP cells. The cell compartment also plays a role in this process; self-peptides trimmed and presented in the cytosol constitute pMHC class I, and those in the endosomes or lysosomes constitute pMHC class II complexes.

Little is known about the presumed existence of several specific enzymes that generate pMHC class II complexes, but evidence suggests that lysosomal proteases play an essential role in this process. Of note, the lysosomal protease Cathepsin L appears necessary for the removal of the invariant chain peptide-binding site of MHC class II molecules and the peptide generation in cTECs [7].

Moreover, another important enzyme named Thymusspecific serine protease (Tssp) presumably plays a role in the proteolytic degradation of lysosomal substrates in the generation of self-peptides. Recently, its role in PS has been inferred from results with MHC class II-restricted transgenic TCR specificities and KOs. It has been shown that PS was substantially decreased in *Prss16*-KO mice [8].

The discovery of Tssp, which corresponds to a serinetype peptidase encoded by the *Prss16* gene, comes from screening for cTEC-specific genes [9, 10]. The cytoplasmic localization of Tssp in endosomal and/or lysosomal organelles strongly suggests its participation in the proteolytic generation of MHC class II-bound self-peptides [7].

Evidence suggests that the cTECs play a role in the generation of MHC-bound peptides through unique pathways [1]. As depicted by these authors, MHC class I-bound self-peptides in cTECs appear to be primarily generated by the thymoproteasome, a giant thymic multicatalytic protease incorporating the β 5t subunit.

Macroautophagy, a process in which sequestration of cytoplasm into a double- or multiple-membrane-delimited compartment of non-lysosomal origin occurs, also plays a parallel role incorporating endogenous proteins and shuttling them into the MHC class II compartment (MIIC). Finally, the proteolytic degradation of MIIC substrates is,

D Springer

at least in part, completed by enzymes specifically expressed by cTECs, which include Cathepsin L and Tssp.

Nevertheless, the PS mechanism is not completely understood. The elusive set of proteases and/or genes involved in such a mechanism has yet to be identified. In this regard, the search for genes that show the same expression profiling is an adequate approach that could to facilitate to solve this need.

Genes that share the same transcription profile with a given gene considered a transcriptional marker may participate in a common biological process, independent of sequence similarities. This presumption has oriented previous studies in the search of candidate genes or pathways to specific biological processes based on microarray gene expression signatures [11, 12].

In this study, we used the expression profile of the *Prss16* gene, which was considered a transcriptional marker, to identify additional genes that share the same expression profile and that encode for peptidases. These genes can be considered as candidates involved in the generation of self-peptides in the thymus and consequently in PS.

Materials and methods

Animals, cTEC 1.4C18 thymic cell line, thymi and preparation of RNA samples

All mice used in this study were of the C57BL/6 background, and the knockout (KO) *Prss16*-deficient mice were previously obtained by homologous recombination in embryonic stem (ES) cells of a targeting vector carrying the Neo resistance gene marker, which allowed the replacement of exons 8–12 of the *Prss16* gene in the KO mice [8].

The cortical 1.4C18 thymic epithelial cell line was established from C57BL/6 mice [13] and the cortical phenotype was determined with a Th-3 antibody and further evaluated using a panel of anti-cytokeratin antibodies, which confirmed the original distinct cortical phenotype [14]. Cells were cultured in 10% fetal bovine serum-supplemented RPMI 1640 medium (GIBCO) at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere.

Total RNA extraction from cTECs or thymi was performed using Trizol[®] reagent according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). RNA preparations were confirmed to be free of proteins or phenol using UV spectrophotometry. The quality of the RNA samples was assessed by microfluidic electrophoresis using an Agilent 2100 Bioanalyzer and RNA 6000 nano chips (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Only samples with peaks of 28S, 18S, 5S and 4S RNA species

28S/18S ratio ≈ 2.0 and RNA Integrity Number (RIN) ≥ 9.0 were used.

The animal experimental protocols were developed in accordance with the Brazilian laws of ethics in animal research with protocols approved by French laws and European directives.

Gene expression analysis using microarrays

Thymic gene expression was assessed using glass slide microarrays prepared on silane-coated UltraGAPS slides (#40015, Corning[®], New York, NY, USA). The arrays contained a total of 4,500 cDNA sequences, which represented most murine tissue antigens, transcription factors, structural proteins and metabolic enzymes, including those involved with intracellular proteolysis. Sequences were obtained from the Soares thymus 2NbMT normalized library, which represents the expressed sequence tag (EST) cDNA clones prepared from the thymus of a four-week-old male C57BL/6 J mouse and is available at the IMAGE Consortium (http://image.hudsonalpha.org).

The microarrays were prepared using a Generation III Array Spotter (Amersham Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA) using PCR products from cDNA clones. A complete file providing all genes and ESTs present in the microarray used in this study, as well as the quantitative data and experimental conditions, is available online at the MIAME public database (http://www.mged.org/Work groups/MIAME/miame.html), accession number E-MEXP-2829.

Labeled cDNA preparation and microarray hybridization

The cDNA from the thymus was prepared by reverse transcription using 10 μ g of total RNA. The cDNA samples were monocolor labeled with a Cy3 fluorochrome using the CyScribe post-labeling kit (GE Healthcare Biosciences). Samples were hybridized to the slide for 15 h and then washed using an automatic slide processor system (ASP, Amersham Biosciences). Microarrays were scanned in a Generation III laser scanner (Amersham Biosciences).

As a reference for the hybridization procedure, we used equimolar quantities of cDNA obtained from an irrelevant total RNA sample (C57BL/6 thymus total RNA). This approach allowed us to estimate the relative amount of target cDNA in each microarray spot.

Microarray data analysis

Microarray images were quantified using the Spotfinder software (http://www.tm4.org/spotfinder.html) and normalized using the R platform (http://www.r-project.org). Statistical analyses were performed using Multiexperiment Viewer (MeV) software (version 3.1) (http://www.tm4. org/mev.html). Differentially expressed genes were identified using the Significance Analysis of Microarrays (SAM) program [15], and we considered only those genes with a false discovery rate (FDR) ≤ 0.01 .

To analyze the gene expression profiles from the SAM program data set, we used a hierarchical clustering method with Pearson correlation metrics, which grouped genes on the vertical axis and samples on the horizontal axis using similarity in their expression patterns. The similarities and dissimilarities in gene expression are presented as both heat maps and dendrograms in which the pattern and length of the branches reflect the relatedness of the samples or genes [16] (Cluster version 3.0 and Java Tree View) (http:// rana.lbl.gov/EisenSoftware.html).

Gene ontology

Gene ontology (GO) of the differentially expressed genes was retrieved from SOURCE (http://smd.stanford.edu/cgibin/source/sourceSearch) [17] and/or DAVID (functional annotation clustering) (http://david.abcc.nciferf.gov) [18, 19] web tools, which were used to reorganize the differentially expressed genes according to their respective molecular/biological functions, including those that code for endopeptidase enzymes functionally similar to *Prss16*.

Oligonucleotide primer design and quantitative realtime polymerase chain reaction (qRT-PCR)

Transcription levels of endopeptidase genes (Prss16, Casp1, Casp2, Psmb3, Tpp2 and Capns1), which were differentially expressed between control and KO mice, were also assayed by qRT-PCR. The cDNA sequences of these genes were retrieved from the NCBI GenBank database (http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank) using the following accession numbers: Prss16 (Thymus specific serine protease 16, NM_019429.2), Casp1 (Caspase 1, NM_009807.2), Casp2 (Caspase 2, NM_007610.1), Psmb3 (Proteasome-Prosome, macropain-subunit beta type 3, NM_011971.4), Tpp2 (Tripeptidyl peptidase II, NM_009418.2) and Capns1 (Calpain, small subunit 1, NM_009795.3). The Primer3 web tool (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www. cgi) was used to select pairs of oligonucleotide primers spanning an intron/exon junction with an optimal melting temperature of 60°C (Table 1). The cDNA samples were prepared using the Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA) enzyme as recommended. Expression of the abovementioned genes was quantified using a StepOne real-time PCR system (Applied Biosystems, USA) and normalized to the expression of the Hprt

Springer

Table 1 Oligonucleotide primers used in qRT-PCRs	Gene	5'-3' Forward	5'-3' Reverse
	Prss16 ^a	GGAGCCACCCAAGTACTGTT	AGCAGTGGGAAGCACTAGGA
	Tpp2 ^a	GATCATGGTGTTGGCATTGA	AAATGGCTGGGACACTGAAC
	Psmb3 ^a	GGCCAACCTCCTGTATGAGA	ACAGCCAATGAGGTCCAGAG
	Capns1 ^a	AGCAGGATTCCACCTGAATG	ACATGGCATCTAGCCTGACC
	Casp1 ^b	CCTCAGAAACAAAGGAAGAACAGAA	ACGAGTGGTTGTATTCATTATTGGATA
	Casp2 ^b	AGCCATGCACTCCTGAGTTTTAC	CCAGGTCTTTCTCTCCAGTGAAGT
Melting temperature "60°C, b62°C	Hprt ^{a,b}	GCCCCAAAATGGTTAAGGTT	CAAGGGCATATCCAACAACA

gene (NM_013556.2), which is frequently used for this purpose.

Protein sequence alignments

The respective amino acid sequences of the encoded endopeptidases Casp1 (NP_033937.2), Casp2 (NP_031636.1), Psmb3 (NP_036101.1) and Tpp2 (NP_033444.1) were aligned to Tssp (NP_062302.1) using the COBALT multiple alignment tool (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/). This web tool does progressive multiple alignments of protein sequences and generates a phylogenetic tree. The alignment is aided by a collection of pairwise constraints derived from conserved domain database, protein motif database, and local sequence similarity using RPS-BLAST, BLASTP, and PHI-BLAST, respectively. Computation time is reduced by forming clusters of sequences that share a large number of common words and finding conserved domains and motif matches for only one sequence per cluster [20].

Results

Genes differentially expressed in the thymus of wild-type and *Prss16*-KO mice

The expression levels for the majority of the 4,500 transcript sequences present in the microarray used in this study remained unchanged between WT and *Prss16*-KO thymus, which presented $d(i) \approx d_E(i)$. However, 223 sequences (115 known genes and 108 ESTs with unknown function) were found to be significantly modulated, and we were able to identify clusters of repressed and induced genes.

To identify changes in the gene expression profiles associated with the *Prss16*-KO, we compared the WT thymus with the *Prss16*-KO thymus. The hierarchical cluster analysis of the 223 modulated sequences obtained with the SAM program and comparison of the hybridization signatures showed variability between these two sample types. The dendrogram demonstrated that this variability could distinguish WT from KO mice and consequently the effect of a lack of *Prss16* expression on the

Springer

expression of other genes. The *Prss16*-KO thymus featured an induction of 61 genes and a repression of 54 known genes including *Prss16*, as expected (Fig. 1).

Gene ontology of the differentially expressed genes

The set of 115 differentially expressed genes (repressed or induced) was then reorganized according to their respective molecular/biological functions using the DAVID functional annotation tool and/or SOURCE. We identified genes that were repressed in the thymus of KO mice as *Prss16* was repressed. Table 2 shows the modulated genes, which were organized according to their molecular functions. Note that *Casp1*, *Casp2*, *Psmb3*, *Tpp2* and *Prss16* are repressed genes that code for endopeptidases *Prss16* and *Tpp2* are functionally related because they code for serine-peptidases, while *Capns1* was induced and codes for an endopeptidase.

Gene expression assessed by qRT-PCR

The differentially expressed genes that code for endopeptidases to allow distinguishing between the biological samples by hierarchical clustering of microarray data were selected to be assayed by qRT-PCR.

The microarray results for the genes *Casp1*, *Casp2*, *Prss16* and *Tpp2*, which were repressed in the *Prss16*-KO thymus and *Capns1* which was induced, were confirmed by qRT-PCR. However, *Psmb3* featured comparable expression levels for both WT and KO mice (Fig. 2).

Additionally, we showed that these genes were expressed in the cortical thymus epithelial cells as assaying cTEC 1.4C18 cell line (Fig. 3).

Protein sequence alignments

Amino acid sequence dissimilarity exceeded the maximum divergence between Tssp and Casp1 or Tssp and Casp2. The sequence identity observed between Tssp and Tpp2 or Tssp and Psmb3, although slight, allowed us to construct a phylogenetic tree with 0.9 maximum sequence divergences (Fig. 4).

Fig. 1 Hierarchical clustering analysis of gene expression microarray data of wild-type (WT) and *Prss16* knockout (KO) C57BL/6 mice thymi. Note that *Prss16*, *Casp1*, *Casp2*, *Psmb3* and *Tpp2* were downregulated in KO mice and *Capns1* was up-regulated. Genes above mentioned are highlighted into rectangles



Discussion

Thymus-specific serine protease (Tssp) is involved in PS of CD4⁺ T lymphocytes and was the first serine protease identified to most probably play a role in the presentation of self-peptides bound to MHC class II complexes in the thymus [8].

In this study, we assessed the hypothesis that the transcriptional profiling of Prss16, the gene that encodes Tssp, might be used as a reference to identify additional endopeptidase genes that share the same profiling in the thymus. We employed microarray hybridizations and dedicated bioinformatic programs, such as SAM [15] and hierarchical clustering [16] to find the differentially expressed genes that share the same profile as the Prss16 gene.

Expression profiling of thymuses from WT compared to *Prss16*-KO mice featured a set of 115 induced and repressed known genes, including *Prss16*, which was repressed in KO mice, as expected (Fig. 1). These genes were then sub-grouped according to their respective gene ontology (GO). The sub-group was of interest for this study because it comprised the *Prss16* gene and four other endopeptidase genes (*Casp 1, Casp 2, Psmb3* and *Tpp 2*) that were down-regulated in the thymuses of *Prss16*-KO mice and one endopeptidase gene (*Capns1*) that was up-regulated in these thymuses (Fig. 1).

This approach was adequate to identify additional peptidase genes, which despite their dissimilarities in the amino acid sequences of the respective encoded proteins, had a similar molecular function and/or intra-cellular location to *Prss16*.

The mechanism by which the loss of *Prss16* gene in KO mice affects expression of other protease genes was not exploited in this study. However, the thymic expression profile of KO mice served to demonstrate their inter-dependence. These findings confirmed our starting hypothesis.

Thus, the peptidases encoded by these genes might be novel candidates for the self-peptide trimming mechanism in the thymus. Their ontology supports this presumption.

Caspase 1 (Casp1) is a heterotetramer of two anti-parallel-arranged heterodimers. This cytoplasmic peptidase may be a component of inflamasome, a protein complex whose function is the activation of proinflammatory caspases [21]. The enzyme is a cysteine-type endopeptidase with a strict requirement for catalytic activity; an Asp residue fits into the preferred cleavage sequence of Tyr-Val-Ala-Asp [22].

Caspase 2 (Casp2) is a heterotetramer that consists of two anti-parallel-arranged heterodimers. Although its role is not yet completely understood, this cytoplasmic peptidase has long been recognized as an important regulator of apoptosis [23]. The enzyme is a cysteine-type



Fig. 2 Relative expression of *Prss16*, *Tpp2*, *Psmb3*, *Casp1*, *Casp2* and *Capns1* genes in the thymus of wild-type (WT) or *Prss16* knockout (KO) mice as assessed by quantitative real-time PCR. Expression values were normalized to *Hprt* expression. The differences between expression levels were evaluated by Welch's *t* test. *P < 0.05; **P < 0.01 were considered significant

Psmb3

Genes

Casp1

Casp2

Capns1



Fig. 3 Expression levels of *Prss16*, *Tpp2*, *Psmb3*, *Casp1*, *Casp2* and *Capns1* genes in cortical thymus epithelial cells (1.4C18 cTEC cell line) as assessed by quantitative real-time PCR. Expression values were normalized to *Hprt* expression. The differences between expression levels were evaluated by one-way ANOVA followed by Bonferroni's correction. (***P < 0.001 was considered significant)

Deringer

0.0

Prss16

Tpp2

endopeptidase with a strict requirement for an Asp residue, which is essential for its proteolytic activity and preferred cleavage sequence of Val-Asp-Val-Ala-Asp [22].

The Proteasome (prosome, macropain) subunit beta type 3 (Psmb3) is involved with the protein catabolic process in the cytoplasm. It is a threonine-type endopeptidase with a cellular component that is the 20 S proteasome core complex [24]. In fact, most mammalian tissues express "constitutive" proteasomes, and their proteolytic activity is mediated by the proteasome subunit β 1 (Psmb6). Other subunits of proteasomes are present in constitutive proteasomes (Psmb6, Psmb5 and Psmb7), immunoproteasomes (Psmb9, Psmb10 and Psmb11) [2]. To the best of our knowledge, this is the first report showing that the Psmb3 subunit gene is differentially expressed in the thymus of *Prss16*-KO mice.

Tripeptidyl peptidase II (Tpp2) is a serine-type endopeptidase, and its catalytic activity involves the release of an N-terminal tripeptide from a polypeptide. Its function is associated with the proteolytic cascade acting downstream of the 26S proteasome in the ubiquitin–proteasome pathway [25].

The calpain family of calcium-dependent cytosolic proteases regulates multiple cellular functions such as spreading and migration, cell death, transcription and signaling [26]. Its involvement in a multiplicity of complex pathologies such as muscular dystrophies, neurodegeneration, type

II diabetes and cancer has been well documented [27], although its role in the pathogenesis and disease progression has not been completely clarified. Most of the cellular calpain activity is due to the ubiquitous micro- and millicalpain, requiring micro and millimolar calcium concentrations, respectively, for its function. Ubiquitous calpains are heterodimers consisting of an 80-kDa catalytic subunit and of a common 28-kDa regulatory subunit, calpain small-1 (Capns1), encoded by Capns1 gene [26], required for function [28]. Our results show that this gene was induced only in *Prss16*-KO mice suggesting its participation in increasing the endopeptidase activity in the thymus of these animals.

The phylogenetic tree depicted in Fig. 4 shows that Psmb3 and Tpp2 feature amino acid sequence similarity with Tssp (*Prss16*), as determined by the COBALT web tool.

We highlighted *Tpp2* because it encodes a serine-type endopeptidase. Considering that *Casp1*, *Casp2*, *Psmb3* and *Tpp2* genes share the same regulation to *Prss16*, including in the thymus of KO mice and that these genes encoded for endopeptidases, we suggest that these genes and/or their encoded enzymes might be considered new candidate that play a role in the self-peptide generation in the thymus, which is important for the process of PS.

Acknowledgments This study was financed by Conselho Nacional de Desenvolvimento Cientifico e Tecnológico (CNPq, Brazil), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Brazil) and Institut National de la Sante et de la Recherche Medicale (INSERM, France). The cortical 1.4C18 thymic epithelial cell line was kindly provided by Dr. W. Savino from the Oswaldo Cruz Institute, Laboratory on Thymus Research, Rio de Janeiro, Brazil. We thank Dr. Elza T. Sakamoto-Hojo and Dr. Eduardo A. Donadi from the University of São Paulo, campus of Ribeirão Preto, Brazil, for the laboratory facilities and Dr. Sylvie Guerder from the INSERM (U563, Toulouse, France) and Dr. Daniel M. Jorge (Bioinformatics Group, Department of Genetics, University of São Paulo, campus of Ribeirão Preto, Brazil) for their discussions.

