

LUIS ALBERTO PEDROZA TALERO

NOVAS FUNÇÕES DA PROTEÍNA AIRE:

- 1) SEU PAPEL NA RESPOSTA MEDIADA POR DECTINA-1 EM
FAGÓCITOS MONONUCLEARES HUMANOS**
- 2) SUA ASSOCIAÇÃO COM A QUERATINA 17, PROTEÍNA DOS
FILAMENTOS INTERMEDIARIOS**

CAMPINAS

2009

LUIS ALBERTO PEDROZA TALERO

NOVAS FUNÇÕES DA PROTEÍNA AIRE:

1) SEU PAPEL NA RESPOSTA MEDIADA POR DECTINA-1 EM

FAGÓCITOS MONONUCLEARES HUMANOS

2) SUA ASSOCIAÇÃO COM A QUERATINA 17, PROTEÍNA DOS

FILAMENTOS INTERMEDIARIOS

Tese de Doutorado apresentada ao

Curso de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente

Área de concentração em Saúde da Criança e do adolescente

Faculdade de Ciências Médica

Universidade Estadual de Campinas

Para obtenção do Título de Doutor

Orientador: Prof. Dr. Antonio Condino Neto

CAMPINAS

2009

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**
Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

T143n Talero, Luis Alberto Pedroza
Novas funções da proteína AIRE: 1) seu papel na resposta mediada por dectina-1 em fagócitos mononucleares humanos. 2) sua associação com a queratina 17, proteína dos filamentos intermediários / Luis Alberto Pedroza Talero. Campinas, SP : [s.n.], 2009.

Orientador : Antonio Condino Neto
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Proteína AIRE. 2. APECED, proteína humana. 3. Dectin-1. 4. NF-kB. 5. Candidíase. 6. Imunidade natural. 7. Queratina-17. 8. Filamentos intermediários. I. Condino Neto, Antonio. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : New roles of AIRE protein: 1) AIRE role in Dectin-1 mediated pathway in human mononuclear phagocytes and 2) AIRE association with keratin-17,a component of intermediate filaments

Keywords:

- AIRE protein
- APECED protein, human
- Dectin-1
- NF-kB
- Candidiasis
- Immunity, Natural
- Keratin-17
- Intermediate filaments

Titulação: Doutor em Saúde da Criança e do Adolescente

Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente

Banca examinadora:

Profº. Drº. Antonio Condino Neto

Profª. Drª. Virginia Paes Leme Ferriani

Profª. Drª. Lilia Freire Rodrigues de Souza Li

Profª. Drª. Beatriz Tavares Costa Carvalho

Profª. Drª. Maria Heloisa de Souza Lima Blotta

Data da defesa: 31-07-2009

BANCA EXAMINADORA

Banca Examinadora da Tese de Doutorado

Orientador:

Antônio Condino Neto

Prof. Dr. Antonio Condino Neto

Membros:

Supernumerária
1. Profa. Dra. Virginia Paes Leme Ferriani

Prof. Dra. Lilia Freire Rodrigues de Souza Li
2. Profa. Dra. Lilia Freire Rodrigues de Souza Li

Prof. Dra. Beatriz Tavares Costa Carvalho
3. Profa. Dra. Beatriz Tavares Costa Carvalho

M. Blotta
2. Profa. Dra. Maria Heloisa de Souza Lima Blotta

Curso de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: Julho/2009

DEDICATÓRIA

***A todos los bravos hombres y mujeres del Glorioso Ejército Colombiano
que contribuyen con su vida para la paz y cuyos nombres solamente Dios
conoce***

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Antonio Condino pela oportunidade e orientação recebida.

Ao Dr. Jordan Orange pelo voto de confiança e apoio na Philadelphia.

Ao pessoal do laboratório de Biologia Molecular do CIPED .

Ao pessoal do “*the Orange lab*” do Children’s Hospital of Philadelphia.

Aos colegas do CIPED pela ajuda.

A Gabriela por La paciencia y El Amor.

A mis padres por la libertad y el apoyo.

A CAPES pelo apoio financeiro.

EPIGRAFE

The sea was angry that day my friends

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	xvii
RESUMO.....	xxi
ABSTRACT.....	xvi
INTRODUÇÃO.....	29
OBJETIVOS.....	61
RESULTADOS.....	65
CAPITULO 1.....	67
CAPÍTULO 2.....	93
DISCUSSÃO GERAL.....	103
CONCLUSSÃO GERAL.....	109
BIBLIOGRAFIA GERAL.....	113

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

APECED	Poliendocrinopatia associada à candidiase e distrofia do ectodermo
AID	Doença autoimune
AIRE	Auto Immune Regulator
ALPS	Síndrome Autoimune linfoproliferativa
APC	Células Apresentadoras de Antígeno
BCL-10	B-Cell /Lymphoma 10
CARD	Caspase Recruitment Domain
CD	Cluster Diferenciação
CTLA-4	Cytotoxic T Lymphocyte-Associated 4
DC	Células Dendríticas
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule 1
IDP	Imunodeficiências primárias
IL-	Interleucinas
IRAK-	Interleukin 1 Receptor-Associated Kinase
ITAM	Immunoreceptor Tyrosine-Based Activation Motif
K-	Queratinas
KO	Knock Out
LRR	Leucine Rich Region
MALT-1	Mucosa-Associated Lymphoid Tissue Lymphoma-1
MHC	Complexo maior de Histocompatibilidade

mTEC	Células do Epitélio Tímico
MyD88	Myeloid Differentiation Primary Response 88
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotido Fosfato
NF- κ B	Nuclear Factor Kappa-B
PAMPs	Padrões Moleculares Associados À Patógenos
PHD	Plant HomeoDomain
PRR	Receptores De Reconhecimento De Padrões
SAND	Sp100, AIRE-1, NucP41/75, DEAF-1
TLR	Receptores Tipo Toll
WT	Wild type

RESUMO

A Poliendocrinopatia autoimune associada a candidíase e distrofia ectodérmica (APECED) é um síndrome caracterizado pela presença de pelo menos dois sintomas clínicos, endocrinopatia autoimune, sendo que as mais comuns são hipoparatiroidismo, doença de Addison, além de candidíase mucocutânea crônica. É também comum nos pacientes o desenvolvimento de distrofia ectodérmica, como distrofia nas unhas ou alopecia. O APECED é produzido por mutações no gene *AIRE*, que codifica uma proteína com propriedades reguladoras na transcrição de proteínas ectópicas no timo, o que estaria envolvido na seleção negativa de células T auto-reativas, e conseqüentemente no desenvolvimento da doença autoimune. No entanto a associação da deficiência da proteína AIRE com a suscetibilidade a candidíase ou a distrofia ectodérmica permanecem obscuras. No presente trabalho, investigamos a possibilidade que esta associação esteja envolvida com a expressão e função da proteína AIRE no ambiente extra-tímico. Usando células de sangue periférico de pacientes com mutações no *AIRE*, e a técnica de SiRNA para silenciar este gene em células de linhagem mielomonocítica THP-1, demonstramos que a proteína AIRE é importante para a resposta via NF- κ B dos TLRs e Dectina-1, sendo que AIRE está presente num complexo com Dectina-1, Syk e Card-9, formado após o estímulo com Curdlan. Além disso demonstramos que a formação deste complexo pode acontecer no citoplasma ou membrana citoplasmática, uma vez que após este estímulo, a proteína AIRE é exportada do núcleo permanecendo temporariamente na membrana. Finalmente usando a técnica de espectroscopia de massa e microscopia

confocal, mostramos que AIRE interage com a proteína Queratina 17, tanto em células THP-1 como em células HaCaT (linhagem de queratinócitos), quando as células entram num estágio de espraiamento e migração. Assim, a presença da proteína AIRE na via de sinalização da Dectina-1, pode estar relacionada com a susceptibilidade a infecções crônicas por *C. albicans* observada nestes pacientes. A resposta imune via Dectina-1 é importante na resposta a este fungo e defeitos na molécula CARD9 e Dectina-1 podem estar associados a Candidíase mucocutânea crônica. Por outro lado, a descrição da associação de AIRE com K17 pode ser relevante, já que pacientes com mutações no gene que codifica para a proteína K17 desenvolvem uma doença chamada paquioníquia congênita, caracterizada por distrofia das unhas e alopecia, características clínicas observadas também nos pacientes com APECED.