References

- 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
- Groettrup M, Kirk CJ, Basler M (2010) Proteasomes in immune cells: more than peptide producers? Nat Rev Immunol 10:73–77
 Kyewski B, Derbinski J (2004) Self-representation in the thymus:
- Kyewski B, Deroinski J (2004) Self-representation in the tr an extended view. Nat Rev Immunol 4:688–698
- Magalhães DA, Silveira EL, Junta CM, Sandrin-Garcia P, Fachin AL, Donadi EA, Sakamoto-Hojo ET, Passos GA (2006) Promiscuous gene expression in the thymus: the root of central tolerance. Clin Dev Immunol 13:81–99
- Klein L, Kyewski B (2000) Self-antigen presentation by thymic stromal cells: a subtle division of labor. Curr Opin Immunol 12:179–186
- Anderson G, Jenkinson EJ (2001) Lymphostromal interactions in thymic development and function. Nat Rev Immunol 1:31–40
- Honey K, Rudensky AY (2003) Lysosomal cysteine proteases regulate antigen presentation. Nat Rev Immunol 3:472–482

- Gommeaux J, Gregoire C, Nguessan P, Richelme M, Malissen M, Guerder S, Malissen B, Carrier A (2009) Thymus-specific serine protease regulates positive selection of a subset of CD4⁺ thymocytes. Eur J Immunol 39:956–964
- Bowlus CL, Ahn J, Chu T, Gruen JR (1999) Cloning of a novel MHC-encoded serine peptidase highly expressed by cortical epithelial cells of the thymus. Cell Immunol 196:80–86
- Carrier A, Nguyen C, Victorero G, Grandjeaud S, Rocha D, Bernard K, Miazek A, Ferrier P, malissen M, Naquet P, Malissen B, Jordan BR (1999) Differential gene expression in CD3e- and RAG1 deficient thymuses: definition of a set of genes potentially involved in thymocyte maturation. Immunogenetics 50:255– 270
- Tenenbaum JD, Walker MG, Utz PJ, Buttle AJ (2008) Expression-based pathway signature analysis (EPSA): mining publicly available microarray data for insight into human disease. BMC Med Genomics 1:51
- Yi M, Mudunuri U, Che A, Stephens RM (2009) Seeking unique and common biological themes in multiple gene lists or databases: pathway pattern extraction pipeline for pathway-level comparative analysis. BMC Bioinformatics 10:200
- 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 8:349–360
- Nihei OK, Carvalho AC, Spray DC, Savino W, Alves LA (2003) A novel form of cellular communication among thymic epithelial cells: intercellular calcium wave propagation. Am J Cell Physiol 285:C1304–C1313
- Tusher VG, Tibishirani R, Chu G (2001) Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. Proc Natl Acad Sci USA 98:5116–5121
- Eisen M, Spellman P, Brown P, Botstein D (1998) Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. Proc Natl Acad Sci USA 95:14863–14868
- Diehn M, Sherlock G, Binkley G, Jin H, Matese JC, Hernandez-Boussard T, Rees CA, Cherry JM, Botstein D, Brown PO, Alizadeh AA (2003) SOURCE: a unified genomic resource of functional annotations, ontologies, and gene expression data. Nucleic Acids Res 31(1):219–223
- Dennis G Jr, Shermam BT, Hosack DA, Yang J, Gao W, Lane HC, Lempicki RA (2003) DAVID: Database for annotation, visualization and integrated discovery. Genome Biol 4(5):P3
- visualization and integrated discovery. Genome Biol 4(5):P3
 Huang DW. Sherman BT. Lempicki RA (2009) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. Nat Protoc 4:44–57
- Papadopoulos JS, Agarwala R (2007) COBALT: constraint-based alignment tool for multiple protein sequences. Bioinformatics 23:1073–1079
- Franchi L, Warner N, Viani K, Nunez G (2009) Function of nodlike receptors in microbial recognition and host defense. Immunol Rev 227:106–128
- van de Craen M, Vandenabeele P, Declercq W, van den Brande I, van Loo G, Molemans F, Schotte P, van Criekinge W, Beyaert R, Fiers W (1997) Characterization of seven murine caspase family members. FEBS Lett 403:61–69
- 23. Vakifahmetoglu-Norberg H, Zhivotovsky B (2010) The unpredictable caspase 2: what can it do. Trends Cell Biol 20:150–159
- Elenich LA, Nandi D, Kent EA, McCluskey TS, Cruz M, Iyer MN, Woodward EC, Conn CW, Ochoa AL, Ginsburg DB, Monaco JJ (1999) The complete primary structure of mouse 20 S proteasome. Immunogenetics 49:835–842
- Lindas AC, Eriksson S, Jozsa E, Tomkinson B (2008) Investigation of a role for Glu-331 and Glu-305 in substrate binding of tripeptidyl-peptidase II. Biochim Biophys Acta 1784:1899–1907

Deringer

- Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W, Cong J (2003) The cal-pain system. Physiol Rev 83:731–801
 Zatz M, Starling A (2005) Calpains and disease. N Engl J Med 352:2413–2423
- Arthur JS, Elce JS, Hegadorn C, Williams K, Greer PA (2000) Disruption of the murine calpain small subunit gene, Capn4: calpain is essential for embryonic development but not for cell growth and division. Mol Cell Biol 20:4474–4481

2 Springer

Mol Cell Biochem (2010) 342:21–28 DOI 10.1007/s11010-010-0464-z

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)

Thaís A. Fornari · Paula B. Donate · Claudia Macedo · Márcia M. C. Marques · Danielle A. Magalhães · Geraldo A. S. Passos

Received: 19 November 2009/Accepted: 12 April 2010/Published online: 23 April 2010 © Springer Science+Business Media, LLC. 2010

Abstract Gene expression of peripheral tissue antigens (PTAs) in stromal medullary thymic epithelial cells (mTECs) is a key process to the negative selection of autoreactive thymocytes. This phenomenon was termed "promiscuous gene expression" (PGE), which is partially controlled by the Aire gene. Nevertheless, reasons for the correlation of Aire and PTAs with the emergence of autoimmune diseases are largely unknown, though it may be a result of a chronological effect. Although the effect of Aire mutations in pathogenic autoimmunity is well know, it could not be a unique cause for autoimmunity. Independently of mutations, temporal deregulation of Aire expression may imbalance Aire-dependent PTAs and/or wide PGE. This deregulation may be an early warning sign for autoimmune diseases as it guarantees autoantigen representation in the thymus. To assess this hypothesis, we studied the expression levels of Aire, Aire-dependent (Ins2) and Aire-independent (Gad67 and Col2a1) PTAs

Thais A. Fornari and Paula B. Donate contributed equally to this study.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s11010-010-0464-z) contains supplementary material, which is available to authorized users.

T. A. Fornari \cdot P. B. Donate \cdot C. Macedo \cdot M. M. C. Marques \cdot D. A. Magalhães \cdot G. A. S. Passos ())

Molecular Immunogenetics Group, Department of Genetics, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo (USP), 3900 Via Bandeirantes, Ribeirão Preto, SP 14040-900, Brazil

e-mail: passos@rge.fmrp.usp.br

G. A. S. Passos

Disciplines of Genetics and Molecular Biology, Department of Morphology (MEF), Faculty of Dentistry of Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto, SP 14040-904, Brazil using real-time-PCR of the thymic stromal cells of NOD mice during the development of autoimmune type 1 diabetes mellitus (DM-1). Wide PGE was studied by microarrays in which the PTA genes were identified through parallel CD80⁺ mTEC 3.10 cell line expression profiling. The results show that Aire gene was down-regulated in young pre-autoimmune (pre-diabetic) NOD mice. PGE and specific PTA genes were down-regulated in adult autoimmune diabetic animals. These findings represent evidence indicating that chronological deregulation of genes important to negative selection may be associated with the development of an autoimmune disease (DM-1) in mice.

Keywords Aire gene · Chronological gene expression · Non-obese diabetic (NOD) · Thymic stromal cells · Type 1 diabetes mellitus

Introduction

An extremely diverse repertoire of T cells is generated through the random rearrangement of T cell receptors (TCR) gene segments. Nevertheless, this random process generates autoreactive T cells that must be eliminated through negative selection. This process occurs in medullary thymic epithelial cells (mTECs), located in the thymic stroma, which plays an essential role in preventing pathogenic autoimmune reactions and/or autoimmune diseases. The mTECs are essentially self-antigen-presenting cells. Thymocytes are presented by the major histocompatibility complex (MHC) with peptides coded from peripheral tissue antigen (PTA) genes that represent self antigens of most parenchymal organs. Dendritic cells (DCs) also participate in the negative selection process after they have acquired PTA peptides from mTECs [1–8].

Springer

Mol Cell Biochem (2010) 342:21-28

The signals delivered to the TCR by peptide/MHC initiate a signal transduction cascade in the autoreactive thymocytes that induces apoptosis (death by neglect) [5].

22

Understanding of the negative selection process of nascent thymocytes and central tolerance mechanisms has been furthered by evidence that PTA genes are normally expressed in the thymic stroma by murine and human mTECs [2, 3, 9-11]. This phenomenon was termed promiscuous gene expression (PGE) [2, 3, 10, 12-16]. Our understanding of central tolerance has recently been reversed with evidence of PGE in the thymus: a more unorthodox conception of the possible mechanism of self-non-self discrimination is taking shape [17-19]. Evidence for PGE was initially biased towards antigens involved in autoimmune reactions, such as insulin, myelin basic protein, or the acetylcholine receptor. It is currently understood that PGE is not as selective as once thought, but instead encompasses a very large set of genes that may include up to 5-10% of the known mouse genes [3]. Therefore, heterogeneous gene expression in the thymus is most likely associated with maintaining immunological homeostasis in the body and controlling pathogenic autoimmune reactions.

PGE is partly controlled by the autoimmune regulator (Aire) gene, which acts as a transcriptional activator for several PTA genes [20]. In fact, mutations in Aire lead to severe, multi-organ, tissue-specific autoimmunity in both mice and humans [20, 21].

Current evidence suggests that the basis of self-tolerance control in the thymus is dependent on mTEC expression of promiscuously genes that code for PTAs [1–3, 6, 8–10, 12]. Exposure of differentiating thymocytes to a large variety of PTAs ensures the negative selection of self-reactive clones of nascent T cells and prevents aggressive autoimmune reactions that lead to autoimmune diseases [2, 20].

Patients with autoimmune-polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal-dystrophy (APECED) feature mutations along the Aire gene sequence, which evidentiate its role in the control of autoimmunity, i.e., this gene when mutated triggers aggressive autoimmunity [21, 22].

The functional role of Aire was elegantly demonstrated using a KO mouse model system. Aire (in mice and humans) codes for a transcription factor that positively controls the expression of some PTAs, but it can also act as negative regulator of other genes [15, 20, 23, 24]. This gene is preferentially expressed in mTECs [2, 20, 25, 26], and mTEC association with PTA control has been demonstrated in Aire-KO mice. Aire-deficient mTECs had reduced expression of PTA-encoding mRNAs, such as insulin, salivary gland proteins and caseins [15, 20].

Deringer

The discovery of Aire's role as a transcriptional controller of PTA genes has generated interest in the intrinsic genetic factors controlling Aire. In fact the different genetic backgrounds of inbred mouse strains influence temporal thymocyte maturation and the kinetics of gene expression for several interleukins in the thymus, including IL-7 [27]. Different murine models have genetically regulated expression levels of autoantigens as insulin in the thymus [28]. In man, susceptibility to DM-1 correlates with a polymorphism in the promoter region of the insulin gene and its transcription level in the thymus [29, 30]. Moreover, the individual variations in Aire and PTA expression levels in mTECs are high in humans [31].

The expression of Aire and the manifestation of autoimmune diseases are also affected by the different murine genetic backgrounds; NOD mice deficient for Aire develop severe exocrine pancreatitis, which is not observed in C57BL/6 or BALB/c mice. Moreover, epigenetic or stochastic mechanisms may be implicated in such variability [32].

Using an artificial vector-based model system, it was possible to demonstrate that Aire expression in NOD mouse thymus is important during perinatal period to prevent autoimmunity [33].

Nevertheless, reasons for the correlation of Aire and PTAs with the emergence of autoimmune diseases are largely unknown, though it may be a result of a chronological effect. As the majority of autoimmune diseases in man emerge between puberty and adulthood, it is possible that the expression levels of these genes in the thymus differ between the healthy and diseased individuals.

In this study, we consider that beside gene mutations, as previously described in the literature, transcriptional deregulation of Aire, PTA, and/or genes featuring PGE might alter the negative selection of autoreactive thymocytes by mTECs and contribute to the onset of autoimmune diseases in genetically susceptible animals.

Considering that expression of Aire in the perinatal period of non-obese diabetic (NOD) mice is both necessary and sufficient to induce self-tolerance, as recently demonstrated using a transcriptionally "on-off" manipulated model-system [33], in this study, we hypothesize that onset of autoimmune type 1 diabetes mellitus (DM-1) in nonmanipulated NOD mice might be associated to early transcriptional deregulation of Aire and/or genes featuring PGE in the thymus.

To assess this hypothesis, we studied Aire, PTA and PGE expression of the thymic stroma in groups of pre-autoimmune (pre-diabetic) and autoimmune (diabetic) of NOD mice; a well-established autoimmune mouse model in which older animals (~ 20 weeks of age) develop DM-1.

Mol Cell Biochem (2010) 342:21-28

Materials and methods

Animals, thymic stroma separation, mTEC 3.10 cell strain and total RNA preparation

The female NOD mice were born in SPF (specific pathogen free) conditions at the CEMIB-UNICAMP animal facility (University of Campinas, SP, Brazil) and maintained in SPF mini-isolators in our laboratory at the University of São Paulo, Campus of Ribeirão Preto, Brazil, during the experiment. We studied pre-diabetic (8 \pm 2-week-old) and diabetic animals (20 \pm 2-week-old). Diabetes was confirmed by blood glucose levels (≥250 mg glucose/dl) using Accu Check-Active Kit (Roche Diagnóstica Brasil, São Paulo, Brazil). The thymic stroma was separated from the whole thymus, as previously described [34]. In brief, two or three 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°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 remaining thymocytes were dispersed by successive pipetting. Medium was changed two to three times after agitations, with fragments recovered by settling each time. The thymic fragments were then incubated in 5 ml of 0.125% (w/v) collagenase type II with 0.1% DNAse I (both from Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in RPMI 1640 at 37°C for 15 min, with gentle agitation every 5 min using a 1 ml pipettor. After three to four digestions, stromal cells were pooled and centrifuged at 450g for 5 min and finally resuspended in 200 µl PBS. These cells were then used for total RNA preparation.

The mTEC 3.10 medullary thymic epithelial cell line was established from C57BL/6 mice, and the medullary phenotype was determined by immunostaining with anticytokeratin monoclonal antibodies, which confirmed the original distinct medullary phenotype [35]. In addition this cell line constitutively expresses Aire [36]. The CD80⁺ phenotype was confirmed using fluorescent activated cell sorting (FACS) analysis (data not shown). Cells were cultured in 10% fetal bovine serum-supplemented (Cultilab, Campinas, SP, Brazil) RPMI 1640 medium (Sigma-Aldrich TM. St Louis, MO, USA) at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. Total RNA was extracted from 1×10^7 stromal cells (from pre- or diabetic animals) and 1×10^7 mTEC 3.10 cells using Trizol ® reagent following the manufacturer's instructions (Invitrogen). RNA preparations were confirmed to be free of proteins and phenol using UV spectrophotometry. The state of degradation was assessed using agarose gel electrophoresis (ethidium bromide staining) (data not shown). Only RNA samples that were free of proteins, phenol, and degradation were used. The animal

experimental protocol was previously approved by the Ethical Commission of Ethics in Animal Research, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, USP, Brazil (Protocol # 021/ 2006).

Gene expression analysis using microarrays

Gene expression in the thymic stroma and the mTEC 3.10 cell line was assessed using glass slide cDNA microarrays prepared on silane-coated UltraGAPS slides (# 40015, Corning[®], New York, NY, USA). The arrays contained a total of 4,500 target tissue-restricted antigen cDNA sequences that represented most murine tissues and organs. Sequences were obtained from the Soares thymus 2NbMT normalized library that represented expressed sequence tag (ESTs) clones prepared from the thymus of a C57BL/6J 4-week-old male mouse, and available at the IMAGE Consortium (http://image.hudsonalpha.org).

The microarrays were prepared based on published protocols using PCR products from the cDNA clones [37] and a Generation III Array Spotter (Amersham Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA). A complete file that provides all of the genes and ESTs present in the microarrays used in this study, as well as the experimental conditions, is available on line at MIAME public database (http://www.mged.org/Workgroups/MIAME/miame.html) Array Express accession E-MEXP 2339.

The cDNA complex probes derived from the total RNA obtained from thymic stroma or mTEC 3.10 cells were prepared by reverse transcription using 10 µg of total RNA. The cDNA samples were monocolor labeled with Cy3 fluorochrome using the CyScribe post-labeling kit (GE Healthcare Biosciences). Samples were hybridized for 15 h and then washed with an automatic slide processor system (ASP, Amersham Biosciences). Microarrays were scanned using a Generation III laser scanner (Amersham Biosciences).

As a reference for the hybridization procedure, we used equimolar quantities of cDNAs obtained from unrelated total RNA (mouse thymus total RNA). This approach allowed us to estimate the amount of target cDNA in each microarray spot.

Microarray data analysis

Microarray images were quantified using the Spotfinder software (http://www.tm4.org/Spotfinder.html) and normalized using the R platform (http://www.r-project.org). The statistical analyses were performed by the Multiexperiment Viewer (MeV) software (version 3.1) (http:// www.tm4.org/mev.html).

The differentially expressed genes (induced or repressed) were identified by using the significance analysis of

D Springer

Mol Cell Biochem (2010) 342:21-28

microarrays program (SAM) (http://www-stat.stanford.edu/ ~tibs/SAM/) [38] considering only those genes presenting FDR (false discovery rate) ≤ 0.03 .

To analyze the gene expression profiles of the SAM data set, we used a hierarchical clustering method that grouped genes on the vertical axis and samples on the horizontal axis, using similarity in their expression patterns. 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 as heat maps [39] cluster version 3.0 and Java Tree View (http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.html).

Determination of promiscuous gene expression

The microarray analysis data was used to identify PGE based on combined information from the public database BioGPS (formerly GNF SymAtlas) (http://biogps.gnf.org/?referer=symatlas#goto=welcome) [40]. This data bank shows gene expression in more than 60 mouse tissue/organs, as assessed by gene array analysis using Affymetrix microarrays. Data information includes GenBank accession number, chromosomal location, tissue/organ representation and the molecular/biological function of each gene analyzed.

In this study, promiscuous genes were selected on the basis of their expression levels in different organs/tissues, which were upper than the median in relation to all other organs. The transcription level modulations (repression or induction) of these genes were evaluated by comparing thymic stroma of pre-diabetic and diabetic animals with mTEC 3.10 cells.

Oligonucleotide primer design and quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)

Microarray data were confirmed using qRT-PCR of two PTA genes (Hnrpl and Nsd1) that differed between prediabetic and diabetic animals; the genes were selected based on their expression pattern and hierarchical clustering. The Aire and three autoantigen genes (Gad67, Ins2 and Col2a1) were selected because their sequences were not included in the microarray used in this study. The cDNA sequences of these genes were retrieved from the NCBI GenBank database (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank) using the following accession numbers: Hnrpl (Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L-NM_177301.4), Nsd1 (nuclear receptor-binding SET-domain protein 1-NM_008739.3), Aire (Autoimmune regulator-NM_009646.1), Gad67 (Gad1) (Glutamic acid decarboxylase 1-NM_008077.3), Ins2 (Insulin II-NM_008387.3) and Col2a1 (Collagen, type II, alpha 1-NM_031163.2). The Primer3 web tool (http:// biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi) was used to select pairs of oligonucleotide primers spanning an intron/exon junction with an optimal melting temperature of 60°C (Table 1). The cDNA samples were prepared using Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) enzyme, as recommended. Expression of the abovementioned genes was quantified using a 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) and normalized to the expression of the housekeeping gene Gapdh (NM_008084.2).

Results

Genes differentially expressed in the thymic stroma of pre-diabetic, diabetic and mTEC 3.10 cells

Although the expression pattern remained unchanged between pre-diabetic and diabetic thymic stroma for the majority of the 4,500 sequences tested (presented $d(i) \approx d_E(i)$), 1,540 were found as significantly modulated. It was possible to identify clusters of repressed and induced genes. The detailed color heat-map with gene symbols is available online in our laboratory website (http://www.rge.fmrp.usp.br/passos/NOD_PGE).

To identify changes in the gene expression profiles of pre-diabetic and diabetic NOD mice, we compared young (8-week-old mice) thymic stroma with older (20-week-old mice) thymic stroma, respectively. Parallel expression profiling of mTEC 3.10 cells served as a parameter to better identify the genes characterizing PGE. Expression profiling of thymic stromal cells (3.10 mTEC) from a

Table 1 Oligonucleotide primers used in qRT-PCR	Gene	Forward	Reverse
	Hnrpl	5' CTGGAGTGGGACTCGAAGAG 3'	5' TGCAGTGGAGAAGCACAACT 3'
	Nsd1	5' GCCGTTAGCTCCTCAAACTG 3'	5' ACGGTAACGTTCGTGTCTCC 3'
	Aire	5' GCAACTCTGGCCTCAAAGAG 3'	5' GGTCTGAATTCCGTTTCCAA 3'
	Gad67	5' TCACCCTCGATTTTTCAACC 3'	5' AACAAACACGGGTGCAATTT 3'
	Ins2	5' ACCTTCAGACCTTGGCACTG 3'	5' GCTGGGTAGTGGTGGGTCTA 3'
	Col2a1	5' AACACTTTCCAACCGCAGTC 3'	5' TCTGCCCAGTTCAGGTCTCT 3'
Melting temperature = 60°C	Gapdh	5' GGGTGTGAACCACGAGAAAT 3'	5' CCTTCCACAATGCCAAAGTT 3'

6 1

Deringer

Mol Cell Biochem (2010) 342:21-28



Fig. 1 Hierarchical clustering of mTEC 3.10 cell line, pre-diabetic and diabetic stroma of NOD mice based on cDNA microarray gene expression profiling, Dendrogram and heat-map were obtained using the Cluster-Tree View program. This figure shows that expression profiling of thymic stromal cells (3.10 mTEC) from a non-autoimmune mouse strain (C57BL/6), which was a parameter for PGE, is different from the thymic stromal cells of autoimmune NOD strain. Moreover, the PGE expression profiling differs from pre- to autoimmune state of NOD mice. Complete heat-map available online at (http://www.rge.fmrp.usp.br/passos/NOD_PGE)

non-autoimmune mouse strain (C57BL/6), which was a parameter for PGE, is different from the thymic stromal cells of autoimmune NOD strain.

The hierarchical cluster analysis of the results obtained with the SAM program and comparison of the hybridization signatures showed variability between these three sample types. The dendrogram demonstrated that this variability could distinguish pre-diabetic and diabetic animals and consequently the age of the mice (Fig. 1). Genes that were differentially expressed (repressed or induced) in both the mice and in mTEC 3.10 cells were selected for further analysis as these characterize PGE (Fig. 2; SuppelmentayTable S1). These genes highlighted code for PTAs of glands including pancreas and thus closely associated to DM-1.

Parenchymal organ representation in the thymus

The 47 sequences that were significantly repressed in the thymic stroma of pre-diabetic animals and in mTEC 3.10 cell strain were assigned to 54 parenchymal and 7 lymphoid organs, according to their predominant expression. These were then sub-grouped into 17 anatomic-functional body systems. The significantly repressed sequences were

Fig. 2 Representation of tissues-organs by gene expression (PGE) in the thymic stroma comparing pre-diabetic and diabetic NOD mice. a Repressed genes, b induced genes



sub-grouped primarily into gland tissues (including pancreas), reproductive system and lymphoid system, followed by the egg/embryo and central nervous system (Fig. 2a). The 26 significantly induced sequences were found predominantly in the reproductive system, glands and sensory organs, followed by the lymphoid organs, the egg/embryo and fat tissue in the thymus of pre-diabetic animals (Fig. 2b).

Gene expression assessed by qRT-PCR

The microarray results were confirmed using qRT-PCR of the promiscuously expressed genes Hnrpl and Nsd1. These genes were repressed in mTEC 3.10 cells and pre-diabetic mice and induced in diabetic NOD thymic stroma (Fig. 3). In addition, the Aire gene was induced, and the DM-1 autoantigens Gad67 and Ins-2 and the DM-1 unrelated autoantigen Col2a1 were repressed in diabetic animals (Fig. 4). Since these encode promiscuous autoantigens and due to their expression profiling distinguishing the biological samples, they were selected to be confirmed by qRT-PCR.

Discussion

In this study, we assessed the hypothesis that beside mutations in Aire gene sequence, as previously described in the literature, their transcriptional deregulation, as well as of autoantigen genes, may precede aggressive autoimmunity.

Given the practical impossibility of easily testing this theory in humans, we chose to employ the NOD mouse as a model system.

This inbred strain is an excellent model for investigating autoimmune diabetes and is useful for dissecting tolerance mechanisms, as the animals spontaneously develop autoimmune diabetes that is similar to human DM-1, including the presence of pancreas-specific auto-antibodies and autoreactive CD4⁺ or CD8⁺ T cells and synteny to human chromosomal linkage groups associated with DM-1 [41, 42].

Moreover, comparing only groups of NOD mice in two distinct phases of autoimmunity (pre- and diabetic animals), it was possible to exclude the influence of genetic backgrounds of non-autoimmune mouse strains.



D Springer





Fig. 3 Quantitative real-time PCR was used to confirm the repression of Hnrpl and Nsd1 genes in both mTEC 3.10 cell line and thymic stroma of pre-diabetic NOD mice. The expression levels were normalized to Gapdh expression. n = 10; mean \pm standard error of the mean. One-way ANOVA P < 0.001



Fig. 4 Quantitative real-time PCR was used to compare the expression levels of the Aire gene and Ins2, Gad67 and Col2a1 autoantigens genes in thymic stroma of pre-diabetic NOD mice. The expression levels were normalized to Gapdh expression. n = 10; mean \pm standard error of the mean. One-way ANOVA P < 0.05

Similar to DM-1 patients, the disease progress in the NOD strain occurs in two stages. In the first stage, autoreactive $CD8^+$ T cells infiltrate the pancreatic islet 4–5 weeks after birth. However, most pancreatic islets are preserved at this phase and the animals are clinically healthy. Stage one can persist for months, as the autoimmune attack is under control and relatively non-destructive. Between 15 and 25 weeks of age, the second stage is initiated by an unknown event that provokes severe insulitis. The insulitis progresses to pancreatic islet destruction and the animals become diabetic [43, 44].

Following the start of the second stage, immune tolerance to pancreatic islet antigens breaks down over time in NOD mice. As this tolerance is under molecular control, we believe that the early temporal deregulation of Aire and PTA-encoding genes (PGE) may be associated with the DM-1 emergence in NOD mice.

D Springer

Mol Cell Biochem (2010) 342:21-28

The gene expression levels of Aire, Aire-dependent autoantigen Ins2, and Aire-independent Gad67 and Col2a1 have been examined with quantitative real-time PCR.

The Aire gene has been shown to positively control the expression of a large set of PTA genes in mTECs [45], which preferentially characterizes differentiated cells [15, 20, 45].

During the intra-thymic tolerance induction, mTECs present PTAs to thymocytes to eliminate autoreactive clones by inducing apoptosis (negative selection). Our results showed that while the expression of Aire increased in the thymic stroma during the onset of diabetes, Gad67, Ins2, and Col2a1 were down-regulated. This demonstrates that the transcription profile of these genes was inversely proportional to Aire over time. In the context of diabetes, Gad67 e Ins2 down-regulation may signal a reduction in the negative selection of respective autoreactive clones, which could lead to a subsequent autoimmune reaction against these antigens in the periphery.

Down regulation of Col2a1, although not directly related to diabetes might illustrate that tolerance mechanism, in general, is imbalanced in the NOD strain, dissimilar to normal non-autoimmune mouse strains in which the expression of these genes in the thymus does not alter over time [3]. Previous results have demonstrated that lowexpression of insulin in the thymus of Ins2 deficient C57Bl/ 6 or BALB-c mice resulted in pro-insulin autoreactive T cells [28].

However, Aire does not control the expression of all antigens in the thymic stroma. For instance, Aire does not regulate beta- or kappa-casein, C-reactive protein or glutamic acid decarboxylase (Gad67) [15]. For this reason, we assayed the Gad67 autoantigen gene and determined that it was down-regulated during diabetes progression.

Moreover, we realize that the control of autoimmunity may involve a large amount of genes more than a unique gene. Thus, we also evaluated the gene expression profile of the thymic stroma using the cDNA microarray method. Since the mTEC 3.10 cell line used in this study constitutively expresses the Aire gene [36], the promiscuous PTA genes were identified on the basis of its expression profile. This approach allowed us to identify changes in gene expression during diabetes progression for genes that represent more than 60 murine tissues/organs (PGE).

Considering that the scope of promiscuously expressed genes at cell population level is highly reproducible and persists as long as T cells are exported from the thymus, even after thymic involution [3], the imbalance in the expression of these genes we observed in NOD mice, from young to older animals, represents evidence that temporal PGE deregulation is associated to autoimmunity. Deregulation of these genes in young pre-diabetic NOD mice may drive autoimmune DM-1 in elder animals.

Mol Cell Biochem (2010) 342:21-28

Given the recent evidence for a network transcriptional control of PGE in mTEC cells cultured in vitro [36], our findings open perspective for evaluate whether alterations of PTA gene interactions may occur in vivo in the thymus during emergence of autoimmune diseases including type 1 diabetes mellitus. In this context, we propose further experiments evaluating the participation of microRNAs (miRNAs) that once dysregulated (overexpressed?) in the thymic stroma of NOD mice, might negatively affect the expression of autoantigens.

Acknowledgements This study was funded by Fun dação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Brazil, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Ministry of Education of Brazil (MEC) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil). We thank Dr. Eduardo A. Donadi and Dr. Elza T. Sakamoto Hojo and Dr. Zilá L. P. Simões from the University of São Paulo, Campus of Ribeirão Preto, Brazil by the laboratory facilities. The cDNA clones used to prepare microarrays were kindly ceded by Dr. Catherine Nguyen from the National Institute of Health and Medical Research (INSERM) Unit 928, Marseille, France.

References

- Klein L, Kyewski B (2000) Self-antigen presentation by thymic stromal cells: a subtle division of labor. Curr Opin Immunol 12(2):179–186. doi:10.1016/S0952-7915(99)00069-2
- Derbinski J, Schulte A, Kyewski B, Klein L (2001) Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. Nature Immunol 2(11):1032–1039. doi:10.1038/ ni723
- Kyewski B, Derbinski J (2004) Self-representation in the thymus: an extended view. Nat Rev Immunol 4(9):688–698. doi:10.1038/ nri1436
- Kyewski B, Klein L (2006) A central role for central tolerance. Annu Rev Immunol 24:571–606. doi:10.1146/annurev.immunol. 23.021704.115601
- Takahama Y (2006) Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. Nat Rev Immunol 6(2):127–135. doi:10.1038/nri1781
- Holländer GA (2007) Claudins provide a breath of fresh Aire. Nat Immunol 8(3):234–236. doi:10.1038/ni0307-234
- Irla M, Hugues S, Gill J, Nitta T, Hikosaka Y, Williams IR, Hubert FX, Scott HS, Takahama Y, Holländer GA, Reith W (2008) Autoantigen-specific interactions with CD4+ thymocytes control mature medullary thymic epithelial cell cellularity. Immunity 29(3):451–463. doi:10.1016/j.immuni.2008.08.007
- 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 USA 105(41):15854–15859. doi:10.1073/pnas.0808069105
- Jolicoeur C, Hanahan D, Smith KM (1994) T-cell tolerance toward a transgenic beta-cell antigen and transcription of endogenous pancreatic genes in thymus. Proc Natl Acad Sci USA 91(14):6707–6711
- Gotter J, Brors B, Hergenhahn M, Kyewski B (2004) Medullary epithelial cells of the human thymus express a highly diverse selection of tissue-specific genes colocalized in chromosomal clusters. J Exp Med 199(2):155–166. doi:10.1084/jem.20031677

- Sousa-Cardoso R, Magalhães DA, Baião AM, Junta CM, Macedo C, Marques MM, Sakamoto-Hojo ET, Donadi EA, Passos GA (2006) Onset of promiscuous gene expression in murine fetal thymus organ culture. Immunology 119(3):369–375. doi:10.1111/ j.1365-2567.2006.02441
- Sospedra M, Ferrer-Francesch X, Domínguez O, Juan M, Foz-Sala M, Pujol-Borrell R (1998) Transcription of broad range of self-antigens in human thymus suggests a role for central mechanisms in tolerance toward peripheral antigens. J Immunol 161(11):5918–5929
- Bruno R, Sabater L, Sospedra M, Ferrer-Francesch X, Escudero D, Martínez-Cáceres E, Pujol-Borrell R (2002) Multiple sclerosis candidate autoantigens except myelin oligodendrocyte glycoprotein are transcribed in the human thymus. Eur J Immunol 32(10):2737–2747. doi:10.1002/1521-4141(2002010)32:10<2737: AID-IMMU2737>3.0.CO:2-0
- Bruno R, Sabater L, Tolosa E, Sospedra M, Ferrer-Francesch X, Coll J, Foz M, Melms A, Pujol-Borrell R (2004) Different patterns of nicotinic acetylcholine receptor subunit transcription in human thymus. J Neuroimmunol 149(1–2):147–159. doi:10.1016/j.jneuroim.2003.11.022
- Derbinski J, G\u00e4bler J, Brors B, Tierling S, Jonnakuty S, Hergenhahn M, Peltonen L, Walter J, Kyewski B (2005) Promiscuous gene expression in thymic epithelial cells is regulated at multiple levels. J Exp Med 202(1):33–45. doi:10.1084/jem. 20050471
- Gallegos A, Bevan MJ (2006) Central tolerance: good but imperfect. Immunol Rev 209:290–296. doi:10.1111/j.0105-2896. 2006.00348.x
- Kyewski B, Derbinski J, Gotter J, Klein L (2002) Promiscuous gene expression and central T-cell tolerance: more than meets the eye. Trends Immunol 23(7):364–371. doi:10.1016/S1471-4906 (02)02248-2
- Mathis D, Benoist C (2004) Back to central tolerance. Immunity 20(5):509–516. doi:10.1016/S1074-7613(04)00111-6
- Magalhães DA, Silveira EL, Junta CM, Sandrin-Garcia P, Fachin AL, Donadi EA, Sakamoto-Hojo ET, Passos GA (2006) Promiscuous gene expression in the thymus: the root of central tolerance. Clin Dev Immunol 13(2–4):81–99. doi:10.1080/17402 520600877091
- Ramsey C, Winqvist O, Puhakka L, Halonen M, Moro A, Kämpe O, Eskelin P, Pelto-Huikko M, Peltonen L (2002) Aire deficient mice develop multiple features of APECED phenotype and show altered immune response. Hum Mol Genet 11(4):397–409
- Nagamine K, Peterson P, Scott HS, Kudoh J, Minoshima S, Heino M, Krohn KJ, Lalioti MD, Mullis PE, Antonarakis SE, Kawasaki K, Asakawa S, Ito F, Shimizu N (1997) Positional cloning of the APECED gene. Nat Genet 17(4):393–398. doi: 10.1038/ng1297-393
- 2. Aaltonen J, Björses P, Perheentupa J, Horelli-Kuitunen N, Palotie A, Peltonen L, Lee YS, Francis F, Henning S, Thiel C, Leharach H, Yaspo M (1997) An autoimmune disease, APECED, caused by mutations in a novel gene featuring two PHD-type zinc-finger domains. Nat Genet 17:399–403. doi:10.1038/ng1297-399
- Su MA, Anderson MS (2004) Aire: an update. Curr Opin Immunol 16(6):746–752. doi:10.1016/j.coi.2004.09.009
 Kont V, Laan M, Kisand K, Merits A, Scott HS, Peterson P
- Kont V, Laan M, Kisand K, Merits A, Scott HS, Peterson P (2008) Modulation of Aire regulates the expression of tissuerestricted antigens. Mol Immunol 45(1):25–33. doi:10.1016/ j.molimm.2007.05.014
- Heino M, Peterson P, Kudoh J, Nagamine K, Lagerstedt A, Ovod V, Ranki A, Rantala I, Nieminen M, Tuukkanen J, Scott HS, Antonarakis SE, Shimizu N, Krohn K (1999) Autoimmune regulator is expressed in the cells regulating immune tolerance in thymus medulla. Biochem Biophys Res Commun 257(3):821– 825. doi:10.1006/bbrc.1999.0308

Springer

Mol Cell Biochem (2010) 342:21-28

- 26. Heino M, Peterson P, Sillanpää N, Guérin S, Wu L, Anderson G, Scott HS, Antonarakis SE, Kudoh J, Shimizu N, Jenkinson EJ, Naquet P, Krohn KJ (2000) RNA and protein expression of the murine autoimmune regulator gene (Aire) in normal, RelBdeficient and in NOD mouse. Eur J Immunol 30(7):1884–1893. doi:10.1002/1521-4141(200007)30:7<1884:AID-IMMU1884> 3.0.CO;2-P
- Espanhol AR, Macedo C, Junta CM, Cardoso RS, Victorero G, Loriod B, Nguyen C, Jordan B, Passos GA (2003) Gene expression profiling during thymus ontogeny and its association with TCRVbeta8.1-Dbeta2.1 rearrangements of inbred mouse strains. Mol Cell Biochem 252(1–2):223–228. doi:10.1023/ A:1025556510001
- Chentoufi AA, Polychronakos C (2002) Insulin expression levels in the thymus modulate insulin-specific autoreactive T-cell tolerance: the mechanism by which the IDDM2 locus may predispose to diabetes. Diabetes 51(5):1383–1390
- Pugliese A, Zeller M, Fernandez A Jr, Zalcberg LJ, Bartlett RJ, Ricordi C, Pietropaolo M, Eisenbarth GS, Bennett ST, Patel DD (1997) The insulin gene is transcribed in the human thymus and transcription levels correlated with allelic variation at the INS VNTR-IDDM2 susceptibility locus for type 1 diabetes. Nat Genet 15(3):293–297. doi:10.1038/ng0397-293
- Vafiadis P, Bennett ST, Todd JA, Nadeau J, Grabs R, Goodyer CG, Wickramasinghe S, Colle E, Polychronakos C (1997) Insulin expression in human thymus is modulated by INS VNTR alleles at the IDDM2 locus. Nat Genet 15(3):289–992. doi:10.1038/ ng0397-289
- Taubert R, Schwendemann J, Kyewski B (2007) Highly variable expression of tissue-restricted self-antigens in human thymus: implications for self-tolerance and autoimmunity. Eur J Immunol 37(3):838–848. doi:10.1002/eji.200636962
- Jiang W, Anderson MS, Bronson R, Mathis D, Benoist C (2005) Modifier loci condition autoimmunity provoked by Aire deficiency. J Exp Med 202(6):805–815. doi:10.1084/jem.20050693
 Guerau-de-Arellano M, Martinic M, Benoist C, Mathis (2009)
- Guerau-de-Arellano M, Martinic M, Benoist C, Mathis (2009) Neonatal tolerance revisited: a perinatal window for Aire control of autoimmunity. J Exp Med 206(6):1245–1252. doi:10.1084/ jem.20090300
- Gray DH, Chidgey AP, Boyd RL (2002) Analysis of thymic stromal cell populations using flow cytometry. J Immunol Methods 260(1–2):15–28. doi:10.1016/S0022-1759(01)00493-8

D Springer

- Nihei OK, Campos de Carvalho AC, Spray DC, Savino W, Alves LA (2003) A novel form of cellular communication among thymic epithelial cells: intercellular calcium wave propagation. Am J Physiol Cell Physiol 285(5):C1304–C1313. doi:10.1152/ajpcell. 00568.2002
- 36. Macedo C, Evangelista AF, Magalhaes DA, Fornari TA, Linhares LL, Junta CM, Silva GL, Sakamoto-Hojo ET, Donadi EA, Savino W, Passos GA (2009) Evidence for a network transcriptional control of promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells. Mol Immunol 46:3240–3244. doi:10.1016/j.molimm.2009.08.002
- Hegde P, Qi R, Abernathy K, Gay C, Dharap S, Gaspard R, Hughes JE, Snesrud E, Lee N, Quackenbush J (2000) A concise guide to cDNA microarray analysis. Biotechniques 29(3): 548–556
- Tusher VG, Tibshirani R, Chu G (2001) Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. Proc Natl Acad Sci USA 98(9):5116–5121. doi:10.1073/pnas.091062498
- Eisen MB, Spellmam PT, Brown PO, Botstein D (1998) Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. Proc Natl Acad Sci USA 95:14863–14868
- Su AI, Cooke MP, Ching KA, Hakak Y, Walker JR, Wiltshire T, Orth AP, Vega RG, Sapinoso LM, Moqrich A, Patapoutian A, Hampton GM, Schultz PG, Hogenesch JB (2002) Large-scale analysis of the human and mouse transcriptomes. Proc Natl Acad Sci USA 99(7):4465–4470. doi:10.1073/pnas.012025199
- Atkinson MA, Leiter EH (1999) The NOD mouse model of type I diabetes: as good as it gets? Nat Med 5(6):601–604. doi: 10.1038/9442
- Anderson MS, Bluestone JA (2005) The NOD mouse: a model of immune dysregulation. Annu Rev Immunol 23:447–485. doi: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115643
- Castaño L, Eisenbarth GS (1990) Type-I diabetes: a chronic autoimmune disease of human, mouse, and rat. Annu Rev Immunol 8:647–679. doi:10.1146/annurev.iy.08.040190.003243
- Serreze DV, Leiter EH (1994) Genetic and pathogenic basis of autoimmune diabetes in NOD mice. Curr Opin Immunol 6(6): 900–906
- Pitkänen J, Peterson P (2003) Autoimmune regulator: from loss of function to autoimmunity. Genes Immun 4(1):12–21. doi: 10.1038/sj.gene.6363929

Publicações resultantes de colaborações

Immunobiology 216 (2011) 591-603 Contents lists available at ScienceDirect Immunobiology journal homepage: www.elsevier.de/imbio

Collagen induced arthritis (CIA) in mice features regulatory transcriptional network connecting major histocompatibility complex (MHC H2) with autoantigen genes in the thymus

Paula B. Donate^{a,1}, Thaís A. Fornari^{a,1}, Cristina M. Junta^a, Danielle A. Magalhães^a, Cláudia Macedo^a, Thiago M. Cunha^b, Catherine Nguyen^c, Fernando Q. Cunha^b, Geraldo A. Passos^{a,d,}

inogenetics Group, Department of Genetics, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo (USP), 14040-900 Ribeirão Preto, SP, Brazil ^a Molecular In ⁶ Department of Pharmacology, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, USP, 14040-900 Ribeirão Preto, SP, Brazil
 ⁶ National Institute of Health and Medical Research (INSERM U928) 13100 Marseille, France
 ^d Disciplines of Genetics and Molecular Biology, Department of Morphology, Faculty of Dentistry of Ribeirão Preto, USP, 14040-904 Ribeirão Preto, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article histor Received 29 April 2010 Received in revised form 20 September 2010 Accepted 21 September 2010

Keywords Thymus Promiscuous gene expression Aire MHC Transcriptional network Collagen induced arthritis

ABSTRACT

Considering that imbalance of central tolerance in the thymus contributes to aggressive autoimmunity, we compared the expression of peripheral tissue autoantigens (PTA) genes, which are involved in self-representation in the thymic stroma, of two mouse strains; DBA-1/J (MHC-H2^g) susceptible and DBA-2/J (MHC-H2^d) resistant to collagen induced arthritis (CIA). We evaluate whether these strains differ in their thymic gene expression, allowing identification of genes that might play a role in susceptibility/resistance to CIA. Microarray profiling showed that 1093 PTA genes were differentially modulated between colla-gen immunized DBA-1/J and DBA-2/J mice. These genes were assigned to 17 different tissues/organs, including joints/bone, characterizing the promiscuous gene expression (PGE), which is implicated in self-representation. Hierarchical clustering of microarray data and quantitative RT-PCR analysis showed that Aire (autoimmune regulator), an important regulator of the PGE process, Aire-dependent (insulin), Aire-independent (Col2A1 and Gad67), and other 22 joint/bone autoantigen genes were down-regulated in DBA-1/J compared with DBA-2/J in the thymus. Considering the importance of MHC-H2 in peptide-self presentation and autoimmunity susceptibility, we reconstructed transcriptional networks of both strains based on actual microarray data. The networks clearly demonstrated different MHC-H2 transcriptional interactions with PTAs genes. DBA-1/J strain featured MHC-H2 as a node influencing downstream genes. Differently, in DBA-2/J strain network MHC-H2 was exclusively self-regulated and does not control other genes. These findings provide evidence that CIA susceptibility in mice may be a reflex of a cascade-like transcriptional control connecting different genes to MHC-H2 in the thymus. © 2010 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Introduction

The unique structural and functional thymic microenvironment. which allows for a quality control of the nascent T cell repertoire,

0171-2985/\$ - see front matter © 2010 Elsevier GmbH. All rights reserved. doi:10.1016/j.imbio.2010.09.007

is provided by stromal cells, which besides macrophages and dendritic cells, is mainly formed by the two major subsets of thymic epithelial cells (TEC), cortical (cTEC) and medullary (mTEC). These two last, also define the two major compartments of the thymus, the cortex and the medulla, respectively (Van Ewijk 1991; Bleul et al. 2006).