Deste modo, neste trabalho apresentamos evidências que apontam para um novo papel funcional da proteína AIRE no ambiente extratímico, que poderia explicar em parte algumas características clínicas dos pacientes com APECED, como a elevada suscetibilidade a infecções por *C. albicans*, e a distrofia ectodérmica.

Palavras chave: AIRE, APECED, Dectina-1, NF-kB Candidíase, Imunidade inata, Queratina 17, Filamentos intermediários.

ABSTRACT

The autoimmune polyendocrinopathy candidiasis and ectodermal dystrophy (APECED) is characterized by the presence of two from three major clinical symptoms: Addison's disease, and/or hypoparathyroidism, and/or chronic mucocutaneous candidiasis. These patients develop also ectodermal dystrophies like nail dystrophy and alopecia. APECED is caused by mutations in the autoimmune regulator gene (AIRE). This gene encodes a protein with DNA binding capacity that can transcriptionally modulate ectopic peripheral tissue antigen (PTA) expression in the thymus, facilitating T cell negative selection. Defects in AIRE may be related with the development of multiple-endocrine failure of autoimmune origin in patients with APECED. In spite of this, the role of AIRE deficiency in the *C. albicans* susceptibility or ectodermal dystrophy, common features in APECED patients, remains to be elucidated. In the present work we explored the hypothesis that candidiasis and ectodermal dystrophy are associated with the extra-thymic role of AIRE. For this we used peripheral blood mononuclear cells from APECED patients, and also THP-1 cells treated with SiRNA for AIRE gene to obtain AIRE deficient cells. We demonstrated that AIRE is required for Dectin-1- and TLR-ligand-induced inflammatory response and complexes with Dectin-1, Syk, and CARD9 after Curdlan stimulation. In addition, we showed that this complex formation takes place outside the nucleus, once that after Curdlan stimulation AIRE seems to be exported to the cytoplasm and transiently locate at the cytoplasmic membrane. Finally using mass spectra and confocal microscopy, we showed an

interaction between AIRE and the intermediate filament protein Keratin-17, in both THP-1 cells and the keratinocyte cell line HaCaT.

Therefore, the presence of AIRE protein in Dectin-1 pathway seems to be important on the *C. albicans* response, and the absence of this protein could be a risk factor important for developing candidiasis, commonly observed in APECED patients. This observation is supported by the fact that Dectin-1 is important for *C. albicans* response, and also the recently description of mutations in Dectin-1 and CARD9 and its association with chronic mucocutaneous candidiasis. On the other hand, the description of AIRE and K17 association is important, since patients with defects on K17 gene develop congenital pachyonychia, a disease characterized by nail dystrophy and alopecia, also observed in APECED patients.

Thus we provided evidence for a new role of AIRE protein in the extrathymic environment, which in may explain, at least in part, some of the common clinical features other than autoimmunity, observed in APECED patients.

Key words: AIRE, APECED, Dectin-1, NF- κ B Candidiasis, Innate Immunity, Keratin-17, Intermediate Filaments.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO PARTE 1:
PAPEL DE AIRE NA RESPOSTA MEDIADA POR DECTINA-1 EM
FAGÓCITOS MONONUCLEARES HUMANOS

Resposta Imune.

O sistema imune humano é uma complexa rede, que envolve diferentes tipos de células efectoras e de suporte. A primeira linha de defesa aos microorganismos, a imunidade inata, é composta por mecanismos tanto celulares como físicos e bioquímicos. Os principais são o epitélio, as substâncias microbidas produzidas nas superfícies epiteliais, células fagocíticas como os macrófagos e neutrófilos, células natural killer (NK), citocinas, e proteínas que compõem o sistema do complemento. Estes mecanismos da imunidade inata atuam sobre estruturas específicas encontradas freqüentemente em grupos de micróbios patogênicos, mas que não são encontradas normalmente dentro do corpo.

Além da imunidade inata, existe outro tipo de resposta que é estimulada pela exposição a agentes infecciosos e que pode incrementar em magnitude a capacidade defensiva do sistema imune. Esta resposta é altamente específica para cada um dos antígenos encontrados nos microorganismos. Uma vez que esta resposta imune se “adapta” a cada tipo de infecção, é conhecida como resposta imune adaptativa. As principais características da resposta imune adaptativa é a alta especificidade a distintas moléculas, a capacidade de responder independentemente a moléculas

semelhantes, mas não iguais, e a habilidade de “lembrar” e responder de forma mais rápida e com maior intensidade a subseqüentes exposições ao mesmo micróbio ou antígeno (Abbas 2003).

Ativação do sistema imune

A ativação do sistema imune adaptativo necessita de um sinal das células apresentadoras de antígeno (APC), compostas principalmente por monócitos, macrófagos, células dendríticas e células B. Estas células são ativadas principalmente por dois tipos de sinais: (i) padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs), que são principalmente produto da fisiologia normal dos microorganismos e são reconhecidos pelos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), presentes nas APC ou (ii) “sinais de perigo” endógenos provenientes de células ou tecidos em morte celular, com alterações na fisiologia celular ou infectados por vírus ou microorganismos intracelulares. Após as APCs reconhecem estes sinais, entram numa etapa de diferenciação e ativação com diminuição do funcionamento da maquinaria fagocítica, e aumento da expressão de moléculas co-estimuladoras como CD40, CD58, CD80 e CD86. Durante este processo de diferenciação, as células mudam sua morfologia, de células altamente adesivas nos tecidos periféricos, para células com alta mobilidade, deixando o tecido inflamado ou infectado e migrando para os órgãos linfóides onde são encontradas as células T (Abbas 2003).

Cada indivíduo possui uma grande quantidade de células T, cada uma delas capaz de reconhecer e responder a um único antígeno. Após o reconhecimento a célula T é ativada e diferenciada, entrando num processo de divisão conhecido como expansão clonal, que produz clones com atividade efetora e de memória. As células T de memória estão encarregadas de responder de forma rápida e efetiva as subseqüentes exposições aos antígenos. Estas células podem entrar num estado de “repouso” e permanecer no sistema durante muitos anos, mesmo após o antígeno ter sido eliminado. As células efetoras têm o papel de eliminar o antígeno. Podem ser células T auxiliares, que tem a capacidade de ativar outras células, como os linfócitos B ou macrófagos, ou células T citotóxicas, que tem a capacidade de destruir células tumorogênicas ou infectadas por vírus (Abbas 2003).

Receptores tipo Toll.

Durante os processos infecciosos alguns mecanismos da imunidade inata são induzidos principalmente mediante o reconhecimento de estruturas não variantes compartilhadas por uma grande quantidade de microorganismos patogênicos, os PAMPs. Estas estruturas, por sua vez, são reconhecidas pelos PRR como os receptores tipo Toll (TLR). Os TLR são uma família de receptores celulares conservados, que medeiam a resposta imune das células fagocitárias frente às PAMPs e de ligantes presentes no próprio organismo. Tais receptores foram inicialmente caracterizados na *Drosophila melanogaster* como importantes proteínas para formação dorsoventral destes embriões e

mediadores da resposta imune inata frente à fungos nas moscas adultas (Lemaitre, Nicolas et al. 1996).

Após o descobrimento da importância destes receptores na resposta imune da *Drosophila*, Medzhitov e colaboradores em 1997, descreveram a presença do homólogo do receptor tipo Toll em células humanas (agora conhecido como TLR4). A transfecção de TLR4 em linhagens celulares humanas mostrou a ativação do NF- κ B e a subsequente expressão dos genes controlados por este fator de transcrição (Roeder, Kirschning et al. 2004). Depois desta descoberta, já foram descritos a existência de 11 TLRs, os quais reconhecem uma grande variedade de PAMPs (Kawai and Akira 2008). Os TLRs mais estudados são os TLR2, TLR5, TLR6 e TLR9, onde cada um reconhece PAMPs específicos. Sendo assim, o TLR2 (que forma heterodímeros com o TLR1 e TLR6) pode reconhecer o ácido lipoteicoico, o ácido lipoarabinomanano, lipoproteínas, peptidoglicanos, glicanos e fosfolipoglicanos das bactérias gram positivas e leveduras (Jouault, Ibata-Ombetta et al. 2003; Netea, Van der Graaf et al. 2004; Kawai and Akira 2008); o TLR3 reconhece RNA de fita dupla, o TLR4 pode reconhecer o lipopolissacarídeo de bactérias gram negativas; o TLR5 a flagelina derivada de bactérias flageladas e o TLR9 seqüências de CpG bacteriano (Hayashi, Smith et al. 2001; Kawai and Akira 2008). Além disso, outros TLRs menos estudados reconhecem fármacos sintéticos como os análogos da guanosina, reconhecidos pelos TLR7 e TLR8, este último reconhece também arranjos de RNA bacteriano.

Os TRLs são proteínas transmembrana tipo 1 compostas por um domínio extracelular rico em repetições de leucina (LRR) e um domínio citoplasmático com forte homologia aos domínios presentes no receptor de IL-1, conhecido como domínio Toll/IL-1R (TIR). O domínio LRR é composto por diferentes números de repetições de 24 a 29 aminoácidos de longitude, e cada repetição contém seqüências xxLxLxx , onde x representa qualquer aminoácido e L uma leucina (Medzhitov, Preston-Hurlburt et al. 1997). Quando os TRLs são estimulados, uma proteína adaptadora, que também possui um domínio TIR, se liga ao domínio equivalente no TLR.

A principal proteína adaptadora é MyD88, que se une ao domínio TIR de todos os TLRs, menos do TLR3 (Medzhitov, Preston-Hurlburt et al. 1998). Esta proteína tem um domínio de morte homólogo aos encontrados nos receptores da família TNF. Uma segunda proteína que se une ao complexo de sinalização chama-se quinase associada ao receptor IL-1 (IRAK) e também possui um domínio de morte que medeia à interação com o domínio de MyD88 (Wesche, Henzel et al. 1997). Quando o IRAK se une ao complexo de sinalização é autofosforilado, se dissocia do MyD88 e ativa um fator chamado TRAF6 (fator associado ao receptor de TNF). O TRAF6 ativa a cascada das quinases I κ B e finalmente induz a ativação do NF- κ B (An, Yu et al. 2002). Existe também outra via de sinalização que não depende do MyD88, que leva a ativação do gene do IFN γ e outros genes que dependem do fator de regulação de IFN tipo 3 (IRF-3) (Doyle, Vaidya et al. 2002). Também foram descritas outras moléculas adaptadoras como TRIF (única molécula

adaptadora conhecida do TLR3), TICAM – 1 e TIRAP, que podem ser unidas ao complexo de sinalização quando os TRLs são estimulados, no entanto a função e o mecanismo de sinalização destas moléculas foram pouco estudados até a hoje.

Adicionalmente à especificidade dada pela existência de diferentes proteínas adaptadoras, a formação de complexos entre as diferentes TRLs gera um aumento da especificidade com a que se pode reconhecer um determinado PAMP. Por exemplo, os complexos TLR1/TLR2 reconhecem lipoproteínas acetiladas bacterianas (Wyllie, Kiss-Toth et al. 2000) e o complexo TRL2/TRL6 reconhece lipopetídeos diacetilados do micoplasma (Takeuchi, Kawai et al. 2001).

Os genes que se expressam em resposta aos TRLs codificam uma grande variedade de proteínas importantes durante a resposta imune. Incluem citocinas como TNF-alfa, IL-1beta, IL-10 e IL-12, responsáveis por orientar a resposta imune ao padrão tipo Th1 ou Th2, proteínas necessárias durante a ativação do sistema fagocitário e proteínas envolvidas nos mecanismos microbicidas, como a produção de espécies reativas do oxigênio (An, Yu et al. 2002; Ryan, Smith et al. 2004; Kawai and Akira 2008). Estudos *in vitro* demonstraram que o estímulo das células dendríticas humanas com agonistas específicos para cada um dos TRLs pode induzir a síntese de citocinas. Assim a estimulação de TRL4, TRL5, TRL9 com LPS, flagelina e CpG-DNA respectivamente, induz uma elevada produção da proteína pró-inflamatória IL-12, enquanto que o estímulo de TRL2 com um agonista sintético e específico

como o peptídeo Pam3Cys induz uma elevada produção de IL-10 mas não de IL-12 (Agrawal, Agrawal et al. 2003). Além desta produção específica, cada um destes estímulos pode induzir diferentes padrões de ativação de MAPquinasas: o estímulo de TRL-2 induz uma elevada ativação de ERK e, conseqüentemente, uma estabilização do fator de transcrição C-fos, enquanto que o estímulo com os TRL4 e TRL5, induz uma alta atividade de P38 e JNK (Agrawal, Agrawal et al. 2003).

Dectina-1 (*Dendritic cell associated C-type Lectin-1*)

A Dectina-1 é uma proteína transmembrana tipo II, possui um domínio extracelular lectina tipo C ligado por uma região transmembrana a uma cauda citoplasmática que contém um motivo tipo ITAM (Tsoni and Brown 2008). A Dectina-1 apresenta duas isoformas principais, a 1A e a 1B, podendo ser glicosilada ou não glicosilada. Também podem estar presentes na região extracelular resíduos de cisteína que podem influenciar a expressão e função do receptor na superfície celular e a formação de dímeros (Xie, Sun et al. 2006; Tsoni and Brown 2008). A Dectina-1 é expressa principalmente por células mielóides, como monócitos, macrófagos e células dendríticas, assim como em granulócitos e células T e B (Taylor, Brown et al. 2002).

A Dectina-1 reconhece partículas solúveis de Beta-glucan provenientes de fungos e bactérias e é considerado o principal receptor destes carboidratos nos leucócitos (Tsoni and Brown 2008). Além do Beta-glucan, a Dectina-1 pode reconhecer outros ligantes presentes nas micobactérias

(Rothfuchs, Bafica et al. 2007) e a moléculas das células T (Ariizumi, Shen et al. 2000), no entanto a estrutura e relevância destes compostos na resposta imune ainda são desconhecidas.

A partir de experimentos realizados com partículas solúveis de Beta-glucan purificadas como o Curdlan, foi demonstrado que o estímulo específico da Dectina-1 em células fagocíticas ativa o burst oxidativo, liberação de ácido araquidônico, indução de várias citocinas e quimioquinas como $TNF\alpha$, CXCL2, IL-23, IL-6, IL-10, IL-2 e IL-12 (Brown, Herre et al. 2003; Tsoni and Brown 2008).

A habilidade do Beta-glucan em estimular estas respostas parece ser célula-dependente. Em macrófagos, e possivelmente na microglia, as partículas de Beta-glucan não conseguem estimular a liberação de $TNF\alpha$ sem a co-estimulação via TLRs. No entanto, em DC, o estímulo único via Dectina-1 é suficiente para a produção desta citocina (LeibundGut-Landmann, Gross et al. 2007; Shah, Huang et al. 2008). Embora o mecanismo molecular desta diferença não tenha sido estudado, acredita-se que a atividade de outras citocinas, como o GM-CSF, seja importante (LeibundGut-Landmann, Gross et al. 2007; Harada and Ohno 2008).