T cells pass through both compartments in a spatially and temporally ordered process. During the cortical phase, a highly diverse T cell repertoire is generated and subjected to positive selection for self-MHC restriction. The subsequent medullary phase imposes T cell tolerance on the nascent repertoire via negative selection of auto-reactive effectors cells (Anderson et al. 2006). Although much is known about the biology of thymocytes, our understanding of the thymic stroma, and all its implication during the development of the autoimmune process, is still poor.

A better understanding of the central tolerance mechanism emerged from evidence that peripheral tissue antigens (PTAs) are

Abbreviations: CII, type II collagen; CIA, collagen induced arthritis; CFA, complete Freud's adjuvant; HLA, human leukocyte antigen; MHC, major histocompatibility complex; PBS, phosphate-buffered saline; PGE, promiscuous gene expression; PTA, peripheral tissue autoantigens; TEC, thymic epithelial cell; cTEC, cortical thymic epithelial cell; mTEC, medullary thymic epithelial cell; RA, rheumatoid arthritis; SAM, significance analysis of microarrays. * Corresponding author at: Molecular Immunogenetics Group, Department of

Genetics, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo (USP), 3900 Via Bandeirantes, 14040-900 Ribeirão Preto, SP, Brazil. Tel.: +55 16 3602 3030; fax: +55 16 3633 0069. E-mail address: passos@rge.fmrp.usp.br (G.A. Passos)

¹ These authors contributed equally to this study

expressed in the thymus and contribute to the selection of the T cell repertoire (Kyewski et al. 2002). Expression of PTAs is a physiological property of TECs, in particular mTECs, a phenomenon known as promiscuous gene expression (PGE) due to the extensive selfrepresentation of autoantigens, which mobilizes up to 5-10% of all known mouse genes (Derbinski et al. 2001; Gotter et al. 2004).

Autoimmune regulator (Aire) considered a master regulator, drives the self presentation in the thymus. Expression profiling of mTECs isolated from Aire-knockout mice allowed the identification of autoantigen-encoding genes, such as insulin (*Ins*), salivary protein 1 and fatty-acid-binding protein (*Fabp*), which are under control of this transcription factor (Anderson et al. 2002) Meanwhile, other PTA genes, such as C-reactive protein (Crp) and glutamic acid decarboxylase of 67 kDa (Gad67), appeared to be independent of Aire, which also regulates the transcription of genes that do not encode PTAs (Derbinski et al. 2005).

Recent evidence showed that Aire also controls PGE either in an indirect manner: initially controlling the transcription of Gucv2d gene, which is connected to downstream PTA genes through transcriptional network (Macedo et al. 2009).

Studies on the control of PGE and PTA expression in the thymus have gained priority among several research groups, including our own, allowing the identification of gene expression and demarcation of PGE emergence during thymus ontogeny (Magalhães et al. 2006; Sousa Cardoso et al. 2006; Fornari et al. 2010).

Immunologists realize that the main implication of the heterogeneous expression of PTAs in the thymic stroma is associated with maintenance of the immunological homeostasis in the body. Deregulation of PGE may be an early warning sign for aggressive autoimmunity, which may lead autoimmune diseases, as it guarantees PTA representation in the thymus

A manner to establish association between changes in the thymic stroma and aggressive autoimmunity is to make use of an experimental model-system, reproducing an autoimmune disease. Rheumatoid arthritis (RA) is a prototype of autoimmune disease, which in mice should be experimentally induced by immunization with collagen (collagen induced arthritis or CIA) of susceptible DBA-1/J strain (Wooley et al. 1981). Given that it is still unclear whether imbalance in the central tolerance influences CIA and/or RA, this approach seems adequate to the study.

Moreover, major histocompatibility complex (MHC) is a strong genetic determinant of susceptibility to CIA as determined by Vyacheslav et al. (2002) in a study showing that combining $H2^q$ and H2^d alleles in mice resulted in codominant inheritance with a reduction of disease severity. MHC haplotypes as well as mutations along the Aire gene are associated to autoimmune diseases (Tiwari and Terasaki 1985; Anderson et al. 2002; Ramsey et al. 2002). However, the detailed mechanism(s) that trigger aggressive autoimmunity is still not totally understood despite our knowledge on the role of MHC molecules in autoantigen presentation and/or their role as genetic determinant of autoimune diseases.

For the reasons abovementioned and given the essential con tribution of PTAs in the negative selection of autoreactive T cells in the thymus, we decided to compare both their expression and transcriptional interactions in mouse strains featuring CIA susceptibility (DBA-1/J) or resistance (DBA-2/J). MHC-H2 in these strains was highlighted due to its association with CIA development. The microarray method enabled us to explore the large scale expression of PTAs and quantitative RT-PCR to detect the expression of the Aire gene and genes that code for specific PTAs including Col2a1; the most important antigen associated with the RA development.

In view, Aire and genes that code joint/bone PTAs were downregulated in DBA-1/J when comparing with the DBA-2/J mice. Interestingly, the reconstructed transcriptional networks based on the actual microarray data showed that while in DBA-1/J MHC-H2 modulate downstream PTA genes, in DBA-2/J it was solely selfregulated and does not connect to any downstream genes. The differential PTA profiling and transcriptional networks observed between the two mouse strains, which include (or not) MHC-H2, may influence CIA susceptibility in mice.

Materials and methods

Animals and collagen-induced arthritis (CIA)

DBA/1J and DBA-2/J mice (12-14 weeks old) weighing 18-22 g each were housed in temperature-controlled rooms (22-25°C) in the animal facility of the Faculty of Medicine of Ribeirão Preto. University of São Paulo, Brazil, and received water and food ad libitum. DBA-1/J and DBA-2/J male mice were used in type II collagen immunizations

For CIA, at day 0, DBA/11 and DBA-2/I males were intradermally injected at the base of the tail with 200 µg of bovine type II collagen (CII) (Sigma) in 100 µl of 0.05 M acetic acid emulsified with equal volume of complete Freund's adjuvant (Chondrex, Redmond, WA). On day 21, a second injection of CII (200 µg in acetic acid) was given intraperitoneally (i.p). A caliper was used to determine the paw diameter and swelling was determined as the increase in diameter compared to day 0 of immunization.

The severity of CIA was graded according to a score (CIA score) attributing the 0 (zero) value to normal paw with no swelling, erythema and no increase in joint diameter, 1 to slight swelling, erythema and 0.1-0.3 mm increase in joint diameter, 2 to swelling, erythema and 0.3-0.6 mm increase in joint diameter, 3 to extensive swelling, erythema and 0.6-0.9 mm increase in joint diameter and 4 to pronounced swelling and erythema with joint thickness of 0.9-1.2 mm increase or obvious joint destruction associated with visible joint deformity or ankylosis. Each limb was graded, resulting in a maximum clinical score of 16 per animal and expressed as the mean score on a given day. Disease onset was typically seen between days 25 and 35 after CII injection and was characterized by erythema and/or paw swelling. Only those animals presenting score 16 at day 35 were used for thymic stromal cell preparation and RNA extraction. For all experiments, we used six animals per group.

The experimental protocols were approved by the Commission for Ethics in Animal Research, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, USP, Brazil (Protocol # 244/2005).

Thymic stroma separation, mTEC 3.10 cell strain culture and total **RNA** preparation

The thymic stroma was separated from the whole thymus, as previously described (Gray et al. 2002). In brief, thymi were disected and trimmed of fat and connective tissue. Tissue fragments were then gently agitated in 50 ml of RPMI 1640 medium 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 of fresh RPMI 1640 medium and remaining thymocytes were dispersed by successive pipetting. Medium was changed 2–3 times after agitations, with fragments recovered by settling each time. The thymic fragments were then incubated in 5 ml of 0.125% (w/v)collagenase type II with 0.1% DNAse I (both from Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in RPMI 1640 at 37 $^\circ$ C for 15 min, with gentle agitation every 5 min using a 1 ml pipettor. After 3-4 digestions, stromal cells were pooled and centrifuged at $450 \times g$ for 5 min and finally resuspended in 200 µl PBS. These cells were then used for total RNA preparation

The mTEC 3.10 medullary thymic epithelial cell line was established from C57BL/6 mice, and the original medullary phenotype was confirmed by immunostaining with Th-3 and Th-4 antibody, recognizing cortical and medullary phenotypes, respectively

P.B. Donate et al. / Immunobiology 216 (2011) 591-603

(Hirokawa et al. 1986). They 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 10% fetal bovine serum (Cultilab, Campinas, SP, Brazil) – supplemented RPMI 1640 medium (Sigma–Aldrich[™], St. Louis, MO, USA) at 37 °C and 5% CO₂. To reach the ideal concentration of total RNA for all the experiments, 6 thymi (from higher arthritic score DBA-1/J or DBA-2/J mice) were used initially to separate the stromal cells and further to prepare RNA, as a pool, or 1×10^7 mTEC 3.10 cells. Total RNA extraction was performed using Trizol® reagent according to manufacturer's instructions (Invitrogen, Carlsbad, CA). RNA preparations were confirmed to be free of proteins or phenol using UV spectrophotometry. The state of degradation was assessed by microfluidic electrophoresis on RNA 6000 nano chips in an Agilent 2100 Bioanalyzer. Only no degraded RNA samples featuring RNA integrity number (RIN \geq 8.5) that were free of proteins, phenol, were used.

Gene expression analysis using microarrays

Gene expression in the thymic stroma and in the mTEC 3.10 cells was assessed using glass slide CDNA microarrays prepared on silane-coated UltraGAPS slides (# 40015, Corning[®], New York, NY, USA). The arrays contained a total of 4500 target tissue-restricted antigen cDNA sequences that represented most murine tissues and organs. Sequences were obtained from the Soares thymus 2NbMT normalized library that represented expressed sequence tag (ESTs) cDNA clones prepared from the thymus of a C57BL/6J 4-week-old male mouse, and available at the IMAGE Consortium (http://image.hudsonalpha.org).

The microarrays were prepared based on published protocols using PCR products from the cDNA clones (Hegde et al. 2000) using a Generation III Array Spotter (Amersham Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA). A complete file providing all genes and ESTs present in the microarray used in this study, as well as the quantitative data and experimental conditions is available on line at MIAME public database (http://www.mged.org/Workgroups/MIAME/miame.html) Array Express accession E-MEXP-2338.

Labeled-cDNA preparation and microarray hybridization

The cDNAs derived from the thymic stroma or mTEC 3.10 cell line were prepared by reverse transcription using 10 μ g of total RNA. The cDNA samples were monocolor labeled with Cy3 fluorochrome using the CyScribe post-labeling kit (GE Healthcare Biosciences). Samples were hybridized for 15 h and then washed using an automatic slide processor system (ASP, Amersham Biosciences). Microarrays were scanned in a Generation III laser scanner (Amersham Biosciences).

As a reference for the hybridization procedure, we used equimolar quantities of cDNAs obtained from irrelevant total RNA (C57BL/6 whole thymus total RNA). This approach allowed us to estimate the relative amount of target cDNA in each microarray spot.

Microarray data analysis and transcriptional gene networks reconstruction

Microarray images were quantified using the Spotfinder software (http://www.tm4.org/spotfinder.html) and normalized using the R platform (http://www.r-project.org). Statistical analyses were performed using Multiexperiment Viewer (MeV) software (version 3.1) (http://www.tm4.org/mev.html). Differentially expressed genes were identified using the significance analysis of microarrays (SAM) program (Tusher et al. 2001), considering only those genes with a false discovery rate (FDR) \leq 0.01.

To analyze the gene expression profiles from the SAM program data set, we used a hierarchical clustering method that grouped genes on the horizontal axis. The samples were supervised on the vertical axis. The similarities and dissimilarities in gene expression are presented as both heat maps and dendrograms, in which the pattern and length of the branches reflect the relatedness of the samples or genes (Eisen et al. 1998) (Cluster version 3.0 and Java Tree View) (http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.html).

The GeneNetwork 1.2 algorithm (Wu et al. 2004) was applied to compare means of different gene expression values whose standard deviation did not overlap, whose objective was to compute a network that established relationships between all genes. Bayesian statistics and linear interpolation for the network organization was used. The software for this algorithm can be obtained from the authors (http://idv.sinica.edu.tw/hchuang/GeneNetwork1.2Setup.exe).

In order to organize networks only with genes whose expression values were significant, we used values for the induced and repressed genes selected by the SAM statistics. In this case, of the 4500 sequences present on the microarray, a total of 23 differentially expressed genes were included in the calculations of the GeneNetwork software due to their statistical significance.

Determination of promiscuous gene expression

The microarray analysis data was used to identify PGE based on combined information from the public databases BioGPS (http://biogps.gnf.org/?referer=symatlas#goto=welcome) and/or SOURCE (http://smd.stanford.edu/cgi-bin/source/sourceSearch). These databases show gene expression in more than 60 mouse tissue/organs, as assessed by sequencing of cDNA clones from different organ/tissues (SOURCE) or gene array analysis using Affymetrix microarrays (BioGPS). Data information from these databases includes GenBank accession number, chromosomal location, tissue/organ representation and the molecular/biological function of each gene analyzed.

In this study, we considered the promiscuous genes of which the expression was detected in different organs or tissues and of which the expression levels that were greater than the median in relation to the different organs.

Oligonucleotide primer design and quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)

Microarray data were confirmed using qRT-PCR of three PTA genes (Bcap31, Fcgr1 and Prkrir) that differed between DBA1/J and DBA2/J animals; the genes were selected based on their expression pattern and hierarchical clustering. The Aire and three autoantigen genes (Gad1, Ins2 and Col2a1) were selected because their sequences were not included in the microarray used in this study. The Primer3 web tool (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi) 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=nuccore&itool=toolbar) for each gene. The forward and reverse sequences are given in the 5' to 3' orientation; Aire (GenBank acc NM_009646.1) (5' GCAACTCTGGCCTCAAAGAG 3' and 5' GGTCTGAATTCCGTTTCCAA 3'), Gad67 (Gad1) (GenBank acc NM_008077.3) (5' TCACCCTCGATTTTTCAACC 3' and 5' AACAAA-CACGGGTGCAATTT 3'), Ins2 (GenBank acc NM_008387.3) (5' ACCTTCAGACCTTGGCACTG 3' and 5' GCTGGGTAGTGGTGGGTCTA 3'), Bcap31 (GenBank acc NM_012060) (5' ATGACCGCCTGC-TAGAAGAA 3' and 5' GCAGTAAGCATGGGTCAGGT 3'), Fcgr1 (GenBank acc NM_010186) (5' GGGAAGACACCGCTACACAT 3'

and 5' GTTCAGGGTGACCAGACTCC 3'), Prkrir (GenBank acc NM.028410) (5' CCGCATAGCAGACACAGAAA 3' and 5' GGGTTCT-GAGCATTGGTGTT 3') and Col2a1 (GenBank acc NM.031163.2) (5' AACACTTTCCAACCGCAGTC 3' and 5' TCTGCCCAGTTCAGGTCTCT 3'). The cDNA samples were prepared using Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) enzyme, as recommended. Expression of the abovementioned genes was quantified using a 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) and normalized to the expression of the housekeeping gene Gapdh (GenBank acc NM.008084.2) (5' GGGTGTGAACCACGAGAAAT 3' and 5' CCTTCCACAATGCCAAAGTT 3').

Results

Development of CIA in DBA-1/J mice

The immunization schedule with type CII induced the development of arthritis (CIA) in male DBA-1/J mice, whose CIA scores reached a peak on day 35. Male DBA-2/J mice injected in the same schedule were considered as controls. These animals did not feature any signal of arthritis development.

Genes differentially expressed during CIA

Although the expression pattern remained unchanged between CIA susceptible DBA-1/J and resistant DBA-2/J strain thymic stroma for the majority of the 4500 sequences tested $[d(i) \approx d_E(i))]$. 1093 genes were found as significantly modulated. Thus, it was possible to identify clusters of repressed and induced genes.

To try to identify changes in the gene expression profiles associated to susceptibility or resistance to CIA we compared CII immunized DBA-1/J and DBA-2/J mice respectively. Expression profiling showed differences from the thymic stroma of DBA-1/J and DBA-2/J mice. Parallel profiling of mTEC 3.10 cell line, served as a parameter to help identify genes involved in PGE.

The hierarchical gene cluster analysis of the results obtained with the SAM program and comparison of the hybridization signatures showed variability between these three sample types.

Genes that were differentially expressed (repressed or induced) in the stroma of mice were selected for further analysis as these characterize PGE (Fig. 1 and Table 1).

Parenchymal organ representation in the thymus

The 25 induced and the 33 repressed sequences in the thymic stromal cells of DBA-1/J and DBA-2/J stains were then assigned to 57 parenchymal and 7 lymphoid organs, according to their predominant expression (Table 1). These were then sub-grouped into 17 anatomic-functional body systems (Fig. 2).

The following 22 gene transcripts: *Psap* (acc NM_ 011179), *Rab1* (acc NM_008996), *Rab3d* (acc NM_031874), *Prkd2* (acc NM_178900), *Elf1* (acc NM_007920), *Tieg3/Klf11* (acc NM_178357), *St5* (acc NM_00101326), *Zwint* (acc NM_025635), *Pias1* (acc AK162584), *Tspan3* (acc NM_019793), *Fau* (acc NM_007990), *Crnd3* (acc NM_001081636), *Glb1* (acc AK082033), *Serpinb2* (acc NM_011111), *Csnk1d* (acc NM_139059), *Ntx6-2* (acc NM_183248), *Mapk3* (acc NM_011952), *Trim24* (acc NM_145076), *Dusp1* (acc NM_013642), *Atf4* (acc NM_009716), *Fcgr1* (NM_010186), and *Galnt10* (NM_134189) that code for respective PTAs expressed in the bone and/or joint and, therefore, related to locomotory system, were repressed in DBA-1/J strain and induced in DBA-2/J strain.

Gene networking

Fig. 3 shows the transcriptional network analysis of the 22 bone and/or joint PTA genes, which were repressed in DBA-1/J and



Fig. 1. Hierarchical clustering of mTEC 3.10 cells and stroma of DBA-1/J and DBA-2/J strains based on cDNA microarray gene expression profiling. Dendrograms and heat-maps were obtained using the Cluster-Tree View program. Red – up regulation, green – down regulation, black – unmodulated and gray – missing data (Pearson correlation metrics). Sequences with no identification correspond to ESTs (expressed sequence tags). Genes delimitated in the heat map are as follow: (a) induced in DBA-1/J and (b) repressed in DBA-1/J, which were used for the PCE study. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

P.B. Donate et al. / Immunobiology 216 (2011) 591-603

Table 1 Genes differentially and significantly expressed (repressed or induced) in the thymic stroma of DBA-1/J mice and mTEC 3.10 cell line as detected by SAM program. Induced genes

Gene name	GenBank Acc (mRNA)	Chromosomal location	Predominant expression (mRNA)	Function of the coded protein
Sdccag8	NM_029756	1H3	Spinal cordupper, liver, spleen, brown fat, adipose tissue, adrenal gland, salivary gland, pancreas, pituitary, thyroid, bone, skeletal muscle, bone marrow, B cells, CD4+ T cells, trigeminal, dorsal root ganglia, muscle, ovary, lung, blastocysts, oocyte	Unknown function
Serologically defined colon				
lilliral	NM_010549	4A5	Heart, cerebellum substantia nigra, stomach, epidermis, retina, adipose tissue, Adrenal gland, salivary gland, pancreas, pituitary, bone, lymphnode, thymus, ovary, placenta, prostate, umbilical cord, uterus, lung, trachea, vomeronasal organ, main olfactory enithelium tonoue, divis, bladder, kidnev	Immune response (T cell activation)
Interleukin 11 receptor,				
alpha chain 1 Hdac1	NM_008228	4D2	Spleen, epidermis, snout epidermis, adipose tissue, adrenal gland, large intestine, bone, bone marrow, B-cells, CD4+ T-cells, CD8+ T-cells, lymphnode, thymus, ovary, testis, umbilical cord, uterus, lung, trachea, main offactory enithelium, vomeronasal orean.	Transcription
			digits, bladder, blastocysts, embryo	
Histone deacetylase 1 Nol6	NM_139236	4A5	Amygdala, frontal cortex, preoptic, cerebellum, cerebral cortex, dorsal striatum, hippocampus, hypothalamus, olfactory bulb, spinal cordlower, spinal cordupper, substantia nigra, snout epidermis, adipose tissue, adrenal gland, B-cells, CD4+ T-cells, CD8+ T-cells, lymphnode, dorsal root ganglia, ovary, placenta, prostate, bladder, blastocysts, embryo, kidney	Transcription
(RNA-associated)				
2310035C23Rik	NM_173187	1D	Amygdala, frontal cortex, preoptic, cerebellum, cerebral cortex, dorsal striatum, hippocampus, hypothalamus, olfactory bulb, spinal cord/ower, spinal cord/uper, substantia nigra, stomach, snout epidermis, retina, mammary gland, pituitary, large intestine, B-cells, thymus, dorsal root ganglia, trigeminal, trachea, main olfactory enithelium, toneue, deirits, blactocyst, oocyte	Binding
RIKEN cDNA 2310035C23			onactory epimenant, tongact against one octors, over ce	
gene 2210404007Rik RIKEN cDNA 2210404007 gene	NM_001099917	10C1	Stomach, pancreas, large intestine, small, intestine, testis, kidney	Unknown function
Gene name	GenBank accession	Chromosome	Predominant expression	Molecular/biological function
Gga1	NM_145929) 15E2	Amygdala, frontal cortex, preoptic, cerebellum, cerebral cortex, dorsal striatum, hippocampus, stomach, epidermis, adipose tissue, salivary gland, pancreas, thyroid, brown frat, bone, trigeminal, small intestine, bone, B-cells, CD4+ T-cells, lymphnode, ovary, prostate, testis, umbilical cord, uterus, lung, vomeronasal organ, blastocystis, tongue	Intracellular protein transport
Golgi associated, gamma adaptin containing, ARF binding proteir	n 1			
Frag1	NM_145583	7E3	Heart, stomach, snout epidermis, epidermis, adipose tissue, brown fat, adrenal gland, mammary gland, large intestine, ovary, prostate, uterus, lung, trachea, vomeronasal organ, main olfactory epithelium, tongue, digitis, blastocysts, embryo, fertilized egg, oocyte	Signal transduction
FGF receptor activating protein 1 Bcap31	NM_012060	XA6	Preoptic, liver, epidermis, snout epidermis, brown fat, adipose tissue, adrenal gland, large intestine, small intestine, B220+ B-cells, CD4+T cells, thymus, trigeminal, dorsal root ganglia, ovary, placenta, prostate, uterus, lung, trachea, vomeronasal organ, main olfactory epithelium, tongue, digitis, bladder, kidney, blastocysts, fertilized egg, oocyte	Intracellular protein transport
B-cell receptor-associated protein Tulp3	n 31 NM_011657	6F3	Preoptic, cerebellum, snout epidermis, retina, adrenal gland, pancreas, pituitary, thymus, trigeminal, dorsal root ganglia, ovary, prostate, umbilical cord, uterus, lung, trachea, main olfactory epithelium, vomeronasal organ, tongue, kidney, embryo, fertilized egg, oocyte	Unknown function
Sfrs5	NM_009159	12D2	Amygdala, cerebellum, hypothalamus, olfactory bulb, spinal cordlower, epidermis, snout epidermis, retina, adipose tissue, adrenal gland, mammary gland, salivary gland, bone, bone marrow, CD4+ and CD8+T cells, B cells, lymphnode, thymus, ovary, prostate, umbilical cord, uterus, lung, trachea, main olfactory enithelium yomeromaal organ tongue, digits bladder	Transcription

Table 1 (Continued)

Gene name	GenBank accession	Chromosome	Predominant expression	Molecular/biologica function
Splicing factor, arginine/serine-rich 5				
(SKP40, HKS) Nup50	NM_016714	15E2	Amygdala, frontal cortex, pancreas, thyroid, small intestine, bonemarrow, B cells, CD4+, CD8+ T cells, lymphnode, thymus, placenta, testis, embryo, day 10.5, embryo day 6.5, embryo, oocyte, blastocysts	Protein binding
Sprk6	NM_011938	1381-3	Amygdala, preoptic, cerebral cortex, hippocampus, substantia nigra, spleen, stomach, snout epidermis, adipose tissue, adrenal gland, large intestine, bone, bonemarrow, B cells, CD4+, CD8+ T cells, lymph node, thymus, trigeminal, dorsal root ganglia, ovary, umbilical cord, uterus, trachea, digitis, embryo	Signal transduction
G protein-coupled receptor kinase 6 9930021J03Rik	NM_172826	19C1	Amygdala, frontal cortex, preoptic, cerebellum, cerebral cortex, hippocampus, hypothalamus, olfactory bulb, spinal cordlower, substantia nigra, epidermis, snout epidermis, retina, adipose tissue, large, small intestine, B cells, CD8+T cells, thymus, trigeminal, dorsal root ganglia, ovary, testis, lung, trachea, main olfactory epithelium, vomeronasal organ, digitis, bladder	Unknown function
RIKEN cDNA 9930021J03 gene Tusc4	NM_018878	9F1	Amygdala, frontal cortex, preoptic, cerebellum, cerebral cortex, hippocampus, hypothalamus, olfactory bulb, spinal cordlower, substantia nigra, liver, snout epidermis, adipose tissue, adrenal gland, pituitary, B cells, CD4+, CD8+ T cells, thymus, trigeminal, dorsal root ganglia, ovary, testis, trachea, main olfactory epithelium, kidney, blastocysts, embryo, fertilized egg, oocyte	Cell cycle
Tumor suppressor candidate 4 Prkrir	NM_028410	7F1	Heart, frontal cortex, cerebellum, hypothalamus, olfactory bulb, epidermis, retina, adipose tissue, adrenal gland, skeletal muscle, B cells, CD4+, CD8+ T cells, thymus, ovary, prostate, umbilical cord, uterus, lung, main olfactory epithelium, trachea, vomeronasal organ, tongue, digits, bladder, embryo, fertilized eve. nocvt	DNA binding
Protein-kinase, interferon-inducible double stranded RNA dependent inhibitor, repressor of (P58 repressor)			con over t	
Stambpl1	NM_029682	19C1	Preoptic, dorsal striatum, hypothalamus, liver, spleen, stomach, salivary gland, pituitary, pancreas, large, small intestine, bone, skeletal muscle, bonemarrow, B cells, CD4+, CD8+ T cells, thymus, trigeminal, dorsal root ganglia, placenta, prostate, testis, trachea, vomeronasal organ, embryo, fertilized egg, occyte	Ubiquitin activity
Stam binding protein like 1 Sh3yl1	NM_013709	12A2	Cerebral cortex, stomach, epidermis, snout epidermis, retina, mammary gland, salivary gland, pancreas, pituitary, thyroid, large, small intestine, dorsal root ganglia, ovary, prostate, testis, uterus, trachea, main olfactory epithelium, vomeronasal organ, tongue, digitis, bladder, kidney, fertilized egg, oocyte	Unknown function
Sh3 domain YSC-like 1 Sumo2	NM_133354	11E2	Frontal cortex, preoptic, cerebellum, cerebral cortex, hippocampus, olfactory bulb, snout epidermis, retina, bone, B cells, CD4+, CD8+ T cells, lymphnode, thymus, ovary, uterus, lung, trachea, main olfactory epithelium, vomeronasal organ, digitis bladder, emptyne, fertilized ege opcorte	Protein modification process
SMT3 suppressor of mif two 3			digitis, bladder, embryo, retuized egg, obcyre	
Wdr43	XM001005092	17E1.3	Epidermis, snout epidermis, retina, adipose tissue, adrenal gland, large intestine. B cells. CD4+. CD8+ T cells. lymphnode. thymus. ovary, prostate, umbilical cord, uterus, trachea, main olfactory epithelium, vomeronasal organ, tongue, digitis, blastocysts, embryo, fertilized egg, oocyte	Unknown function
WD repeat domain 43 Taf3	NM_027748	2A1	Heart, dorsal striatum, hippocampus, liver, spleen, stomach, brown fat, mammary, sallvary gland, pancreas, pituitary, thyroid, small intestine, skeletal muscle, bonemarrow, placenta, prostate, bladder, kidney, blastocysts, embrvo. fertilized eez	Transcription
TAF3 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated				
factor Gtf2i	NM_001080747	5G2	Amygdala, frontal cortex, preoptic, cerebellum, cerebral cortex, dorsal striatum, hippocampus, hypothalamus, olfactory bulb, substantia nigra, snout epidermis, retina, adrenal gland, pituitary, CD4+, CD8+ T cells, lymphnode, thymus, dorsal root ganglia, ovary, testis, umbilical cord, uterus, main olfactory epithelium, bladder, kidney, embryo	Transcription

General transcription factor II NM.028245 13 Heart_anygdala_fonda cortex, snout epidermis, adipose tissue, adrenal gland, large insteine, bore, skeletal muscle, borenarrow, Berl, CA-CBP - Tells, hymphode, flymping, organ, atterns, hung, traches, digits, enhysy, fertilized egg. Transcription Zinc finger protein 131 NM.028192 1573 Doersal stratum, offactory bulk, spinal cordupper, liver, spinen, transcription Transcription Calcorol NM.029192 5E1 Doersal stratum, offactory bulk, spinal cordupper, liver, spinen, transcription Transcription Calcorol MM.0291932 5E1 Henr, spines, egiona, digits, hawas, they and trache, vomeronaal organ, togene, digits, bladder Transcription Calcorol NM.019932 5E1 Henr, spines, egiona, digits, bladder Transcription Calcoro NM.019932 5E1 Henr, spines, egiona, digits, bladder Transcription Chemokine (C-X-C motif) [igand 4 NM.031874 9A2 Spieen, storach, relativers, spiner, priority, spinal contupe, digits, bladder, fortil drop egiona, digits, bladder Transcription MM3D1, member RAS oncogene faminy NM.008361 2F Heart, spieen, storaw fat, mammary, salioray glands, sureas, finitrary, tracke, tomeronal organ, digits, bladder, kdmy, bladder, storegres, thoroti, fat, scielar muscle, scielar muscle, scielar,	Gene name	GenBank accession	Chromosome	Predominant expression	Molecular/biologic function
Zuch fürger protein 131 NML 026 192 15 F3 Densil stratatum, olfactory bulks, spinal cordupper, liver, spieen, brown far, nammary gland, pancreas, thrytical Large, small, full strates, endited names, endited coil domain 1 Transcription CxCl4 NML 019932 5E1 Heart, spieen, epidermis, snot epidermis, thrown far, adipose tissue, drenal, mammary gland, bone, skeletal muscle, being, CML of the spinal cord, uterus, lung, childrin, shown far, adipose tissue, drenal, mammary gland, bone, skeletal muscle, being, CML of the spinal cord, uterus, lung, traches, vomeronasal organ, torque, digitis, bladder Immune response tissue, drenal, mammary gland, bone, skeletal muscle, bonemarrow, trigeninal, ovary, umbilical cord, uterus, lung, traches, main dilactory epithemis, retina, adipose tissue, drenal, mammary, slivary glands, pances, thrytou, larges, and line strines, bone, the spinal cord, uterus, main dilactory epithemis, retina, adipose tissue, drenal, mammary, slivary glands, pances, thrytou, larges, and line strines, bone, the spinal cord, uterus, lung, traches, main dilactory epithemis, retina, adipose tissue, drenal, mammary, slivary glands, pances, thrytou, larges, and line strines, bone, taketal maxies, bonemarrow, trigeninal, dorsal rotal traches, throtop, largenina, digitis, bladder, ladroy, pances, thrytou, larges, and largenina, teelis, line spinal, traches, torno, largenina, digitis, bladder, ladroy, pances, thrytou, largenina, largening, blackes, la	General transcription factor II 2fp131	NM_028245	13	Heart, amygdala, frontal cortex, snout epidermis, adipose tissue, adrenal gland, large intestine, bone, skeletal muscle, bonemarrow, B cells, CD4+, CD8+ T cells, lymphnode, thymus, ovary, uterus, lung, trachea, digitis, embryo, fertilized egg. oocyte	Transcription
Calcium Minding and colled coll domain 1 Immune response CxCl4 NML.01932 5E1 Heart, spleen, epidermis, shown fat, adipose tissue, adrenal, mammary glands, bone, skeletal muscle, bone marrow, frigminal, ovary, umbilical cord, uterus, lung, tracha, vomenasal organ, toxyer, digitis, bladder Immune response Chemekine (C-X-C motif) ligand NML.031874 9A2 Spleen, stomach, epidermis, snout epidermis, fordorsal norgan, gange, ovary, umbilical cord, uterus, lung, traches, main ollactory epithelium, vomenonasal organ, toxyer, umbilical cord, uterus, lung, traches, main ollactory epithelium, vomenonasal organ, toxyer, umbilical cord, uterus, lung, traches, main ollactory epithelium, vomenonasal organ, toxyer, umbilical cord, uterus, lung, traches, main ollactory epithelium, vomenonasal organ, toxyer, umbilical cord, uterus, lung, traches, main ollactory epithelium, vomenonasal organ, toxyer, using traches, main ollactory epithelium, vomenonasal organ, dugits, hadder, lung, vomenonasal organ, dugits, enhoyser, keletal muscle, bonenarrow, B cells, CD4+, CD8+,	Zinc finger protein 131 Calcoco1	NM_026192	15F3	Dorsal striatum, olfactory bulb, spinal cordupper, liver, spleen, brown fat, mammary gland, pancreas, thyroid, large, small intestine, skeletal muscle, B cells, CD4+, CD8+ T cells, ovary, placenta, prostate, testis, umbilical cord, lung, tongue, digitis, bladder, blastocysts, embryo	Transcription
Determination of the second structure is the se	Calcium binding and coiled coil domain 1 Cxcl4	NM_019932	5E1	Heart, spleen, epidermis, snout epidermis, brown fat, adipose tissue, adrenal, mammary glands, bone, skeletal muscle,	Immune response
Linking (EVC. Induit) mained * NML.031874 9A2 Spatem, stomach, epidermis, rentio, adipose running and remain marmary, solivory glands, pancress, pilotary, trisse, adrenal, marmary, solivory glands, pancress, pilotary, and factory epithelium, vomeronasal organ, digitis, bladder, fertilized egg, oocyte Transcription RAB3D, member RAS oncogene family NML.008361 2F Heart, liver, spleen, brown fat, marmary, salivary glands, pancress, thyroid, bine, skeletal muscle, bonemarrow, Bc ells, Umphnded, lung, vomeronasal organ Immune response Interleukin 1 beta NML.08361 2F Heart, liver, spleen, brown fat, marmary, salivary glands, pancress, thyroid, bone, skeletal muscle, bonemarrow, Bc ells, Umphnde, lung, vomeronasal organ Transcription Nks6-2 NML.183248 7F4 Heart, hippocampus, hypothalamus, ingres mall intestines, skeletal muscle, bonemarrow, Bc ells, CD4+, CD8+T Transcription Nks6-2 NML.178900 7A2 Heart, spleen, stomach, epidermis, shout epidermis, brown fat, adipose tissue, adrenal gland, pituiary, lurge, small intestines, bone, bonemarrow, Bc ells, CD4+, CD8+T cells, lymphnode, thymus, soury, uterus, lung, trachek, womeronasal organ, digiti, badder, kidney Intracellular F74-like factor 1 NML.07920 14D3 Heart, angedal, acrebems, spinal cordlower, liver, epidermis, neutor, epidermis, retina, adipose tissue, adrenal, marmary, slavary glands, hymoid, small, large intestines, bone, skeletal muscle, B cells, CD4+, CD8+T cells, lymphnode, thymus, voary, pacerent, prostate, unbilical cord,	Themselvine (C. Y. C. motif) ligand 4			bonemarrow, trigeminal, ovary, umbilical cord, uterus, lung, trachea, vomeronasal organ, tongue, digitis, bladder	
RAB3D, member RAS oncogene family NML008361 2F Heart, liver, spleen, brown fat, mammary, salivary glands, pancreas, thyroid, bone, skeletal muscle, bonemarrow, B cells, lymphnode, lung, vomeronasal organ Immune response Nits-72 NM.183248 7F4 Heart, liver, spleen, brown fat, mammary, salivary glands, pancreas, thyroid, bone, skeletal muscle, bonemarrow, B cells, CD4+, CD8+ T cells, placent, prostate, testis, tongue, bladder, kidney, blastocysts, embryo, fertilized egg Transcription NK6 transcription factor related, locus 2 (Drosophila) NM.178900 7A2 Heart, spleen, stomach, epidermis, Snout epidermis, brown fat, adipose tissue, adrenal gland, plutary, large, small intestines, bone, bonemarrow, B cells, CD4+, CD8+ T cells, lymphnode, thymus, ovary, uterus, lung, tracke, vomeronasal organ, digits, embryo, fertilized egg, oocyte Intracellular Protein kinase D2 NM.007920 14D3 Heart, spleen, stomach, epidermis, adipose tissue, adrenal, mammary, salivary glands, thorey bulb, spinal cordlower, liver, rogue, digitis, bladder, kidney Protein E74-like factor 1 Galnt10 NM.134189 11B1 Preoptic, hypothalamus, olfactory publ, spinal cordlower, substancia nigra, retina, brow fat, adipose tissue, adrenal, mammary, salivary glands, borne, skeletal muscle, B cells, CD4+, CD8+ T cells, lymphnode, thymus, dorsal root ganglia, ovary, placenta, prostate, testis, umblical cord, uterus, main olfactory epithelium, vomeronasal organ, alactors repithelium, vomeronasal organ, embryo. Protein BPA- Salivary glands, bone, skeletal muscle, B cells, CD4+	ab3d	NM_031874	9A2	Spleen, stomach, epidermis, snout epidermis, retina, adipose tissue, adrenal, mammary, salivary glands, pancreas, pituitary, thyroid, large, small intestines, bone, trigeminal, dorsal root ganglia, ovary, umbilical cord, uterus, lung, trachea, main olfactory epithelium, vomeronasal organ, digitis, bladder, fertilized egg, ocyte	Transduction
IIIbNM.0083612FHeart, liver, spleen, brown fat, mammary, salivary glands, pancreas, thyroid, bone, skeletal muscle, bonemarrow, B cells, lymphnode, lung, vomeronasal organImmune responseNixo6-2NM.1832487F4Heart, hippocampus, hypothalamus, liver, spleen, stomach, bown fat, mammary, salivary glands, pancreas, thyroid, small intestines, skeletal muscle, bonemarrow, B cells, CD4+, CD8+T cells, placenta, prostate, testis, tongue, bladder, kidney. blastocysts, embryo, fertilized eggTanscriptionNK6 transcription factor related, locus 2 (Drosophila)NM.1789007A2Heart, spleen, stomach, epidermis, Snout epidermis, brown fat, adipose tissue, adrenal gland, pituitary, large, small intestines, bone, bonemarrow, B cells, UD4+, CD8+T cells, hymphnode, thyms, ovary, uterus, lung, trachea, dirose tissue, adrenal, large intestines, bone, bonemarrow, B cells, CD4+, CD8+T cells, hymphnode, thymus, ovary, uterus, lung, trachea, dirose tissue, adrenal, large intestines, bone, bonemarrow, B cells, CD4+, CD8+T cells, lymphnode, thymus, ovary, placenta, prostate, testis, tongue, bladder, kingerTanscriptionProtein kinase D2 EI1NM.00792014D3Heart, spleen, stomach, epidermis, adipose tissue, adrenal, large intestines, bone, bonemarrow, B cells, CD4+, CD8+T cells, lymphnode, thymus, ovary, placenta, prostate, testis, unmblical cord, uterus, lung, trachea, main olfactory epithelium, vomeronasal organ, torgue, digitis, bladder, kidneyProtein274-like factor 1 Galnt10NM.13418911B1Preoptic, hypothalamus, olfactory bulb, spinal cordlower, substancia tord, uterus, main olfactory epithelium, tongue, embryo, salivary glands, bone, skeletal muscle, B, cells, CD4+, CD8+ CElls, VM, photed, th	RAB3D, member RAS oncogene family				
Interfection 1 beta NML183248 7F4 Heart, hippocampus, hypothalamus, liver, spleen, stomach, brown fat, mammary, salivary glands, pancreas, thyroid, small intestines, solecletal muscle, bonemarrow, B cells, CD4+, CD8+ T Transcription NK6 transcription factor related, locus 2 (Drosophila) NML178900 7A2 Heart, spleen, stomach, epidermis, Snout epidermis, brown fat, adipose tissue, adrenal gland, pituitary, large, small intestines, solecus 2 (Drosophila) Intracellular signaling Prkd2 NML178900 7A2 Heart, spleen, stomach, epidermis, Snout epidermis, brown fat, adipose tissue, adrenal gland, pituitary, large, small intestines, bone, bonemarrow, B cells, CD4+, CD8+ T cells, IVmphnode, thymphnode, thymphotog, thymo, fortilized egg. oocyte Intracellular signaling Protein kinase D2 IMML007920 14D3 Heart, spleen, stomach, epidermis, adipose tissue, adrenal, supphnode, thymphnode, thymphote, thymphnode, thymphote, seletclat muscle, Descreption, solut epidermis, snout epidermis, retina, dipose tissue, adirenal, norsate, umblical cord, uterus, salivary glands, pancrase, pitutary, thyroid, large, small intestines, bone, seletclat muscle, De+ CD8+ T cells, lymphotode, thymus, doras lorgan, torgate, salivary glands, pancrase, prostate, teus, salivary glands, bone, seletclat muscle, De+ CD8+ T cells, lymphote, thymus, advarse gland, pancrase, prostate, teus, salivary glands, pancrase, salivary glands, pancrase, salivary glands, pancrase, salivary glands, pancrase, prostate, teus, marking, salivary glands, pancrase, salivary glands, pancrase, salivary glands,	11b	NM_008361	2F	Heart, liver, spleen, brown fat, mammary, salivary glands, pancreas, thyroid, bone, skeletal muscle, bonemarrow, B cells, lymphnode, lung, vomeronasal organ	Immune response
NK6 transcription factor related, locus 2 (Drosophila) Prikd2 NM.178900 7A2 Heart, spleen, stomach, epidermis, Snout epidermis, brown fat, adipose tissue, adrenal gland, pituitary, large, small intestines, bone, bonemarrow, B cells, CO4+, CO8+ T cells, lymphnode, thymus, ovary, uterus, lung, trachea, vomeronasal organ, digitis, embryo, tertuilized egg, oocyte El1 NM.007920 14D3 Heart, spleen, stomach, epidermis, adipose tissue, adrenal, mammary, salivary glands, thyroid, small, large intestines, bone, bonemarrow, B cells, CO4+, CO8+ T cells, lymphnode, thymus, ovary, uterus, lung, trachea, vomeronasal organ, digitis, bladder, kidney E74-like factor 1 Galnt10 NM.134189 11B1 Preoptic, hypothalamus, olfactory pulb, spinal cord/over, liver, gladactosamine; polypeptide N-acetyl-alpha-p- galactosamine; polypeptide N-acetyl-alpha-p- galactosamine; polypeptide N-acetyl-alpha-os- galactosamine; polypeptide N-acetyl-alphaose, 10 Protein inhibitor of activated STAT 1 Tieg3 NM.178357 12A1 Heart, epidermis, snout epidermis, adipose tissue, adrenal, mammary, salivary glands, bone, dorsal root ganglia, ovary, placenta, main offactory epithelium, vomeronasal organ, torial cord, uterus, main olfactory epithelium, tongue, embryo, fracting glands, base, doreal muscle, B cells, CD4+, CO8+ CB8+ CB5, CD8+ T cells, lymphnode, thymus, offactory epithelium, vomeronasal organ, embryo, fertilized egg	nterleukin 1 beta Nkx6-2	NM_183248	7F4	Heart, hippocampus, hypothalamus, liver, spleen, stomach, brown fat, mammary, salivary glands, pancreas, thyroid, small intestines, skeletal muscle, bonemarrow, B cells, CD4+, CD8+ T cells, placenta, prostate, testis, tongue, bladder, kidney, blactocrysts, embryn Greilized eag	Transcription
Dot us 2 (Dissiplina)NML1789007A2Heart, spleen, stomach, epidermis, Snout epidermis, brown fat, adipose tissue, adrenal gland, plutitary, Large, small intestines, bone, bonemarrow, B cells, CD4+, CD8+ T cells, lymphnode, thymus, ovary, uterus, lung, trachea, avomeronasal organ, digitis, embryo, fertilized egg, oocyteIntracellular signalingProtein kinase D214D3Heart, spleen, stomach, epidermis, adipose tissue, adrenal, mammary, salivary glands, thyroid, small, large intestines, bone, bonemarow, B cells, CD4+, CD8+ T cells, lymphnode, thymus, ovary, placenta, prostate, umbilical cord, uterus, lung, trachea, main offactory public splitelium, vomeronasal organ, tongue, digitis, bladder, kidneyTranscriptionE74-like factor 1 Galnt 10NM_13418911B1Preoptic, hypothalamus, offactory bulb, spinal cordlower, liver, epidermis, noti epidermis, retina, adipose tissue, adrenal, dorsal root ganglia, ovary, placenta, prostate, estis, umbilical cord, uterus, ung, ylacenta, prostate, estis, umbilical cord, uterus, main olfactory epithelium, vorgute, embryoProtein glycolsylationUDP-N-acetyl-alpha-D- galactosamine:polypeptide N-acetylgalatcosaminy!transferase 10AK1625849Heart, anygdala, cerebellum, spinal cordlower, substancia nigra, retina, brow fat, daipose tissue, adrenal, mammary, salivary glands, bone, skeletal muscle, B cells, CD4+, CD8+ T cells, lymphnode, thymus, ordiactory epithelium, vomeronasal organ, eggUnknown function mirgra, retina, brow fat, adipose tissue, adrenal, mammary salivary glands, bone, dorsal root sgnglia, ovary, placenta, protein, embryo, fertilized eggProtein inhibitor of activated STAT 1 TrassriptionTranscriptionTieg3NM.17835712A1	NK6 transcription factor related,			biastorysis, entoryo, rennized egg	
Protein kinase D2 IAD3 Heart, spleen, stomach, epidermis, adipose tissue, adrenal, mammary, salivary glands, thyroid, small, large intestines, bone, bonemarrow, B cells, CD4+, CD8+T cells, lymphnode, thymus, ovary, placenta, prostate, umbilical cord uterus, lung, trachea, main olfactory epithelium, vomeronasal organ, tongue, digits, balder, kidney Transcription E74-like factor 1 Preoptic, hypothalamus, olfactory bulb, spinal cordlower, liver, glycolsylation Protein Galnt10 NM.134189 11B1 Preoptic, hypothalamus, olfactory bulb, spinal cordlower, liver, glycolsylation Protein UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide Nacetylgalactosamine;polypeptide Nacetylgalac, cerebellum, spinal cordlower, substancia noffactory epithelium, tongue, embryo Unknown function offactory epithelium, tongue, embryo Pias1 AK162584 9 Heart, amygdala, cerebellum, spinal cordlower, substancia noffactory epithelium, vomeronasal organ, embryo, fertilized egg Unknown function noffactory epithelium, vomeronasal organ, embryo, fertilized egg Protein inhibitor of activated STAT 1 Transcription Transcription Tieg3 NM.178357 12A1 Heart, epidermis, sonut epidermis, Adipose tissue, adrenal, mammary, slatis, bone, dorsal root ganglia, ovary, placenta, prostate, umbilicial cord, uterus, lung, trachea, digits, bhadder, Transcription	rkd2	NM_178900	7A2	Heart, spleen, stomach, epidermis, Snout epidermis, brown fat, adipose tissue, adrenal gland, pituitary, large, small intestines, bone, bonemarrow, B cells, CD4+, CD8+ T cells, lymphnode, thymus, ovary, uterus, lung, trachea, vomeronasal organ, digitis, embryo, fertilized egg, oocyte	Intracellular signaling
E74-like factor 1 Galnt 10 NM.134189 11B1 Preoptic, hypothalamus, olfactory bulb, spinal cordlower, liver, epidermis, snout epidermis, retina, adipose tissue, salivary gland, pancreas, pituitary, thyroid, large, small intestines, bone, skeletal muscle, B Cells, Ivmphnode, thymus, dorsal root ganglia, ovary, placenta, prostate, testis, umbilical cord, uterus, main olfactory epithelium, tongue, embryo Protein UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide AK162584 9 Heart, amygdala, cerebellum, spinal cordlower, substancia olfactory epithelium, tongue, embryo Unknown function nigra, retina, brow fat, adipose tissue, adrenal, mammary, salivary glands, bone, skeletal muscle, B cells, CD4+, CD8+ T cells, lymphnode, thymus, olfactory epithelium, vomeronasal organ, embryo, fertilized egg Unknown function nammary glands, bone, of organglia, ovary, placenta, main olfactory epithelium, conserved, user and the cord organ gland, bane, cord, organ, embryo, fertilized egg Transcription	rrotein kinase D2 Elf1	NM_007920	14D3	Heart, spleen, stomach, epidermis, adipose tissue, adrenal, mammary, salivary glands, thyroid, small, large intestines, bone, bonemarrow, B cells, CD4+, CD8+T cells, lymphnode, thymus, ovary, placenta, prostate, umbilical cord, uterus, lung, trachea, main olfactory epithelium, vomeronasal organ, tongue, digitis, bladder, kidney	Transcription
UDP-N-acetyl-alpha-D- galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosamine: N-acetylgalactosamine: N-acetylgalactosamine: N-acetylgalactosamine: N-acetylgalactosamine: N-acetylgalactosamine: N-acetylgalactosamine: N-acetylgalactosamine: N-acetylgalactosamine: N-acetylgalactosamine: N-acetylgalactosamine: N-acetylgalactosamine: N-acetylgalactosamine:	774-like factor 1 Galnt10	NM_134189	11B1	Preoptic, hypothalamus, olfactory bulb, spinal cordlower, liver, epidermis, snout epidermis, retina, adipose tissue, salivary gland, pancreas, pituitary, thyroid, large, small intestines, bone, skeletal muscle, B cells, CD4+, CD8+ cells, Jmphhonde, thymus, dorsal root ganglia, ovary, placenta, prostate, testis, umblical cord uterus, main olfactory enithelium tongue embron	Protein glycolsylation
10 Pias1 AK162584 9 Heart, amygdala, cerebellum, spinal cordlower, substancia Unknown function Pias1 AK162584 9 Heart, amygdala, cerebellum, spinal cordlower, substancia Unknown function nigra, retina, brow fat, adipose tissue, adrenal, mammary, salivary glands, bone, skeletal muscle, B cells, CD4+, CCD8+T Cells, lymphnode. Hymus, prostate, main olfactory epithelium, vomeronasal organ, embryo, fertilized egg Protein inhibitor of activated STAT 1 Tieg3 NM.178357 12A1 Heart, epidermis, snout epidermis, Adipose tissue, adrenal, mammary glands, bone, dorsal root ganglia, ovary, placenta, prostate, umbilical cord, uterus, lung, trachea, digits, bladder, Transcription	JDP-N-acetyl-alpha-D- galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase			cora, aterus, man onactory epithenuin, tongae, emoryo	
Protein inhibitor of activated STAT 1 Tieg3 NM_178357 12A1 Heart, epidermis, snout epidermis, Adipose tissue, adrenal, Transcription mammary glands, bone, dorsal root ganglia, ovary, placenta, prostate, umbilical cord, uterus, lung, trachea, digits, bladder,	iu Pias I	AK162584	9	Heart, amygdala, cerebellum, spinal cordlower, substancia nigra, retina, brow fat, adipose tissue, adrenal, mammary, salivary glands, bone, skeletal muscle, B cells, CD4+, CCD8+ T cells, lymphnode, thymus, prostate, lung, trachea, main olfactory epithelium, vomeronasal organ, embryo, fertilized egg	Unknown function
	Protein inhibitor of activated STAT 1 Fieg3	NM_178357	12A1	Heart, epidermis, snout epidermis, Adipose tissue, adrenal, mammary glands, bone, dorsal root ganglia, ovary, placenta, prostate, umbilical cord, uterus, lung, trachea, digits, bladder,	Transcription