Sinalização Via Dectina-1

A porção citoplasmática da Dectina-1 possui um motivo tipo ITAM, similar a sequência em tandem encontrada em outros imuno-receptores, como o receptor Fc (LeibundGut-Landmann, Gross et al. 2007; Tsoni and Brown

2008). Similar ao que acontece nos receptores com dois motivos ITAM, estes domínios são fosforilados nas tirosinas pelas quinases SRC, gerando um sítio de ligação para os domínios SH2 da proteína Syk, proteína com atividade quinase que subsequenteiramente inicia os eventos de sinalização (Tsoni and Brown 2008). Existem diversas hipóteses para tentar explicar o fato de que a sinalização da Dectina-1 acontece com um único motivo ITAM fosforilado, mas necessita de dois domínios SH2 do Syk. Entre elas, a de que a Dectina-1 precisa formar um dímero para ligar uma molécula de Syk (duas moléculas de Dectina-1 para uma de Syk) e a de que haja necessidade de uma terceira molécula adaptadora para servir de ponte entre Dectina-1 e Syk (Tsoni and Brown 2008). No entanto nenhuma destas teorias foi investigada em detalhes. A sinalização da Dectina-1 via Syk envolve a ativação da proteína adaptadora Card9, que forma um complexo com as proteínas BCL-10 e Malt-1, essencial para a ativação da via canônica do NF-kB (Gross, Gewies et al. 2006; LeibundGut-Landmann, Gross et al. 2007). Adicionalmente a ativação via Syk pode estimular a via das MAPquinasas e o fator transcricional NFAT (Goodridge, Simmons et al. 2007). Finalmente, uma via independente de Syk foi recentemente descrita. Após o estímulo da Dectina-1, a quinase RAF-1 é fosforilada levando também a ativação da via Canônica do NF-kB (Gringhuis, den Dunnen et al. 2009).

Tolerância imune

As doenças auto-imunes são causadas por falhas na tolerância imune (a não resposta a um determinado antígeno). Esta tolerância é mantida por mecanismos de seleção que prevêm a maturação de linfócitos que reconhecem antígenos próprios ou por mecanismos que inativam ou deletam linfócitos autoreativos que já foram maturados (Abbas 2003). Todos os indivíduos podem apresentar linfócitos autoreativos, no entanto, só uma pequena fração desenvolve doenças autoimunes como resultado de um ataque constante contra os órgãos alvo. O desenvolvimento da resposta autoimune é mediado pelo repertório de células T e B. Este repertório é controlado por mecanismos de tolerância central, assim como pelo controle de linfócitos autoreativos por mecanismos de tolerância periférica (Abbas 2003).

Mecanismos de tolerância central

A tolerância central é induzida pela seleção negativa das células que podem reconhecer estruturas próprias. Esta seleção negativa acontece principalmente no timo, o mesmo órgão onde ocorre o desenvolvimento das células T.

Acredita-se que a deleção dos linfócitos aconteça na medula tímica, onde se encontram as células T em diferentes etapas de maturação. Células T com alta afinidade aos autoantígenos são deletadas quando entram em contato com APC que podem ser células hematopoiéticas ou mTEC. A co-estimulação gerada pelas moléculas CD80/86 nas APC e CD28 nas células T

induz apoptose, embora uma interação similar na periferia promova a diferenciação das células T em células efectoras (Abbas 2003).

Uma característica particular das mTEC envolvidas na seleção negativa é a expressão promíscua de antígenos próprios encontrados normalmente em tecidos periféricos. Esta expressão ectópica dos autoantígenos é a responsável pela deleção das células T reativas à cada um destes autoantígenos (Tykocinski, Sinemus et al. 2008).

Mecanismos de tolerância periférica

Embora a maioria das células T autoreativas sejam deletadas no timo, algumas podem estar presentes na periferia. Uma possibilidade para a existência destas células T autoreativas na periferia pode ser o mimetismo molecular entre antígenos externos e aqueles encontrados naturalmente no corpo. Neste caso, a resposta imune ao antígeno externo é induzida normalmente pelas células e, ao mesmo tempo, as células efectoras atacam os autoantígenos que guardam similaridade com o antígeno externo, desencadeando a resposta imune auto-reativa (Abbas 2003; Blank, Barzilai et al. 2007).

Os mecanismos de tolerância periférica podem ser intrínsecos às células T, onde é gerado um estado de anergia ou extrínsecos onde ocorre participação de outras células, como DC ou Treg (Abbas 2003).

A limitação na ativação das células T nos órgãos linfóides é um mecanismo eficiente de regulação. Quando um estímulo antigênico acontece

fora destes órgãos, sem a presença de co-estimulação, é possível induzir o estado de anergia ou apoptose (Abbas 2003).

Doenças do sistema Imune

Como descrito anteriormente, o sistema imune é importante na resposta à agentes infecciosos, pois é capaz de diferenciar os antígenos próprios daqueles existentes nos microorganismos, mantendo o corpo livre de infecções, evitando a proliferação de células tumorogênicas e não reagindo contra as células e tecidos normais, gerando assim um equilíbrio na resposta imune.

No entanto, este equilíbrio pode ser prejudicado por deficiências do sistema imune, geradas tanto por fatores internos (mutações em genes envolvidos na resposta imune), como por fatores externos (secundárias à infecções, doenças ou contato com outros agentes externos). Algumas deficiências, conhecidas como doenças auto-imunes, podem levar ao reconhecimento e desenvolvimento de uma resposta imunológica a proteínas normalmente encontradas no corpo, culminando na destruição de tecidos próprios. Em outras deficiências ocorre o oposto, ou seja, o corpo não é capaz de reconhecer antígenos externos e conseqüentemente falha na geração da resposta imune necessária para eliminar a infecção. Neste caso as doenças são conhecidas como imunodeficiências primárias ou secundárias.

Doenças autoimunes

A definição clássica de doença autoimune (AID) inclui pelo menos quatro critérios: (i) a existência de autoanticorpos ou autoimunidade mediada por células, (ii) a identificação do antígeno, (iii) a indução da doença num modelo animal e (iv) a transferência da doença a indivíduos sadios após a transferência de células T ou B autoreativas. As AID são consideradas clinicamente importantes, sendo que pelo menos 70 diferentes doenças foram descritas e aproximadamente 5% da população é afetada por este tipo de doenças (Abbas 2003).

Genética das doenças autoimunes

A etiologia das AID pode ser considerada multifatorial, pois envolve um *background* genético e fatores ambientais. Como descrito anteriormente, a autoimunidade pode ser controlada em diferentes estágios da resposta imune e conseqüentemente, espera-se que mutações em diversos genes sejam responsáveis pelo desenvolvimento da AID. A Suscetibilidade genética a AID é considerada como um processo epistático, por conseguinte, é esperado que as interações entre vários genes ou diferentes alelos contribuam com a doença, levando a AID não específica. Um exemplo é a AID produzida por defeitos no gene da IL-2 ou do CTLA-4, que podem predispor a diferentes tipos da doença. De outro lado, alguns genes podem modificar o reconhecimento ou a apresentação dos antígenos. Os genes do complexo maior de histocompatibilidade classe II (MHC-classII), são mediadores importantes da

autoimunidade neste nível. A região do MHC contém aproximadamente 200 genes, sendo que 40 deles codificam para antígenos leucocitários. Esta região tem sido associada a diferentes AIDs, como Artrite, esclerose múltipla, diabetes tipo I, lúpus eritematoso sistêmico, hepatite, assim como doenças não autoimunes como malária ou diferentes infecções (Abbas 2003).

AIDs monogênicas.

Algumas AIDs são monogênicas e incluem a poliendocrinopatia associada à candidíase e distrofia da ectoderme (APECED), a síndrome autoimune linfoproliferativa (ALPS) e a poliendocrinopatia por desregulação e enteropatia ligada ao X (IPEX). Nestas doenças, a função defeituosa de um único gene causa a destruição autoimune de tecidos.

A ALPS é uma doença autossômica dominante. O fenótipo inclui linfocitose de CD4/CD8, linfadenopatia não maligna, esplenomegalia, hipergamaglobulinemia, e manifestações autoimunes como anemia hemolítica autoimune, trombocitopenia púrpura e neutropenia autoimune. Existem quatro diferentes tipos de ALPS: ALPS associado a mutações no gene TNFRFS6, ALPS tipo 1b, ALPS associado a mutações no gene FasL, ALPS tipo II e ALPS associado a mutações no gene para a caspase 10. Todos estes tipos estão associados a defeitos na apoptose. Para o tipo III não foi descrita mutação associada (Worth, Thrasher et al. 2006).