response 3

Table 1 (Continued)

Gene name	GenBank accession	Chromosome	Predominant expression	Molecular/biological function
St5	NM_029811	7E3	Heart, cerebellum, olfactory bulb, stomach, epidermis, snout epidermis, adrenal, salivary gland, pituitary, thyroid, large intestine, bone, thymus, ovary, placenta, prostate, testis, umbilical cord, uterus, lung, trachea, main olfactory epithelium, vomeronasal organ, tongue, digits, bladder, kidney, embryo	Unknown function
Zwint	NM_025635	1085	Amygdala, frontal cortex, preoptic, cerebellum, cerebral cortex, dorsal striatum, hippocampus, hypothalamus olfactory bulb, spinal cordlower, cordupper, substancia nigra, liver, retina, adipose tissue, adrenal gland, pituitary, trigeminal, dorsal root ganglia, placenta, umbilical cord, main olfactory epithelium, vomeronasal organ, blastocysts, embryo	Cell cycle
ZW10 interactor II18	NM_008360	9A5	Amygdala, frontal cortex, preoptic, cerebellum, cerebral cortex, hippocampus, hypothalamus olfactory bulb, spinal cordlower, cordupper, substancia nigra, liver, spleen, stomach, epidermis, snout epidermis, retina, adipose tissue, pituitary, large, small intestines, bone, bone, marrow, lymphnode, umbilical cord, lung, trachea, tongue digits	Immune response
Interleukin 18 Tspan3	NM_019793	90	Heart, dorsal striatum, hippocampus liver, spleen, stomach, brown fat, mammary, salivary glands, pancreas thyroid, small intestine, skeletal muscle, bonemarrow, placenta, prostate, testis, umblical cord, uterus, tongue, blastocysts, embryo fertilized egg, oocyte	Unknown function
Tetraspanin 3 Ccl3	NM_011337	110	Heart, dorsal striatum, hippocampus spinal cordupper, liver, spleen, epidermis, brown fat, mammary, salivary glands, pancreas, pituitary, thyroid, large, small intestine, skeletal muscle, bonemarrow, CD4+ T cells, dorsal root ganglia, placenta prostate, umbilical cord, bladder, embryo	Immune response
Chemokine (C–C motif) ligand 3 Fau	NM_007990	19A	Spleen, epidermis, snout epidermis, adipose tissue, mammary gland, pituitary, large, small intestines, bone, bonemarrow, B cells, CD4+, CD8+ T cells, thymus, ovary, prostate, umbilical cord, uterus, trachea, vomeronasal organ, tongue digitis, bladder. blastocysts, embryo	Translation
Finkel-Biskis-Reilly murine sarcoma virus (FBR-MuSV) ubiquitously expressed (for derived)				
Cond3	NM.007632	17C	Heart, stomach, snout epidermis, adipose tissue, adrenal gland, pituitary, large intestine, bone, bonemarrow, B cells, CD4+, CD8+ T cells, lymphnode, thymus, ovary, prostate, testis, umbilical cord, uterus, lung, bladder, kidney, embryo fertilized egg, oocyte	Cell cycle
Cyclin D3 Rab1	NM_008996	11A3	Amygdala, frontal cortex, hypothalamus, spinal cordlower, cordupper, substancia nigra, stomach, adrenal, mammary, salivary glands, pituitary, large, small intestines, skeletal muscle, trigeminal, ovary, placenta, prostate umbilical cord, uterus, lung, trachea main olfactory epithelium, vomeronasal organ, tongue, digitis, kidney, blastocysts	Intracellular protein transport
RAB1, member RAS oncogene family Fcgr1	NM_010186	3F2	Heart, cerebral cortex, dorsal striatum, liver, spleen, stomach, snout epidermis, brown fat, salivary gland pancreas, thyroid, skeletal muscle bonemarrow, CD8+ T cells, lymphnode, trigeminal, ovary, placenta, testis, uterus, vomeronasal organ, bladder, embryo, fertilized egg, oocyte	Immune response
Fc receptor, IgG, high affinity I Glb1	NM_009752	9F3	Preoptic, hypothalamus, stomach, adrenal, mammary, salivary glands, pancreas, pituitary, large intestine, bone, B cells, CD4+, CD8+ T cells, lymphnode, thymus, trigeminal, ovary, placenta, prostate, umbilical cord, trachea, uterus, vomeronasal organ, bladder, kidney, blastocysts, embryo	Metabolic process
Galactosidase, beta 1 Rgs1	NM_015811	1F	Spleen, stomach, adipose tissue, large intestine, B cells, CD4+, CD8+ T cells, lymphnode, thymus, umbilical cord, uterus, trachea, embryo	Signal transduction
Regulator of G-protein signaling 1	NM_010551	7D2-D3	Cerebellum, spleen, adipose tissue, bone, B cells, CD4+, CD8+ T cells, lymphnode, thymus, trachea	Immune response
Interieukin 16 Serpinb2	NM_011111	1E2	Epidermis, snout epidermis, bone, thymus, umbilical cord, trachea, tongue, digitis	Endopeptidase inhibitor activity

P.B. Donate et al. / Immunobiology 216 (2011) 591-603

Gene name	GenBank accession	Chromosome	Predominant expression	Molecular/biological function
Serine (or cysteine) peptidase				
inhibitor, clade B, member 2 Csnk1d	NM_139059	11E2	Amygdala, frontal cortex, preoptic, cerebellum, cerebral cortex, hippocampus, hypothalamus, spinal cordlower, olfactory bulb, substantia nigra, snout epidermis, adrenal gland, adipose tissue, B cells, CD4+, CD8+ T cells, lymphnode, thymus, trigeminal, ovary, placenta, prostate, uterus, dorsal root ganglia, lung, trachea, main olfactory epithelium, digitis, blastocysts, embryo, oocyte	Signaling pathway
Casein kinase 1, delta Mapk3	NM_011952	7F3	Amygdala, frontal cortex, preoptic, cerebral cortex, hippocampus, spinal cordlower, olfactory bulb, substantia nigra, spinal cordupper, stomach, epidermis, snout epidermis, adrenal gland, large, small intestine, bone, trigeminal, dorsal root ganglia, ovary, prostate, testis, uterus, lung, vomeronasal organ, tongue, digitis, bladder, oocyte	Signal transduction
Mitogen activated protein kinase 3 1700120K04Rik	BB475700	7F3	Testis	Unknown function
RIKEN CDNA 1700120K04 gene Trim24	NM_145076	6B1	Heart, liver, spleen, stomach, epidermis, brown fat, mammary, salivary glands, pancreas, pituitary, small intestine, bone, bonemarrow, CD4+, CD8+T cells, lymphnode, thymus, trigeminal, dorsal root ganglia, prostate, testis, umbilical cord, kidney, embryo, fertilized egg, oocyte	Transcription
Tripartite motif protein 24 CD209	NM_469815	19	Liver, spleen, epidermis, snout epidermis, retina, adipose tissue salivary gland, pancreas, thyroid, large, small intestines, bone, skeletal muscle, bonemarrow, B cells, lymphnode, thymus, ovary, uterus, lung, trachea, vomeronasal organ, digitis, bladder, embryo, fertilized egg, oocyte	Unknown function
CD209 molecule C1CL10	NM_021274	5E2	Heart, dorsal striatum, liver, spleen, brown fat, adrenal mammary, salivary glands, pancreas, thyroid, small intestine, skeletal muscle, bonemarrow, CD4+ T, trigeminal, prostate, tongue, bladder, kidney, embryo	Immune response
Chemokine (C-X-C motif) ligand 10 Dusp1	NM_013642	17A2	Heart, frontal cortex, cerebellum, cerebral cortex, olfactory, bulb, liver, epidermis, snout epidermis, retina, brown fat, adipose tissue, adrenal gland, pituitary, bone, skeletal muscle, B cells, CD4+ T cell, placenta, umbilical cord, lung, trachea, main olfactory epithelium, vomeronasal organ, tongue, digitis, kidney, fertilized egg, oocyte	Cell cycle
Dual specificity phosphatase 1 Hivep2	NM_010437	10	Amygdala, frontal cortex, preoptic, cerebral cortex, hippocampus, spinal cordlower, olfactory bulb, substantia nigra, cerebellum, dorsal striatum, hypothalamus, spinal cordupper, epidermis, retina, adipose tissue, adrenal gland, skeletal muscle, B cells, CD4+, CD8+T cells, lymphnode, thymus, skeletal muscle, dorsal root ganglia, umbilical cord, uterus, lung, trachea, main olfactory epithelium, tongue, digitis	Transcription
I enhancer binding protein 2				
Cx3cl1	NM_009142	8C5	Amygdala, frontal cortex, preoptic, cerebral cortex, hippocampus, spinal cordlower, olfactory bulb, substantia nigra, dorsal striatum, hypothalamus, spinal cordupper, retina, adipose tissue, adrenal gland pituitary, large, small intestines, prostate, lung, main olfactory epithelium, kidney	Immune response
Chemokine (C-X3-C motit) ligand 1 Zzz3	NM_198416	3H3	Heart, amygdala, frontal cortex, cerebral cortex, spinal cordlower, olfactory bulb, dorsal striatum, hypothalamus, spinal cordupper, spleen, epidermis, retina, brown fat adrenal, mammary glands, pancreas, pituitary, thyroid, bonemarrow, ovary, umbilical cord, lung, main olfactory epithelium, vomeronasal organ, bladder, embryo, fertilized egg, oocyte	Transcription
Zinc finger, ZZ domain containing 3 Atf4	NM_009716	15E1	Cerebellum, snout epidermis, retina, adrenal, salivary glands, pituitary, large intestine, bone, skeletal muscle, B cells, CD4+ T cells, thymus, umbilical cord, uterus, lung, trachea, main olfactory epithelium, vomeronasal organ, tongue, digitis, blastocysts, embryo, oocyte	Transcription
Activating transcription factor 4 Psap	NM_011179	1084	Amygdala, frontal cortex, preoptic, cerebral cortex, hippocampus, spinal cordlower, olfactory bulb, substantia nigra, dorsal striatum, hypothalamus, spinal cordupper, retina, adipose tissue, adrenal gland, B cells, lymphnode, trigeminal, dorsal root ganglia, ovary, placenta, prostate, umbilical cord, trachea, main olfactory epithelium, vomeronasal organ, kidney, blastocysts	Lipid metabolic process



Fig. 2. Representation of tissue/organ systems specific gene expression in the thymus of DBA-1/J and DBA-2/J strains during the emergence of collagen induced arthritis. Analysis of 4500 sequences was performed using glass slide CDNA microarrays, whose significant induced and repressed genes between the strains were annotated characterizing the promiscuous gene expression, which allow self-representation of tissue specific antigens in the thymic stoma of DBA-1/J (a) DBA-1/J (b).

induced in DBA-2/J. The network for both mouse strains was reconstructed putting together the MHC-*H2* gene transcript data and shows that PTA genes are actually connected. and *Fcgr1* (acc NM_010186) (both repressed in DBA-1/J), were also confirmed by qRT-PCR (Fig. 5).

Discussion

DBA-1/J network (Fig. 3a) features the MHC-H2 as a highly modulated gene node, i.e. besides self-modulation, this gene establish connection with 13 downstream PTA genes i.e. Prkd2, Rab1, Dusp1, Glb1, Fau, Nkx6-2, Ccnd3, Csnk1d, Serpinb2, Mapk3, Atf4, Trim24 and Pias1.

Nevertheless, DBA-2/J network (Fig. 3b) features different interactions, in which Ccnd3, Rab1, Fcgr1, Glb1 and Mapk3 are highly controlled PTA genes but MHC-H2 does not participate in such network i.e. it is not controlled by other genes than its own self-modulation, neither exert control over genes. Of note, in the absence of MHC-H2 participation, the Rab1, Glb1 and Mapk3 genes establish interactions among them, which are not observed in DBA-1/J.

Gene expression assessed by quantitative PCR

Using qRT-PCR, the expression levels of some autoantigen genes whose sequences were not included in the microarray used in this study, such as *Gad67* (acc NM_008077), *Ins 2* (acc NM_008387), type II collagen (acc NM_031163 and of the *Aire* gene (acc NM_009646) were compared in thymic stroma of DBA-1/J and DBA-2/J strains. The data show differences between the two mouse strains in which DBA-1/J featured down-regulation in all these genes (Fig. 4).

Moreover, the microarray expression levels of the genes *Bcap31* (NM_012060), *Prkrir* (acc NM_028410) (both induced in DBA-1/J), Promiscuous gene expression, characterized by the expression of PTAs in the thymus is an important factor involved in the control of self-tolerance (Derbinski et al. 2001; Gotter et al. 2004; Kyewski and Derbinski 2004). Exposure of differentiating thymocytes to a large variety of PTAs ensures the negative selection of self-reactive nascent T cells and prevents aggressive autoimmune reactions that lead to autoimmune diseases (Derbinski et al. 2001; Gotter et al. 2004). Thus, imbalance in PGE may favors migration of risky autoaggressive T cells to the periphery.