O IPEX é uma síndrome ligada ao cromossomo X, causada por mutações no gene Foxp3. Caracteriza-se por doenças auto-imunes de início

precoce, envolvendo pâncreas, tireóide, intestino com diarreia secretora severa, eczema e anemia, possivelmente mediado por defeitos nas células T reguladoras que são importantes na tolerância periférica (van der Vliet and Nieuwenhuis 2007).

APECED

APECED é uma doença autossômica recessiva, associada a mutações no gene AIRE (Autoimmune Regulator). A clínica do APECED tem sido amplamente estudada, sendo que usualmente o primeiro sintoma é a candidíase mucocutânea crônica, seguida de manifestações de desordens endócrinas, como o hipoparatoriodismo autoimune, e falha adrenocortical (Husebye, Perheentupa et al. 2009). No entanto, estes pacientes podem desenvolver uma grande quantidade de outras manifestações autoimunes como hipotireoidismo, diabetes tipo 1, hepatite autoimune, síndrome de mal absorção e falha nos ovários (Husebye, Perheentupa et al. 2009). Uma terceira característica é a distrofia da ectoderme, principalmente hipoplasia do esmalte dentário, alopecia e distrofia ungueal (Collins, Dominguez et al. 2006).

Proteína AIRE

O gene AIRE codifica uma proteína de 545 aminoácidos, com peso molecular de 57,5 kD. Esta proteína possui múltiplos domínios encontrados em outros fatores de transcrição e também domínios envolvidos na interação

proteína-proteína (Consortium 1997; Bjorses, Halonen et al. 2000; Kumar, Laloraya et al. 2001).

Domínio SAND (pelas siglas do inglês Sp100, AIRE-1, NucP41/P75 é DEAF-1) . É encontrado em diversos modificadores transcricionais associados à cromatina, como Sp100, NucP41/P75, GMEB-1 e 2, a proteína DEAF-1. A capacidade de ligação do domínio SAND ao DNA está associada ao motivo conservado KDWK. Estudos com a proteína AIRE, ainda não conseguiram demonstrar, de maneira convincentemente, esta atividade. Esta dificuldade pode ser explicada pelo fato de que esta proteína não possui a sequência canônica KDWK, e assim, não há uma sequência alvo para este domínio, ou pela não reprodutibilidade dos experimentos (Gibson, Ramu et al. 1998; Mathis and Benoist 2009). No entanto, acredita-se que a especificidade de ligação do domínio SAND ao DNA muda conforme a proteína, com baixa influência dos peptídeos que flanqueiam esta sequência ou ainda leves mudanças em algum dos 4 aminoácidos (KDWK). Por exemplo: o Sp100 reconhece repetições não metiladas de CpG e o GMEB liga-se a sequências PuCGPy. Assim, é possível que o domínio SAND na proteína AIRE não se ligue a uma sequência consenso restrita de DNA, mas sim a uma forma não específica (Bottomley, Collard et al. 2001; Mathis and Benoist 2009).

Domínio PHD (PInat HomeoDomain)

A proteína AIRE possui dois domínios PHD, que são parte da família de proteínas com motivos de dedos de zinco e estão relacionadas estruturalmente

com os domínios RING com atividade E3 ubiquitin-ligase. De forma geral, os domínios PHD são considerados importantes na interação proteína-proteína (Bienz 2006). Acredita-se que as proteínas que possuem domínios PHD são restritas ao núcleo e incluem co-ativadores transcripcionais e elementos moduladores da cromatina (Bienz 2006). É interessante que várias mutações no gene AIRE afetam a estrutura do primeiro domínio PHD, levando a idéia geral de que estes domínios são críticos para atividade da proteína AIRE, embora a atividade específica para este domínio não tenha sido descrita (Mathis and Benoist 2009).

Domínio LXXLL.

A proteína AIRE possui quatro domínios LXXLL, comumente encontrado em vários co-ativadores transcripcionais, como o CREB binding protein (CBP), e proteínas da família STAT. Este domínio tem sido estudado em proteínas nucleares e é importante na interação proteína-proteína. A atividade específica deste domínio na proteína AIRE não tem sido descrita (Kumar, Laloraya et al. 2001; Mathis and Benoist 2009).

Domínio CARD (Caspase Recruitment Domain).

Um domínio CARD foi descrito na extremidade N terminal da proteína AIRE, onde também estão presentes uma grande quantidade de mutações (Ferguson, Alexander et al. 2008). O domínio CARD está envolvido com a ativação de várias caspases importantes na ativação do processo apoptótico,

assim como em proteínas envolvidas em vários processos inflamatórios, onde pode mediar a homo ou hetero-multimerização a através de interações homotípicas. Assim como para o domínio LXXLL, a atividade específica desse domínio na proteína AIRE ainda não foi estudada (Mathis and Benoist 2009).

Papel do AIRE no Timo.

Baseado em estudos em camundongos, acredita-se que AIRE é importante para a expressão ectópica ou na apresentação de antígenos normalmente encontrados na periferia. Assim, estudos de expressão (usando a técnica de micro-arranjos) dos genes que codificam estes antígenos periféricos em mTEC de camundongos KO para AIRE e WT mostraram que a expressão de uma grande quantidade de genes é dependente do AIRE, embora alguns genes como a proteína C reativa e o GAD67 são expressos normalmente (Mathis and Benoist 2009). Outro possível mecanismo está no fato de que as células do epitélio tímico deficientes para AIRE parecem ser menos suscetíveis a apoptose, levando a possibilidade de que alguns antígenos processados por DC após apoptose das células do epitélio tímico não são corretamente apresentados às células T (Gray, Abramson et al. 2007). Também tem sido descrito o envolvimento de AIRE na diferenciação das células do epitélio tímico, levando a hipótese que na sua ausência, estas células não chegam ao estado de diferenciação necessário para expressar os antígenos periféricos (Gillard, Dooley et al. 2007). No entanto, não existe um consenso sobre a

relevância destes defeitos nas células do timo para o mecanismo molecular do APECED.

Papel do AIRE na periferia.

Apesar de ser expresso principalmente no timo, tanto a proteína como o RNA de AIRE, foram observados em monócitos e DC, com níveis de expressão pelo menos 10 vezes menores que no timo (Kogawa, Nagafuchi et al. 2002). Neste caso, os modelos murinos não demonstraram diferenças importantes no funcionamento celular ao comparar camundongos deficientes em AIRE com os WT (Mathis and Benoist 2009). Estudos com DC derivadas de monócitos de pacientes com APECED após estimulação por antígenos derivados de *C. albican*, demonstraram que as DC deficientes em AIRE apresentam defeitos na fagocitose, diminuição na liberação de citocinas e alteração nos padrões de fosforilação de proteínas (Brannstrom, Hassler et al. 2006, Pontynen, Strengell et al. 2008; Ryan, Hong et al. 2008; Hong, Ryan et al. 2009) .

Finalmente, um modelo *in vitro* de pele mostrou que este tecido tem a capacidade de diferenciar células T num ambiente extra tímico dependente da expressão de AIRE nos fibroblastos (Clark, Yamanaka et al. 2005). No entanto, a relevância deste achado, precisa ser confirmada, pois este modelo não foi reproduzido *in vivo*.

Imunodeficiências primárias.

O sistema imune é necessário para nos proteger contra as agressões causadas pelos agentes infecciosos, como bactérias, vírus e leveduras. Desta forma, pode-se esperar que qualquer defeito neste sistema afete a resposta contra esses agressores externos, culminando em maior susceptibilidade às infecções causadas pelos diferentes organismos patogênicos e oportunistas. Essas alterações do sistema imune são classificadas em dois grandes grupos: as imunodeficiências primárias e as imunodeficiências secundárias. As primárias são causadas por defeitos genéticos e resultam numa alta susceptibilidade às infecções. Frequentemente manifesta na infância e afeta um a cada 10.000 nascidos. As secundárias se desenvolvem como consequência às complicações de outras doenças como a desnutrição, câncer, terapias imunossupressoras ou pela infecção do vírus da imunodeficiência humana HIV. Normalmente este tipo de imunodeficiência pode ser curado uma vez que a doença de base seja tratada.