We subsume that the molecular genetic control of autoimmunity may involve a larger number of genes. Thus, we used the microarray method to evaluate the large scale gene expression profile of the thymic stroma in CIA model-system in which DBA-1/J mouse strain is susceptible and DBA-2/J is resistant to arthritis induction. Divergence in terms of gene expression between strains, as for example the 22 bone/joints genes that were repressed in DBA-1/J and induced in DBA-2/J (Fig. 2), were interpreted as an effect of the different genetic backgrounds since both strains received the same immunization schedule.

The relevance of the results on differential gene expression between the two strains of mice is that it allows a better view of the influence of different transcription levels of genes encoding PTAs in the thymus on the aggressive autoimmunity phenotype.



Fig. 3. Gene networks based on microarray expression data of locomotory system/bone PTAs and MHC-II in the thymic stroma of DBA-1/J and DBA-2/J strains. (a) DBA-1/J strain, (b) DBA-2/J strain. The arrows represent interactions between genes.





Fig. 4. Autoantigen gene expression in the thymic stroma of DBA-1/J and DBA-2/J strains. Quantitative real time PCR of the autoantigen genes *Ins2*, *Gad67*, *Col2a1* and *Aire* gene was used to compare the mRNA levels of type II collagen immunized DBA-1/J and DBA-2/J mice. Expression levels were normalized to *Gapdn*, n=3; mean ±SEM. The differences between responses were evaluated by oneway ANOVA followed by Bonferroni's correction. *p<0.05;**p<0.01 and ***p<0.001 were considered significant when compared to DBA-1/J mice group.

Fig. 5. Confirmation of microarray data by qRT-PCR. Real time PCR of the repressed genes *Bcap31* and *Prkrir*, and Fcgr1 (induced) was used to confirm the mRNA levels in thymic stroma of DBA-1/J and DBA-2/J mice, and in mTEC 3.10 cell line. Expression levels were normalized to *Capdh*, n = 3; mean \pm SEM. The differences between responses were evaluated by one-way ANOVA followed by Bonferroni's correction. *p < 0.05 and **p < 0.01 were considered significant when compared to medullary 3.10 TEC lineage.

Moreover, the promiscuous PTA genes were identified based on comparison with the expression profile of the cultured mTEC 3.10 cell line. This defined cell line allowed us to select PTA genes that are expressed by mTEC cells. Expression profiling of these genes were then investigated in the thymic stroma of DBA-1/J and DBA-2/J during collagen immunization.

The mTEC 3.10 cell line arose from a mouse with C57BL/6 background, which like DBA-2/J is resistant to CIA. Note that expression profiling of mTEC 3.10 cell line is more comparable to DBA-2/J than DBA-1/J (Fig. 1). This observation agrees with the idea that differential transcription of PTAs in the thymic stromal cells can be associated to manifestation of aggressive autoimmunity.

The set of differentially expressed PTA genes were then assigned to more than 60 murine tissues/organs, including bone/joints. This approach allowed comparison of PGE between the two mouse strains.

In the context of PGE, the transcription level of the autoimmune regulator (*Aire*) gene is also an additional and important factor that should be considered. Mutations along the human *AIRE* gene sequence are associated to an autoimmune disease called polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED), which suggests a role for this gene in the control of autoimmunity (Nagamine et al. 1997). *Aire* knock-out (KO) mouse model-system was of pivotal importance to demonstrate the functional role of this gene that encodes a transcription factor that positively controls the expression of a large number of PTAs, but can also act as negative regulator of other genes (Anderson et al. 2002; Derbinski et al. 2005).

The expression of Aire and the manifestation of autoimmune diseases are also affected by the different murine genetic backgrounds; Aire-deficient NOD mice develop severe exocrine pancreatitis, which is not observed in C57BL/6 or BALB/c mice (Jiang et al. 2005). Also, Aire-deficient mice on the B6 background had a much greater incidence and severity of CIA than did wild type (Campbell et al. 2009).

Recent evidence were important in the design of the present study: (1) *Aire* in cultured mTECs plays a role in concert establishing a cascade-like transcriptional network with *Gucy2d* gene in regulation of downstream PTA genes (Macedo et al. 2009) and (2) HLA-DRB1 and other non-HLA RA-susceptibility genes have a functional role and act in concert also establishing transcriptional networks in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of RA patients (Silva et al. 2009). Moreover, to the best of our knowledge, PGE and expression of *Aire* in the thymus of DBA-1/J background mice were not still described.

Our results show that the expression of *Aire* and joint/bone PTA genes decreased in the thymic stroma of DBA-1/J. In the context of CIA, down-regulation of joint/bone PTA genes may signal a reduction in the negative selection of respective autoreactive thymocyte clones, which could contribute to a subsequent autoimmune reaction against these antigens in the periphery. Down regulation of *Aire*-dependent insulin autoantigen, although not directly related to CIA, may illustrate that the general tolerance mechanism is imbalanced in the DBA-1/J strain. This is in contrast to normal non-autoimmune mouse strains, in which the thymic expression of this gene does not alter over time (Kyewski and Derbinski 2004).

However, Aire does not control the expression of all antigens in the thymic stroma. For example, Aire does not regulate betaor kappa-casein, C-reactive protein or glutamic acid decarboxylase (Gad67) (Derbinski et al. 2005). In fact Aire has a limited role in modulating the transcription of terminally differentiating mTECs. The expression of transcription factors associated with developmental plasticity of progenitor mTEC cells as for example Nanog, Oct4, and Sox2, was Aire dependent (Gillard et al. 2007). Moreover, Aire employs a histone-binding module to mediate immunological tolerance, linking chromatin regulation with organ-specific autoimmunity (Koh et al. 2008).

Recent observation showed that Aire besides acting as a transcription factor also cooperate with other genes in cascade transcriptional networks, thus indirectly controlling downstream PTA genes (Macedo et al. 2009).

Because Aire does not directly control the expression of all antigens in the thymic stroma, we assayed Gad67, an autoantigen gene that is not influenced by Aire expression. Our results show that this autoantigen gene was also down-regulated in DBA-1/J.

Although there are controversies about the Aire-dependency of this antigen in the thymus, CII was expressed in murine and human mTECs (Gotter et al. 2004; Chin et al. 2006), and its role in central tolerance and the consequent evolvement in autoimmunity process have been demonstrated (Campbell et al. 2009). In particular, the higher prevalence of CII-specific antibodies and T cells noted during the early phase of RA indicate that CII-specific immunity plays an important role in the initiation of inflammation in the articular joints (Kim et al. 2004). Due to its importance in the arthritis stroma of both strains, which was also down-regulated in DBA-1/J.

In addition to imbalance in the thymic gene expression, we realize that the emergence of an autoimmune disease is depending on more complex mechanisms in which participate environmental factors as food, drugs or exposure to foreign antigens (microbes?) in association to genetic background of MHC alleles. In RA, complex environmental and genetic factors are believed to contribute to their development (Oliveira et al. 2008). Human leukocyte antigen genes class II region on chromosome 6 (HLA-DRB1 alleles *0401, *0404, *0405, *0408, *0101, *0102, *1001 and *1402) have been strongly associated with susceptibility to the disease, according to the population studied (du Montcel et al. 2005).

The imbalance in the gene expression evaluated by microarrays data provides evidence for PGE deregulation, which might be under the control of a regulatory transcriptional network. In this study we assessed the hypothesis that PTA gene expression is controlled in cascade-like transcriptional network in which participate the MHC locus. Thus, comparing DBA-1/J ($H2^q$) with DBA-2/J ($H2^d$) mice, it was possible to observe the influence of different MHC backgrounds on thymic gene expression.

Reconstruction of transcriptional networks enables us to observe that in DBA-1/J PTA genes are connected to MHC H2, which has a controller role (Fig. 3a). It corroborates with previous results firstly showing that PGE in murine mTEC cells is under transcriptional control (Macedo et al. 2009) and secondly that in man the HLA-DRB1 rheumatoid arthritis susceptibility allele is connected to FNDC3A (fibronectin type III domain containing 3A) throughout transcriptional interaction. Given that fibronectin fragments can stimulate mediators of matrix and cartilage destruction in RA, this interaction involving HLA-DRB1-FNDC3A is of special interest (Silva et al. 2009).

These findings strongly suggest that the different MHC haplotypes, H2^q in DBA-1/J or H2^d in DBA-2/J, can establish different transcriptional interactions with PTA genes or even establish no any interaction, as observed in DBA-2/J strain considering the genes studied. The differential transcriptional interaction involving MHC and PTAs may have consequences in the self-representation and consequently in the RA susceptibility/resistance phenotypes.

Acknowledgements

This work was supported by grants from FAPESP and CNPq (Brazil) and CNPq-INSERM (France) international scientific agreement. qRT-PCRs were carried out at Dr. Zilá L.P. Simões's Laboratory, University of São Paulo at Ribeirão Preto. We thank Dr. Elza Tiemi

P.B. Donate et al. / Immunobiology 216 (2011) 591-603

Sakamoto-Hojo and Dr. Eduardo A. Donadi by the laboratory facilities and Mrs. leda Regina dos Santos by their technical assistance.

References

- Anderson, G., Jenkinson, W.E., Jones, T., Parnell, S.M., Kinsella, F.A., White, A.J., Pon-grac'z, J.E., Rossi, S.W., Jenkinson, E.J., 2006. Establishment and functioning of intrathymic microenvironments. Immunol. Res, 209, 10–27. Anderson, M.S., Venazi, 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 immuno-round and an annuncember of the second secon
- Jopical Service, Andrew Mithin the thymus by aire protein. Science 298, 1395–1401.
 Bleul, C.C., Corbeaux, T., Reuter, A., Fisch, P., Monting, J.S., Boehm, T., 2006. Formation of a functional thymus initiated by a postnatal epithelial progenitor cell. Nature 441, 902. OPG
- of a functional thymus initiated by a postnatal epithelial progenitor cell. Nature 441, 992–996.
 Campbell, I.K., Kinkel, S.A., Drake, S.F., van Nieuwenhuijze, A., Hubert, F.X., Tarlinton, D.M., Heath, W.R., Scott, H.S., Wicks, I.P., 2009. Autoimmune regulator controls T cell help for pathogenetic autoantibody production in collagen-induced arthritis. Arthritis Rheum. 60, 1683–1693.
 Chin, R.K., Zhu, M., Christiansen, P.A., Liu, W., Ware, C., Peltonen, L., Zhang, X., Cuo, L., Han, S., Zheng, B., Fu, Y.X., 2006. Lymphotoxin pathway-directed, autoimmune regulator-independent central tolerance to arthritogenic collagen. J. Immunol. 127, 200, -027.
- 177, 290–297. rbinski, J., Gåbler, J., Brors, B., Tierling, S., Jonnakuty, S., Hergenhahn, 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. binski, J., Schulte, A., Kyewski, B., Xlein, L., 2001. Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. Nat. Immunol. 2, 1032–1039. Derb
- Derl
- Eisen, M.B., Spellmam, 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.
- 14865-14868.
 Pornari, 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.
 Gillard, G.O., Dooley, J., Erickson, M., Peltonen, L., Farr, A.G., 2007. Aire-dependent alterations in medullary thymic epithelium indicate a role of Aire in thymic epithelial differentiation. J. Immunol. 178, 3007–3015.
 Cotter, J., Brors, B., Hergenhahn, M., Kyewski, B., 2004. Medullary epithelial cells of the human thymus express a highly diverse selection of tissue-specific genes colocalized in chromosomal clusters. J. Exp. Med. 199, 155–166.
 Gray, D.H., Chidgey, A.P., Boyd, R.L. 2002. Analysis of thymic stromal cell populations using flow cytometry. J. Immunol. Methods 260, 15–28.
 Hegde, P., Qi, R., Abernathy, K., Gay, C., Dharap, S., Gaspard, R., Hughes, J.E., Snesrud, E., Lee, N., Quaekenbush, J. 2000. A concise guide to cDNA microarray analysis. Biotechniques 29, 548–556.
 Hirokawa, K., Utsuyama, M., Moriizumi, E., Handa, S., 1986. Analysis of the thymic microarray analysis. Biotechniques 29, 548–556.
 Hirokawa, K., Utsuyama, M., Moriizumi, E., Handa, S., 1986. Analysis of the thymic nurse cells. Thymus 8, 349–360.
 Jiang, W., Anderson, M.S., Bronson, R., Mathis, D., Benoist, C., 2005. Modifier loci condition autoimmunity provoked by Aire deficiency. J. Exp. Med. 202, 205–815. Fornari, T.A., Donate, P.B., Macedo, C., Marques, M.M.C., Magalhães, D.A., Passos, G.A.

- condition autoimmunity provoked by Aire deficiency. J. Exp. Med. 202, 805–815.
 Kim, W.U., Cho, M.L., Jung, Y.O., Min, S.Y., Park, S.W., Min, D.J., Yoon, J.H., Kim, H.Y., 2004. Type II collagen autoimmunity in rheumatoid arthritis. Am. J. Med. Sci. 327, 202-211

- Koh, A.S., Kuo, A.J., Park, S.Y., Cheung, P., Abramson, J., Bua, D., Carney, D., Shoelson, S.E., Gozani, O., Kingston, R.E., Benoist, C., Mathis, D., 2008. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 105, 15878–15883.
 Kyewski, B., Derbinski, J., Gotter, J., Klein, L., 2002. Promiscuous gene expression and central T-cell tolerance: more than meets the eye. Trends Immunol. 23, 364–371.
 Kyewski, B., Derbinski, J., 2004. Self-representation in the thymus: an extended view. Nat. Rev. Immunol. 4, 688–698.
 Macedo C. Yannelista C. Manaro, L. J., Marta C. M.

- 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., Passo, G.A., 2009. Evi-dence 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.
 du Montcel, S.T., Michou, L., Petit-Teixeira, E., Osorio, J., Lemaire, I., Lasbleiz, S., Pier-lot, C., Quillet, P., Bardin, T., Prum, B., Cornelis, F., Clerget-Darpoux, F., 2005. New classification of HLA-DRB1 alleles supports the shared epitope hypothesis of rheumatoid arthritis susceptibility. Arthritis Rheum. 52, 1063–1068.
 Nagamine, K., Peterson, P., Scott, H.S., Kudoh, J., Minoshima, S., Heino, M., Krohn, K.J., Lalioti, M.D., Mullis, P.E., Antonarakis, S.E., Kawasaki, K., Asakawa, S., Ito, F., Shimizu, N., 1997. Positional cloning of the APECED gene. Nat. Genet. 17, 393–398. 393-398
- 393–398. Oliveira, R.D., Junta, C.M., Oliveira, F.R., Silva, L.M., Donadi, E.A., Louzada-Junior, P., 2008. Share epitope, citrullinated cyclic peptide antibodies and smoking in Brazilian rheumatoid arthritis patients. Clin. Rev. Allergy Immunol. 34, 32–35. Ramsey, C., Winqvist, O., Puhakka, L., Halonen, M., Moro, A., Kămpe, O., Eskelin, P., Pelto-Huikko, M., Peltonen, L., 2002. Aire deficient mice develop multiple features of APECED phenotype and show altered immune response. Hum. Mol. Const. 13, 102–409. Genet, 11, 397-409
- Genet. 11, 397–409.
 Silva, G.L., Junta, C.M., Sakamoto-Hojo, E.T., Donadi, E.A., Louzada-Junior, P., Passos, G.A.S., 2009. Genetic Susceptibility Loci in Rheumatoid Arthritis Establish Transcriptional Regulatory Networks with Other Genes, Contemp. Challenges Autoimmun. 1173, 521–537.
 Sousa Cardoso, R., Magalhaes, D.A., Baiào, A.M., Junta, C.M., Macedo, C., Marques, M.M., Sakamoto-Hojo, E.T., Onadi, E.A., Passos, G.A., 2006. Onset of promiscuous gene expression in murine fetal thymus organ culture. Immunology 119, 369–375.
- 369-375.

- 369–375.
 Tiwari, T.L., Terasaki, P.L., 1985. HLA and Disease Associations. Springer, p. 19.
 Tusher, V.G., Tibshirani, R., Chu, G., 2001. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98, 5116–5121.
 Van Ewijk, W., 1991. T-cell differentiation is influenced by thymic microenviron-ments. Annu. Rev. Immunol. 9, 591–615.
 Vyacheslav, A.A., Tamás, B.S.C., Mathew. T.P.K.M., Tibor, T.G., 2002. Major histocom-patibility complex controls susceptibility and dominant inheritance, but not the severity of the disease in mouse models of rheumatoid arthritis. Immunogenet-ics 54, 184–192.
 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 epithe-
- 2000. Is there a glycosaminoglycan-related heterogeneity of the thymic epithe lium. J. Cell. Physiol. 185, 68–79.
- num, J. Cell. Physiol. 185, 68–79.
 Wooley, P.H., Luthra, H.S., Stuart, J.M., David, C.S., 1981. Type II collagen-induced arthritis in mice. I. Major histocompatibility complex (I Region) linkage and antibody correlates. J. Exp. Med. 154, 688–700.
 Wu, C.C., Huang, H.C., Juan, H.F., Chen, S.T., 2004. GeneNetwork: an interactive tool for reconstruction of genetic networks using microarray data. Bioinformatics 20, 3691–3693.

Molecular Immunology 46 (2009) 3240-3244

Contents lists available at ScienceDirect

Molecular Immunology journal homepage: www.elsevier.com/locate/molimm



Evidence for a network transcriptional control of promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells

Cláudia Macedo^a, Adriane F. Evangelista^a, Danielle A. Magalhães^a, Thaís A. Fornari^a, Leandra L. Linhares^b, Cristina M. Junta^a, Guilherme L. Silva^a, Elza T. Sakamoto-Hojo^a, Eduardo A. Donadi^c, Wilson Savino^b, Geraldo A.S. Passos^{a,d,*}

nogenetics Group, Department of Genetics, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo (USP), Via Bandeirantes, 3900, 14040-900 Ribeirão Preto, SP, Brazil
 ^b Laboratory on Thymus Research, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, RJ, Brazil
 ^c Division of Clinical Immunology, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto, SP, Brazil
 ^d Discipline of Genetics (DMEF), Faculty of Dentistry of Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history: Received 24 July 2009 Received in revised form 4 August 2009 Accepted 4 August 2009 Available online 31 August 2009

Keywords Thymus Medullary thymic epithelial cells Promiscuous gene expressio Aire Gene network Central T cell tolerance Autoantigen Autoimmunity

ABSTRACT

The expression of peripheral tissue antigens (PTAs) in the thymus by medullary thymic epithelial cells (mTECs) is essential for the central self-tolerance in the generation of the T cell repertoire. Due to hetero-geneity of autoantigen representation, this phenomenon has been termed promiscuous gene expression (PGE), in which the autoimmune regulator (Aire) gene plays a key role as a transcription factor in part of these genes. Here we used a microarray strategy to access PGE in cultured murine CD80° 3.10 mTEC line. Hierarchical clustering of the data allowed observation that PTA genes were differentially expressed being possible to found their respective induced or repressed mRNAs. To further investigate the control of PGE, we tested the hypothesis that genes involved in this phenomenon might also be modulated by transcriptional network. We then reconstructed such network based on the microarray expression data, featuring the guanylate cyclase 2d (Gucy2d) gene as a main node. In such condition, we established 167 positive and negative interactions with downstream PTA genes. Silencing Aire by RNA interference, Gucy2d while down regulated established a larger number (355) of interactions with PTA genes. T- and G-boxes corresponding to AIRE protein binding sites located upstream to ATG codon of Gucy2d supports this effect. These findings provide evidence that Aire plays a role in association with Gucy2d, which is connected to several PTA genes and establishes a cascade-like transcriptional control of promiscuous gene expression in mTEC cells.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The discovery of promiscuous gene expression (PGE) in the thymus allowed a better understanding for central tolerance in the generation of the T cell repertoire, consequently placing a mechanism for self versus non-self discrimination by T lymphocytes (Kyewski et al., 2002; Gallegos and Bevan, 2006; Tikocinski et al., 2008). Accordingly, the main implication of this heterogeneous gene expression in the thymus is associated with the maintenance of the immunological homeostasis in the body, controlling the pathogenic autoimmune reactions. The set of expressed genes that characterize PGE is as broad as possible, and comprises up to 5-10% of the all known mouse genes (Derbinski et al., 2001; Gotter et al., 2004; Kyewski and Derbinski, 2004).

The extent of self-representation of most parenchymal tissues and organs is guaranteed by PGE in the thymus, a phenomenon exhibited by medullary thymic epithelial cells (mTECs), and that has characterized during the ontogenetic development of the murine thymus (Sousa Cardoso et al., 2006; Magalhães et al., 2006).

Part of PGE is under the control by the transcription factor Aire (autoimmune regulator) (Derbinski et al., 2005). The expression profiling of mTECs isolated from Aire-knockout mice allowed the identification of autoantigen-encoding genes, such as insulin, salivary protein-1 and fatty-acid-binding protein, which thus, are under Aire control (Anderson et al., 2002, 2005). Nevertheless, other PTA genes, such as C-reactive protein and glutamic acid decarboxilase of 67 kDa (GAD67), appeared to be independent of Aire expression. Moreover, Aire regulates transcription of genes that do not encode PTAs (Derbinski et al., 2005) and can play a role as a

^{*} Corresponding author at: Molecular Immunogenetics Group, Department of Genetics, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo (USP), Via Bandeirantes, 3900, 14040-900 Ribeirão Preto, SP, Brazil, Tel.: +55 16 3602 3030; fax: +55 16 3633 0069.

E-mail address: passos@rge.fmrp.usp.br (G.A.S. Passos)

^{0161-5890/\$ -} see front matter © 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved. doi:10.1016/j.molimm.2009.08.002
3241

C. Macedo et al. / Molecular Immunology 46 (2009) 3240-3244

repressor of certain other loci (Mathis and Benoist, 2007, 2009). How Aire plays a concerted regulation of the myriad of PTA genes to guarantee the proper autoantigen representation in the thymus remains undefined. Therefore, detailed molecular mechanism(s) of action still require(s) further investigation. In this context, we evaluated whether PTA genes in mTEC cells establish network interactions upon Aire regulating, which would reflect the existence of a cascade-like transcriptional control of PGE.

2. Material and methods

2.1. Medullary thymic epithelial cell line

The medullary 3.10 TEC line (mTEC) was kindly provided by Willem van Ewijk (Rotherdam University, The Netherlands) to one of us (W.S.). This TEC line was established from C57BL/6 mice and the medullary phenotype was determined by immunostaining with Th-3 and Th-4 antibody, recognizing cortical and medullary phenotypes, respectively (Hirokawa et al., 1986; Mizuochi et al., 1992). They 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 10% fetal bovine serum-supplemented RPMI 1640 medium at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere.

2.2. Silencing Aire gene transcript

We used the TriFectaTM (IDT, Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA) anti-Aire RNAi sequence (GGAUUCUCUUUAAG-GACUACAAUCTAGAUUGUAGUCCUUAAAGAGAAUCCUC) in order to silencing Aire mRNA. Confluent cultures of 3.10 mTEC cell line were transfected with 10 nM of anti-Aire siRNA using Hiperfect reagent (Qiagen, GmbH, Hilden, Germany) following manufacturer's instructions. After transfection, cells were cultured during 24h in RPMI medium as above mentioned and total RNA was extracted using the mirVana kit® (Ambion, Austin, TX, USA), which served as template for cDNA synthesis. Gene knockdown was confirmed by quantitative reverse transcription PCR (gRT-PCR) using the primers 5'-GCAACTCTGGCCTCAAAGAG-3' forward and 5'-GGTCTGAATTCCGTTTCCAA-3' reverse, which allowed amplification of a 120 bp PCR product corresponding to a segment of the Aire cDNA. The cDNA samples were prepared using Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) enzyme, as recommended. Expression of the above mentioned genes was quantified using a 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) and normalized to the expression of the housekeeping gene HPRT (accession number NM_013556).

An anti-HPRT siRNA included in the TriFecta kit was used in parallel to evaluate the efficiency of the gene knockdown assay in the 3.10 mTEC line (data not shown).

2.3. Microarray preparation and probe hybridization

The gene expression of 3.10 mTECs was assessed using glass slide cDNA microarrays prepared on silane-coated UltraGAPS slides (# 40015, Corning®, New York, NY, USA) containing a total of 4500 target tissue restricted antigen cDNA sequences, representing most of murine tissue and organs. These were from the Soares thymus 2NbMT normalized library, representing expressed sequence tag (ESTS) cDNA clones prepared from the thymus of a C57BL/6J 4week-old male mouse, and available at the IMAGE Consortium (http://image.hudsonalpha.org/).

The microarrays were prepared based on published protocols using PCR products from the cDNA clones (Hedge et al., 2000) using a Generation III Array Spotter (Amersham Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA). A complete file providing all genes and ESTs present in the microarray used in this study, as well as the experimental conditions, is available on line at MIAME public database (http://www.mged.org/Workgroups/MIAME/miame.html) Array Express accession E-MEXP-2181.

2.4. Microarray data analysis

The microarray image quantification was performed using the Spotfinder software (http://www.tm4.org/spotfinder.html). The normalization process was carried out using the R platform (http://www.t-project.org) and statistical data were analyzed using the Multiexperiment Viewer (MeV) software (version 3.1; available online at http://www.tm4.org/mev.html). The differentially expressed genes (induced or repressed) between control and Aire-silenced mTECs were identified by using the significance analysis of microarrays software SAM (http://wwwstat.stanford.edu/~tibs/SAM/) (Tusher et al., 2001) considering only those genes presenting both FDR (false discovery rate) and *p*-value ≤ 0.01 .

To analyze the gene expression profiling we used an unsupervised hierarchical clustering method that grouped genes on the vertical axis and samples on the horizontal axis, on the basis of similarities and dissimilarities in respect to their expression patterns (Eisen et al., 1998) (Cluster version 3.0 and Java Tree View softwares available at http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm).

2.5. Determination of PGE in mTECs

PGE was identified based on the microarray analysis of the different mouse organs, using combined information from the public databases BioGPS (formerly SymAtlas) (http://biogps.gnf.org/?referer=symatlas#goto=welcome) and/or SOURCE (http://smd.stanford.edu/cgi-bin/source/sourceSearch). These data banks show gene expression in more than 60 mouse tissue/organs, as assessed by gene array analysis using Affymetrix microarrays. Data information includes GenBank accession, chromosomal location, tissue/organ representation and molecular/biological function of each gene analyzed.

In our study, we only considered the promiscuous genes of which the expression was detected in different organs or tissues and of which the expression levels were greater than median in relation to all other organs. The modulation of transcription levels (repression or induction) of these genes was evaluated comparing control versus Aire-silenced 3.10 mTECs.

2.6. Reconstruction of gene networks

The GeneNetwork 1.2 algorithm (Wu et al., 2004) was applied to compare means of different gene expression values whose standard deviation did not overlap, whose objective was to compute a network that established relationships between all genes. The linear interpolation for the network organization was used. The software for this algorithm can be obtained from the authors (http://idv.sinica.edu.tw/hchuang/GeneNetwork1.2Setup.exe).

In order to organize networks only with genes whose expression values were significant, we used values for the induced and repressed genes selected by the SAM statistics. In this case, of the 4500 sequences present on the microarray, a total of 218 from control and 218 from Aire-silenced 3.10 mTECs differentially expressed genes were included in the calculations of the GeneNetwork software due to their statistical significance.

2.7. Identification of AIRE-binding sites on Gucy2d gene

The Pattern matching/DNA-pattern tool, which is available at http://rsat.ulb.ac.be/rsat, was used to predict AIRE transcription factor binding sites (T-box, TTATTA and G-box, GATTGG) located

C. Macedo et al. / Molecular Immunology 46 (2009) 3240-3244

from 0.5 kb to approximately 10 kb upstream to ATG initiation codon of the Gucy2d gene (Kumar et al., 2001).

2.8. Oligonucleotide primer design and quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)

Microarray data were confirmed using qRT-PCR of three PTA genes (Gucy2d, IL12 and Mecp2) that differed between control mTECs versus mTECs transfected with anti-Aire RNAi. The genes were elected based on their expression pattern and hierarchical clustering.

The cDNA sequences of these genes were retrieved from the NCBI GenBank database: Gucy2d (accession number NM_001474410), IL12 (accession number NM_008351.1), Aire (accession number NM_009646.1), Mecp2 (accession number NM_010788). The Primer3 web tool (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi) was used to select pairs of oligonucleotide primers spanning an intron/exon junction with an optimal melting temperature of Go®C. The following (forward and reverse) pairs of primers were used: Gucy2d (GGACTGAGGAGCTGCAATG and GAAG-TACTCGGGCTCACTG), IL12 (CCACTGGAACTACACAAGAACG and AGATGCTACCAAGGCACAGG) and Mecp2 (TTCCTGGCCAGTCCT-TAGTG and GAATGGGGCAAGATCTCTCA). The cDNA samples, qRT-PCR and normalization were as above mentioned (Section 2.2).

3. Results

3242

3.1. Silencing Aire in mTECs

Initially we demonstrated by qRT-PCR that the 3.10 mTEC cell line expresses Aire mRNA and that anti-Aire RNAi, when transfected to these cells, was able to abrogate Aire gene expression (Fig. 1).



Fig. 1. Silencing of Aire gene transcript in mTEC 3.10 cells by RNA interference (RNAi) as evaluated by qRT-PCR (n = 3, p < 0.05, Student's *t*-test).



Fig. 2. Hierarchical clustering analysis of gene expression microarray data of PTAs in control or Aire-silenced (RNAi) mTEC 3.10 cells. Note that, among others, Guy2d gene was down regulated after Aire silencing. Red = up regulation, green = down regulation, black = unmodulated and gray = missing data (Pearson correlation metrics). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

3.2. Genes differentially expressed after Aire gene silencing

Fig. 2 shows the gene expression hierarchical clustering of statistically significant microarray data from control versus Aire-silenced mTEC cells. It was possible to see 218 modulated PTA genes from which 137 were induced in control and repressed in Aire-silenced mTECs, thus strongly suggesting that these genes are under control of the Aire gene. The microarray gene expression data for some representative genes were confirmed by qRT-PCR (Fig. 3). The differentially gene data set was then compared with BioGPS and/or SOURCE databases allowing picturing the parenchymal organ representation by PGE after Aire silencing in mTECs. The PTA genes were grouped in 17 body systems, which are represented in mTEC (data not shown).

3.3. Gene networking

Fig. 4A shows that PTA genes featuring PGE in mTECs are actually connected within the network. In this context, the Gucy2d gene, which is up regulated in control mTECs, likely functions as a gene node due to the 167 interactions observed. Gucy2d was a negative self-regulator and established 74 positive and 8 negative interactions with other genes while received 12 positive and 72 negative interactions from other genes. From the input of 218



Fig. 3. Quantitative RT-PCR for microarray data confirmation of gene expression levels in control and Aire gene silencing by RNA interference (RNAi) in mTEC 3.10 cells. Gucy2d and IL12 genes were down regulated whereas Mecp2 gene was up regulated after Aire silencing (n=3, p<0.05, Student's t-test).

genes, which were modulated (up- or down regulated) in control and Aire-silenced mTECs, 71 are missing in the network (Fig. 2).

When Aire was silenced in mTECs, Gucy2d gene expression was repressed, but still played a role as a gene node due to the 355 interactions observed (Fig. 4B). This gene was a negative self-regulator and established 78 positive and 120 negative interactions with other genes while received 77 positive, 46 negative and 33 simultaneous negative interactions from other genes. From the input of 218 modulated genes only 3 were missing in this network.

3.4. AIRE-binding sites on the Gucy2d gene

In the last group of analysis (see Fig. 5) we found the location of six T-boxes (TTATTA) and four G-boxes (GATTGG), which are AIRE protein binding sites, spanning from 0.5 to approximately 10 kb upstream to ATG initiation codon of Gucy2d gene.

4. Discussion

The genetic elements and/or mechanisms involved in the central tolerance are peculiar. Firstly, due to the uniqueness feature of PGE in which is included a large set of PTA genes that code virtually all body autoantigens. Secondly, Aire, which at the same time exerts control over a large proportion of such genes, is not the only controller of PGE.

Aire has many features of a transcription factor, sharing several domains with known transcriptional control elements (Bottomley et al., 2001; Isaac et al., 2006) and can also associate with other transcription factors, such as CERB-binding protein (CBP), at least in vitro (Pitkänen et al., 2005). Moreover, Aire may interact with PIAS1 in transcriptional regulation (Ilmarinen et al., 2008).



Fig. 4. Gene networks based on microarray PTA gene expression of mTEC 3.10 cells. (A) Control mTECs and (B) Aire-silenced mTECs. Gucy2d represent the gene node. The arrows represent positive interactions (\rightarrow) , simultaneous positive interactions (\leftrightarrow) , negative interactions $(-\rightarrow)$ or simultaneous negative interactions $(<\rightarrow)$. The numbers of genes establishing the different types of interactions are encircled.

The wideness of Aire transcriptional impact might argue against the notion of a classical site-specific control element, as it is not easy to envision that AIRE-binding site occurs in thousands of promoters of such disparate structure (Mathis and Benoist, 2007). A recent study favors a stochastic mechanism of the PGE due to lack of gene expression pattern in individual mTECs freshly isolated from the mouse thymus. The authors consider that particular stoichiometry of transcription factors, which may fluctuate in individual mTECs, might then regulate the gene expression pattern in a given TEC, at a given time *in vivo* (Derbinski et al., 2008). This suggests an additional mode of action for the Aire gene and/or PGE control mechanism.

Although PGE is a well documented phenomenon, whether or not PTA genes are connected in networks and what is the role of the Aire gene in this context, remain to be defined. Herein, we used a purified CD80° mature mTEC line to further explore the role of the Aire and possibly other genes in the control of PGE. The Aire gene silencing by RNA interference, qRT-PCR and microarray data analy-

- 10000	- 9000	- 8000	- 7000	- 6000	- 5000	- 4000	- 3000	- 2000	- 1000	- bn	
Gucy2d ←		i.							Ĺ		GATTGG
			.]						-11	- AIG	

Fig. 5. Localization of AIRE-binding sites (T-boxes, TTATTA and G-boxes, GATTGG) from 0.5 kb to approximately 10 kb upstream to ATG initiation codon of the Gucy2d gene (bp = base pairs). The vertical bars locate the binding sites.

C. Macedo et al. / Molecular Immunology 46 (2009) 3240-3244

sis, including gene networking, which permits the determination of interactions between genes, were methods allowing accomplishing these objectives. In a previous work we showed that this approach is adequate for gene networking involving thymus (Macedo et al., 2008)

GeneNetwork software was then applied, together with data derived from SAM statistics. Thus, the gene networks were reconstructed on the basis of differentially expressed genes (induced or repressed), which presented a false discovery rate (FDR) \leq 0.01. We found that the 218 PTA modulated genes in control and Aire-silenced mTECs are connected in networks in which Gucy2d represents a gene node. After Aire gene silencing Gucy2d, while down regulated, has become a more important controller, establishing a greater number of interactions over downstream PTA genes.

Considering that AIRE protein binds in vivo to specific DNA sequence motifs of genes which it controls (Kumar et al., 2001; Ruan et al., 2007), we investigated whether Gucv2d gene harbor these motifs, which were found as T- (TTATTA) and G-(GATTGG) boxes spanning from 0.5 kb to approximately 10 kb upstream to ATG codon. The inexistence of any other ORF sequence in this interval, as evaluated by using the ORF-finder tool (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html), supports the association of the T- and G-boxes found to Gucy2d gene. However, other genes with similar network association to Aire may exist and be detected, depending on the set of genes present in different microarray platforms and/or if the mTEC are freshly derived from a mouse thymus.

In any case, our findings provide evidence that PTA genes in mTECs are connected, as evaluated by transcript networking, reflecting the existence of a cascade-like control of the promiscuous gene expression.

Acknowledgements

This study received financial support from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp, São Paulo, Brazil), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa no Estado do Rio de Janeiro (Faperj, Rio de Janeiro, Brazil) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasília, Brazil). qRT-PCRs were carried out at Dr. Zilá L. P. Simões's Laboratory, University of São Paulo at Ribeirão Preto. We thank Dr. Catherine Nguyen, from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm, Marseille, France) for the cDNA clones used in the preparation of the microarrays.

References

- Anderson, M.S., Venanzi, E.S., Klein, L., Chen, Z., Berzins, S.P., Turley, S.I., von Boehmer, Haderson, M.S., Chaniel, E.S. ANDRI, E. CRUIT, Z. OCTURIS 23, CHONENS, J. H., Bronson, R., Dierich, A., Benoist, C., Mathis, D., 2002. Projection of an immuno-logical self-shadow within the thymus by aire protein. Science 298, 1395–1401. Anderson, M.S., Venanzi, E.S., Chen, Z., Berzins, S.P., Benoist, C., Mathis, D., 2005. The NOD mouse: a model of immune dysregulation. Annu. Rev. Immunol. 23, 447, 467. 447-485
- 447–485.
 Bottomley, M.J., Collard, M.W., Huggenvik, J.I., Liu, Z., Gibson, T.J., Sattler, M., 2001. The SAND domain structure defines a novel DNA-binding fold in transcriptional regulation. Nat. Struct. Biol. 8 (7), 626–633.
 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., Gabler, J., Brors, B., Tierling, S., Jonnakuty, S., Hergenhahn, M., Peltonen, L., Walter, J., Kyewski, B., 2005. Promiscuous gene expression in thymic epithelial cells is regulated at multiple levels. J. Exp. Med. 202 (1), 33–45.
 Derbinski, J., Pinto, S., Rösch, S., Hexel, K., Kyewski, B., 2008. Promiscuous gene expression patterns in single medullary thymic epithelial cells argue for a stochastic mechanism. Proc. Natl. Acad. Sci. U.SA. 105 (2), 657–662.
 Eisen, M.B., Spellman, P.T., Brown, P.O., Botstein, D., 1998. Cluster analysis and display of genome wide averageing patterne. Proc. Natl. Acad. Sci. U.SA.
- display of genome-wide expression patterns, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95, 14863-14868.
- gos, A.M., Bevan, M.J., 2006. Central tolerance: good but imperfect. Immunol. Gall Rev. 209, 290-29

- Rev. 209, 290–296.
 Gotter, J., Brors, B., Hergenhahn, M., Kyewski, B., 2004. Medullary epithelial cells of the human thymus express a highly diverse selection of tissue-specific genes co-localized in chromosomal clusters. J. Exp. Med. 199 (2), 155–166.
 Hedge, P., Qu, R., Abernathyk, Gay, C., Dharap, S., Gaspard, R., Eaele-Hugues, J., Snes-rud, E., Lee, N., Quackenbush, J., 2000. A concise guide to cDNA microarray analysis. Biotechniques 29 (3), 548–562.
 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.
- nurse cells. Thymus 8 (6), 349–360.
 Ilmarinen, T., Kangas, H., Kytómaa, T., Eskelin, P., Saharinen, J., Seeler, J.S., Tanhuan-pää, K., Chan, F.Y., Slattery, R.M., Alakurtti, K., Palvimo, J.J., Ulmanen, I., 2008. Functional interaction of AIRE with PIAS1 in transcriptional regulation. Mol. Immunol. 45, 1847–1862.
 Isaac, A., Wilcox, K.W., Taylor, J.L., 2006. SP100B, a repressor of gene expression preferentially binds to DNA with unmethylated CpGs. J. Cell Biochem. 98 (5). 1106–1122.
 Kumar, D.G. Laloraza, M. Wang, C. Ruan, D. Davozuli, Camizoni, A. Kao, K. Sch, J. Cell Biochem. 2008.
- 1106–1122. Kumar, P.G., Laloraya, M., Wang, C., Ruan, Q., Davoodi-Semiromi, A., Kao, K., She, J., 2001. The autoimmune regulator (Aire) is a DNA binding protein. J. Biol. Chem. 276 41357-41364
- 276, 41357-41364. Kyewski, B., Derbinski, J., Gotter, J., Klein, L., 2002. Promiscuous gene expression and central T-cell tolerance: more than meets the eye. Trends Immunol. 23, 2010 June 2010 364-371
- 364–371.
 Kyewski, B., Derbinski, J., 2004, Self-representation in the thymus: an extended view. Nat. Rev. Immunol. 4, 688–698.
 Macedo, C., Magalhäes, D.A., Tonani, M., Marques, M.C., Junta, C.M., Passos, G.A., 2008. Genes that code for T cell signaling proteins establish transcriptional regulatory networks during thymus ontogeny. Mol. Cell Biochem. 318, 63–71.
 Magalhäes, 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 (2–4), 81–99.
- 81-99

- in the thymus: the root of central tolerance. Clin. Dev. Immunol. 13 (2–4), 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.
 Mizuochi, 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.
 Pitkänen, J., Doucas, V., Sternsdorf, T., Nakajima, T., Aratani, S., Jensen, K., Will, H., Vahämurto, P., Ollia, J., Vihinen, M., Scott, H.S., Antonarakis, S.E., Kudoh, J., Shimizu, N., Krohn, K., Peterson, P., 2000. The autoimmune regulator protein has transcriptional transactivating properties and interacts with the common coactivator CREB-binding protein. J. Biol. Chem. 275, 16802–16809.
 Pitkänen, J., Bebane, A., Rowell, J., Murumägi, A., Ströbel, P., Möll, K., Saare, M., Heikkilä, J., Doucas, V., Marx, A., Peterson, P., 2005. Cooperative activation of transcription by autoimmune regulator AIRE and CBP. Biochem. Biophys. Res. Commun. 333, 944–953.
 Ruan, Q.G., Tung, K., Eisenman, D., Setiady, Y., Eckenrode, S., Yi, B., Purohit, S., Zheng, W.P., Zhang, Y., Peltonen, L., She, J.X. 2007. The autoimmune regulator directly controls the expression of genes critical for thymic epithelial function. J. Immunol. 178, 7173–7180.
 Sousa Cardoso, R., Magalhàes, D.A.R., Baião, A.M.T., Junta, C.M., Macedo, C., Mar-

- J. Immunol. 178, 7173–7180.Sousa Cardoso, R., Magalhães, D.A.R., Baião, A.M.T., Junta, C.M., Macedo, C., Mar-ques, M.M.C., Sakamoto-Hojo, E.T., Donadi, E.A., Passos, G.A.S., 2006. Onset of promiscuous gene expression in murine fetal organ culture. Immunology 119, 2000. 2010. 369-375
- 369–375. Tikocinski, LO., Sinemus, A., Kyewski, B., 2008. The thymus medulla slowly yields its secrets. Ann. N.Y. Acad. Sci. U.S.A. 1143, 105–122. Tusher, V.G., Tibshirani, R., Chu, G., 2001. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98 (9), S116–5121.
- 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 epithe-lium. J. Cell. Physiol. 185, 68-79.
 Wu, C.C., Huang, H.C., Juan, H.F., Chen, S.T., 2004. GeneNetwork: an interactive tool for reconstruction of genetic networks using microarray data. Bioinformatics 20 (19) 2002 (2002)
- (18), 3691-3693.