O tipo e gravidade das infecções dos pacientes com defeitos no sistema imune dependem principalmente da molécula afetada. Por exemplo, os indivíduos com mutações em algum gene em particular, podem ser totalmente assintomáticos, enquanto em outros genes pode afetar de uma forma importante a resposta imune, fazendo com que estes indivíduos sejam mais susceptíveis às infecções graves na infância. Assim, os indivíduos com mutações no gene para a quimiocina CCR5 não desenvolvem infecções e apresentam resistência imune ao vírus HIV-1 (Ioannidis, Contopoulos-Ioannidis

et al. 2003). Por outro lado, os pacientes com mutações no gene para a cadeia gama comum (receptor compartilhado por diferentes citocinas) apresentam uma síndrome caracterizada por número baixo de células NK, e de linfócitos T, porém apresentam uma contagem normal dos linfócitos B. Geralmente, estes pacientes morrem por infecções graves precocemente na infância (Fischer 2004).

A classificação das IDP mais utilizada refere-se ao estado afetado por um defeito específico. Por exemplo, podemos encontrar defeitos na maturação dos linfócitos T, onde estes pacientes geralmente apresentam distúrbios que afetam as células T e conseqüentemente os linfócitos B. Este distúrbio se traduz em defeitos da imunidade humoral e celular, sendo então diagnosticada de imunodeficiências severas combinadas, uma doença muitas vezes mortal durante os primeiros meses de vida (Fischer 2004). Outros tipos de imunodeficiências primárias incluem as que afetam somente um tipo de linfócito, como por exemplo, os pacientes com agamaglobulinemia ligada ao cromossomo X. Estes pacientes apresentam baixo nível de imunoglobulinas séricas e um número reduzido de linfócitos B, causada pelos defeitos na maturação das células B (Fiorini, Franceschini et al. 2004). Um terceiro grupo de pacientes são aqueles que sofrem de defeitos na ativação celular, como por exemplo, a imunodeficiência seletiva de IgA. Esta imunodeficiência deve-se a um defeito na diferenciação das células B plasmáticas secretoras da IgA. Algumas imunodeficiências que comprometem o funcionamento das células B e T podem ocorrer em conseqüência de algumas doenças congênitas. Um

exemplo é a síndrome de Wiskott Aldrich, caracterizada por eczema, trombocitopenia e susceptibilidade às infecções bacterianas. Esta síndrome é causada por mutações na proteína WASP, uma proteína citoplasmática expressa exclusivamente nas células derivadas da medula óssea (Jin, Mazza et al. 2004). Finalmente, podemos encontrar doenças relacionadas a imunidade inata, que constitui a primeira linha de defesa frente às agressões dos microorganismos. Dois importantes componentes desta linha de defesa imune são as células fagocitárias e o sistema complemento. A deficiência em algum dos componentes da imunidade inata pode resultar em infecções recorrentes ou doenças auto-imunes (Carroll 2004).

As células fagocitárias (neutrófilos e macrófagos) são importantes para a resposta imune. Desta forma, em várias infecções, o infiltrado produzido durante as primeiras etapas está composto principalmente de neutrófilos; por isto é claro que uma correta função das células fagocitárias é importante para eliminar as infecções. Não obstante, o número de imunodeficiências primárias relacionadas com as células fagocitárias é baixo.

Um exemplo deste tipo de IDP é a doença granulomatosa crônica, caracterizada por uma deficiência na produção das espécies reativas de oxigênio por estas células. É causada por defeitos no funcionamento do sistema NADPH oxidase, envolvido na explosão respiratória nas células fagocitárias (Patino, Perez et al. 1999) (Patino, Rae et al. 1999). Estes pacientes apresentam infecções recorrentes por patógenos intracelulares e fungos. Outro exemplo de imunodeficiências primárias, é a deficiência da

adesão leucocitária caracterizada por uma expressão deficiente das integrinas β -2, causando assim defeitos nas funções dependentes da adesão leucocitária (Rosenzweig and Holland 2004). Estes pacientes também sofrem infecções recorrentes por uma grande variedade de bactérias e leveduras (Rosenzweig and Holland 2004).

INTRODUÇÃO PARTE 2.

ASSOCIAÇÃO DA PROTEÍNA AIRE COM A PROTEÍNA DOS FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS, QUERATINA 17.

Filamentos do citoesqueleto.

Existem pelo menos três tipos diferentes de filamentos, cada um com propriedades específicas, sendo que a interação entre eles fornece estrutura ao citoesqueleto celular. Eles são classificados com base no tamanho e propriedades físico-químicas, como microfilamentos, microtúbulos e filamentos intermediários (Bragulla and Homberger 2009).

Microfilamentos.

Os microfilamentos são os filamentos menores do citoesqueleto, com um diâmetro de pelo menos 7nm. Eles estão compostos de proteínas de actina ligadas a partir da energia do ADP ou GTP. Dois filamentos de actina combinam-se num filamento helicoidal. Os microfilamentos são polarizados e, conseqüentemente, apresentam características dinâmicas, sendo por um lado subunidades são acopladas e por outro, desacopladas. Assim os microfilamentos de actina servem como bandas transportadoras de outras moléculas motoras como a miosina (Bragulla and Homberger 2009).

Microtúbulos.

Os microtúbulos são os filamentos maiores do citoesqueleto com um diâmetro de pelo menos 20 nm. Eles são heterodímeros compostos de moléculas de tubulina-alfa e -beta. Estes heterodímeros são acoplados usando a energia do GTP, formando protofilamentos, os quais são combinados para formar os microtúbulos. Estes são polarizados de forma similar aos microfilamentos e igualmente servem como bandas transportadoras de outras proteínas motoras como dineína e quinesina. As redes de microtúbulos são estabilizadas dentro das células pelos microfilamentos e os filamentos intermediários (Bragulla and Homberger 2009).

Filamentos intermediários.

Os filamentos intermediários, diferentemente dos microfilamentos e microtúbulos, podem se agregar formando “pacotes” de diâmetros entre 7 e 12 nm. Eles não são polarizados e, por isso, acredita-se que os filamentos intermediários não estão envolvidos no transporte intracelular de proteínas, mas são importantes para dar suporte estrutural à célula (Bragulla and Homberger 2009) (Kim and Coulombe 2007). No entanto, recentemente foi sugerido que os filamentos de queratina são importantes para o transporte dos melanosomos da periferia celular (local da endocitose) até o centro das células (Planko, Bohse et al. 2007). Os filamentos intermediários nas células epiteliais são compostos basicamente de queratinas, já em células não epiteliais, existem vários tipos de filamentos intermediários compostos de desmina (células miogênicas), vimentina

(fibroblastos), laminina (núcleo celular) e neurofilamentos (células neuronais) (Moll, Franke et al. 1982). Além disso, em células do tecido conetivo como fibroblastos e condroblastos são produzidos filamentos intermediários extracelulares como os filamentos de colágeno (Bragulla and Homberger 2009).

A formação dos filamentos intermediários precisa de pontos organizados como os pontos de adesão focal dos microfilamentos a membrana celular. A formação e degradação dos filamentos intermediários precisam da assistência de algumas enzimas, como quinases e fosfatases, além de moléculas chaperonas como as proteínas de shock térmico (Herrmann, Bar et al. 2007).

Os filamentos intermediários são importantes componentes do sinalosomo celular, complexos protéicos essenciais no desenvolvimento celular e regulação da degradação das proteínas. No citoesqueleto, os filamentos intermediários estão unidos à membrana nuclear, próximos aos poros nucleares além de derivações ou modificações da membrana celular como os desmosomos ou hemidesmosomos (Herrmann, Bar et al. 2007).

Filamentos de queratina.

Como comentado anteriormente, os filamentos intermediários das células epiteliais são compostos de queratinas. As queratinas correspondem à aproximadamente 80% do total de proteínas numa célula diferenciada do epitélio estratificado, sendo que 25% a 30% das proteínas da epiderme são queratinas (Bragulla and Homberger 2009). As queratinas são encontradas principalmente nas células epiteliais, e são caracterizadas por propriedades físicoquímicas únicas.

Elas são resistentes a digestão pelas proteases tipo pepsina ou tripsina, são praticamente insolúveis em água e ácidos diluídos, mas são parcialmente solúveis em soluções com agentes denaturantes como a uréia. As queratinas são classificadas de acordo com a estrutura molecular, com suas características físicoquímicas e onde são produzidas (Schweizer, Bowden et al. 2006).

A classificação mais comumente utilizada divide as queratinas em tipo I (queratinas ácidas) e tipo II (queratinas Básicas), sendo que os filamentos intermediários são formados pela heterodimerização de uma queratina tipo I e uma queratina tipo II (Schweizer, Bowden et al. 2006). Até o momento foram descritos 28 genes que codificam queratinas tipo I (queratinas 9 a 28 e 31 a 40) e 22 tipo II (1 a 8 e 71 a 86) (Schweizer, Bowden et al. 2006).

As queratinas possuem diferentes atividades nas células epiteliais que asseguram sua integridades física, como fornecer suporte às células e tecidos para tolerar o estresse mecânico, manter a integridade celular, proteger frente a variações da pressão hidrostática e estabelecer a polaridade celular (Gu and Coulombe 2007). Devido ao grande número de queratinas, a maioria delas possui funções redundantes, sendo que elas podem ser montadas em diversas combinações para formar os filamentos de queratina (por exemplo, na epiderme as combinações K1/K10, K1/K9, K2/K9 ou K2/K10). Assim, algumas queratinas podem ser substituídas por outras sem perdas na função dos filamentos intermediários (Coulombe and Omary 2002). No entanto, algumas como a K5 possui uma atividade específica que não pode ser realizada por outras queratinas (Coulombe and Omary 2002).

Além de dar suporte físico a célula, as queratinas e os filamentos de queratinas estão envolvidos em outras atividades, como sinalização celular, transporte celular e diferenciação celular. Por exemplo, a K10 inibe a proliferação de células supra-basais, mas induz a sua diferenciação (Paramio, Casanova et al. 1999). Os filamentos de queratina também influenciam a resposta celular a sinais apoptóticos e a correta distribuição de proteínas de membrana durante a polarização celular. Por exemplo, nos hepatócitos as K8 e K18 se ligam a proteínas adaptadoras e interferem os sinais apoptóticos, provavelmente via ligação ao receptor de TNF α tipo II (Gu and Coulombe 2007). Os filamentos de queratina também influenciam processos metabólicos regulando a síntese de proteínas e o crescimento celular. Por exemplo, a K17 regula a síntese de proteínas e o crescimento celular no epitélio estratificado danificado, ligando proteínas adaptadoras que ainda não foram identificadas (Gu and Coulombe 2007). As queratinas também podem estar envolvidas no transporte das vesículas membranais no citoplasma de células do epitélio. Por exemplo, a distribuição de melanosomos é suprimida em células da epiderme deficientes para K5 (Planko, Bohse et al. 2007).

Queratina 17.

A K17 é uma queratina tipo I presente em precursores de células basais do epitélio complexo e marca diferenciação a células presentes nos

folículos capilares, unhas, e glândulas (Troyanovsky, Leube et al. 1992). A K17 também é expressa em outros tipos de epitélio sendo que pode usar diferentes queratinas tipo II (K5, K6 e K7) na formação dos filamentos intermediários (McGowan and Coulombe 1998). O gene da K17 pode ser induzido após a destruição do tecido (feridas) ou em estados patológicos como infecções virais, psoríase e carcinoma (McGowan and Coulombe 1998; Kim, Wong et al. 2006). Também foi descrito que a K17 pode regular o crescimento celular através da ligação com a proteína reguladora 14-3-3 sigma (Kim, Wong et al. 2006). A K17 também é importante na síntese de proteínas, regulando a atividade da via de sinalização do Akt/mTOR (Kim, Wong et al. 2006). Mutações no gene que codifica para a K17 levam a uma doença conhecida como paquioníquia congênita tipo II (McLean, Rugg et al. 1995). Esta doença é caracterizada por distrofia hipertrófica das unhas, hiperqueratose focal nas palmas das mãos e pés, joelho e cotovelo, assim como alopecia, leucoqueratose oral e estatocistomas múltiplos, afetando indivíduos de ambos os sexos em proporções iguais (McLean, Rugg et al. 1995).

OBJETIVOS

Objetivos:

Objetivo Geral

Investigar o papel da proteína AIRE no ambiente extratímico, e sua possível associação com APECED.

Objetivos específicos

Capítulo 1:

Investigar o papel da Proteína AIRE na resposta mediada por TLR e Dectina-1 em células de sangue periférico e células de linhagem mielomonocítica.

Capítulo 2:

Investigar possíveis proteínas que interajam com a proteína AIRE em células de linhagem mielomonocítica THP-1, e linhagem de queratinócitos HaCaT.

RESULTADOS

CAPÍTULO 1

AIRE is required for Dectin-1- and TLR-ligand-induced inflammatory response and complexes with Dectin-1, Syk and CARD9

Luis A. Pedroza, Antonio Condino-Neto from University of Campinas Medical School, Center for Investigation in Pediatrics, Campinas, SP 13081-970, Brazil

Vipul Kumar, Keri B. Sanborn, and Jordan S. Orange from Children's Hospital of Philadelphia, Department of Pediatrics, Division of Immunology, Philadelphia, PA 19104, USA

Correspondence: Antonio Condino-Neto e mail: condino@icb.usp.br

Nonstandard abbreviations: APECED - Autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy, AIRE - autoimmune regulator , WGA – wheat germ agglutinin

Abstract

Autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy (APECED) syndrome is a complex immunodysregulatory disease caused by mutation of the autoimmune regulator (AIRE) gene. Autoimmunity in APECED patients results from deficiency of AIRE function in transcriptional regulation of presentation of self-antigens in the thymus, which leads to defective T cell negative selection. It has been unclear, however, why APECED patients are susceptible to candidal infection. We investigated an extrathymic role for AIRE in the innate immune recognition of *Candida*, specifically in the Dectin-1 pathway, which is known to participate in anti-candidal defense. PBMCs from APECED patients had reduced TNF α responses after Dectin-1 ligation, and in some cases utilized a Raf-1-mediated pathway to preserve function. In a human monocytic cell line, reducing AIRE expression or overexpressing an AIRE mutant associated with candidal susceptibility reduced NF- κ B activity following Dectin-1 ligation. AIRE formed a transient complex with Dectin-1, Syk and CARD9 after Dectin-1 ligation and acutely relocalized to the monocytic cell membrane. Thus, AIRE can participate in the anti-candidal Dectin-1 signaling pathway, suggesting that fungal susceptibility in APECED patients can be due to defective Dectin-1 function, resulting from an aberrant and previously unappreciated cytoplasmic role for AIRE.

Introduction

The human primary immunodeficiency disorder autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy (APECED) is characterized by susceptibility to multiple autoimmune diseases and mucocutaneous infection with *Candida albicans*. Autoimmunity in APECED includes hypoparathyroidism, adrenocortical failure, hypothyroidism and diabetes, while the immunodeficiency involves recurrent, debilitating candidal infections of skin and mucous membranes that are often recalcitrant to therapy. APECED results from mutation of the gene encoding the autoimmune regulator (AIRE (1)). An important role for AIRE has been defined in thymic epithelia, where it enables expression of an appropriate repertoire of self-antigens to facilitate T cell negative selection (2). Thus, the development and propagation of auto-reactive T cells results from defective negative selection and drives autoimmunity in APECED patients.

Candidal susceptibility in APECED, however, is poorly understood. Hypotheses have focused on the role that AIRE serves as a transcriptional mediator directing T cell development in the thymus (2). Since candidal susceptibility is a known feature of primary and secondary T cell deficiencies, a T cell defect is a likely contributing factor in APECED. In addition to expression in thymic epithelial cells, however, AIRE is also expressed in monocytes and myeloid dendritic cells (3) thus raising the possibility of role for AIRE separate from that in T cell maturation.

Candida is recognized by the innate immune system. A number of pattern recognition receptors including TLR2, TLR4, DC-SIGN, mannose receptor, mannose-binding lectin, and Dectin-1 have been shown participate in the innate immune response to *C. albicans* (4). Dectin-1, which recognizes fungal cell wall β -glucan, has gained special attention because of its involvement in TH-17 cell development, a process integral to the adaptive immune response to *Candida* (5). Interestingly, TH-17-specific immunity appears

to be altered in patients having Chronic Mucocutaneous Candidiasis (without mutations in AIRE gene) (6) or Hyper IgE syndrome, disorders that share chronic candidiasis as a common feature (7).

Dectin-1 is an ITAM-containing transmembrane receptor that is tyrosine phosphorylated after its ligation. This leads to the recruitment of Syk to Dectin-1 and subsequent CARD9, MALT1 and Bcl-10 complex formation, which ultimately activates NF- κ B (5). Mechanisms linking Dectin-1 and the formation of a CARD9-containing complex to the induction of NF- κ B function are unclear. An additional pathway induced after Dectin-1 ligation, however, has recently been discovered and depends upon the serine threonine kinase Raf-1, which integrates with the Syk pathway at the point of NF- κ B activation (8).

Because the mechanism of candidal susceptibility in APECED is unclear, we sought to determine if AIRE could be functioning in the innate recognition of *Candida*. Although AIRE has well defined roles as a transcriptional mediator, participation in innate immune recognition could imply a non-nuclear function for the protein. Recent work has demonstrated that monocytic cells from APECED patients have an abnormal response to *Candida* antigens, as measured by cytokine production and protein phosphorylation (9, 10). Thus, we hypothesized that AIRE might function as a cytoplasmic intermediate in the recognition of *Candida*. We studied APECED patient PBMCs and identified abnormal response to TLR ligands as well as the Dectin-1 ligand curdlan. We also found that after curdlan stimulation AIRE relocalized to the cell membrane and joined a complex containing Dectin-1, the tyrosine kinase Syk, and CARD9, which was required for optimal NF- κ B activation. This defines a novel anti-candidal signaling complex that is defective in the human primary immunodeficiency APECED.

Materials and Methods

Cells, antibodies and reagents. The monocytic leukemia THP-1 cell line stably expressing a SEAP reporter construct driven by an NF- κ B promoter (THP-1 Blue - Invivogen) was grown in RPMI media supplemented with 200 μ g/mL Zeocin to maintain the reporter construct. Human monocytes were obtained from the Human Immunology Core of The University of Pennsylvania and were separated by countercurrent elutriation from peripheral blood of healthy donors. The purity of cells was greater than 90%. Antibodies used had specificities against the following human molecules: Dectin-1 (goat pAb N-16), AIRE-1 (goat pAb D-17 and rabbit pAb H-300), CARD9 (goat pAb T-17) and Syk (mouse mAb 4D10) all from Santa Cruz Biotechnology; HRP-conjugated anti-mouse Ig (GE Healthcare), and HRP-conjugated anti-goat Ig (Santa Cruz). Ultrapure LPS, zymosan, poly(I:C), flagellin, loxoribine, and ODN 2216 were obtained from InvivoGen and Curdlan and GW5074 from Sigma.

AIRE Expression and small-interfering (si) RNA. Human WT AIRE, and mutants encoding Y85C and R257X variants in SV-poly expression vectors were the kind gift of Ismo Ulmanen (National Public Health Institute Helsinki, Finland) (11). Vectors (0.5 μ g) were introduced into THP-1 cells using an Amaxa Nucleofector and nucleofection reagent V. pMaxGFP (Amaxa) was used to monitor nucleofection efficiency by FACS. AIRE expression was reduced in THP-1 cells using AIRE siRNA and compared to cells receiving siRNA control A (Santa Cruz) both introduced into THP-1 cells using the Amaxa Nucleofector and reagent V. After 24h, the efficiency of siRNA was determined by RNA expression using AIRE-specific TaqMan gene expression assay (Applied Biosystems). Nucleofected cells were incubated for 24h and then stimulated with LPS (2 μ g/mL) or Curdlan (10 μ g/mL) for 24h. Supernatants were harvested, mixed with specific substrate

for SEAP (Quantibblue, Invivogen) and incubated at 37°C until color developed, which was measured at 620nm and normalized against either pMaxGFP control or siRNA control A for overexpression and siRNA experiments, respectively.

Analysis of APECED patient cells. PBMCs were obtained from APECED patients or healthy controls using protocols approved by the internal review board for the protection of human subjects of the Children's Hospital of Philadelphia, Duke University Medical Center, or the ethical committee of University of Campinas Medical School, Campinas, Brazil. All 6 patients studied had AIRE mutations defined by DNA sequence analysis; 3 had a predicted Asp70fsX148 (patients 2,3 and 4) and 3 a 994del(13) alteration (patients 1,5 and 6). PBMCs were isolated from whole blood by centrifugation through Ficoll within 24h of the samples being drawn from patients. 2×10^5 PBMCs were stimulated with TLR or Dectin-1 agonists for 24h in RPMI complete media containing 10% FBS, after which supernatant was harvested and TNF α measured by ELISA (R&D Systems) as described (12). Where specified, PBMCs were preincubated with the Raf-1 inhibitor GW5074 (Sigma, 40 μ M) 1h prior to the TLR or Dectin-1 stimulation.

Analysis of AIRE interacting proteins. THP-1 cells or human monocytes (1.5×10^7) were stimulated with curdlan (10 μ g/mL) for 1, 10, 60min, or 12h and lysed in 1mL lysis buffer (200 mM NaCl, 1% NP-40, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM EDTA, and 10% glycerol) supplemented with protease and phosphatase inhibitors. Lysates were cleared of debris by centrifugation and incubated with protein G agarose (Invitrogen) for 2h, which had been preincubated with 20 μ g of AIRE, Dectin-1, CARD9, or Syk antibodies, or IgG control. After incubation with lysate, beads were washed 3x, and bound proteins eluted with NuPage sample buffer and analyzed by Western blot as described (13)

Confocal microscopy. Cells were prepared and confocal microscopy performed as described (13), except cells were either resting or stimulated before fixation and were stained with FITC-WGA, DAPI and anti-AIRE H-300 or pre-immune rabbit IgG (Novozyme). Microscope settings were established using IgG-stained cells (to define true positive signal) and cells individually stained with each fluorescent reagent (to minimize bleedthrough). Once calibrated settings were maintained constant throughout the experiment to enable quantitative analysis. Analysis was performed using Improvision Volocity and fluorescent regions defined using intensity thresholds, which were applied consistently to all cells. Total AIRE was defined as the AIRE fluorescence within the region encompassed by the outmost perimeter of WGA fluorescence. Nuclear AIRE was defined as the AIRE that colocalized with DAPI. Cytoplasmic AIRE was defined as Nuclear AIRE subtracted from total AIRE. Cell membrane AIRE was defined as AIRE colocalized with the WGA, which was not colocalized with the nucleus. Only the brightest WGA signal was used to define the WGA region to insure inclusion of only membrane structures. Percentages of AIRE were defined as $\%AIRE = 100 \times (\text{subcellular AIRE area} / \text{total cellular AIRE area})$. Cells were analyzed individually and data used to generate means and SDs.

Statistical analysis. All experiments were performed in at least triplicate and results averaged. Mean data were compared using Student's two-tailed *t* test and Prism software (GraphPad).

Results and discussion

Although patients with APECED have extraordinary susceptibility to *Candida* infection, the mechanism remains elusive. Since TLR2, TLR4 and Dectin-1 can participate in recognition of *Candida* (14), we evaluated PBMCs from patients with APECED and *AIRE* mutation for their ability to produce TNF in response to TLR and Dectin-1 ligands. We analyzed PBMCs from control donors, as well as three APECED patients with a 205-208dupCACG mutation and three with a 994del(13) mutation, predicting D70fsX148 and L323fsX51 *AIRE* proteins, respectively. After 24h incubation of PBMCs with individual TLR ligands or the Dectin-1 agonist curdlan the majority of patient culture supernatants contained less TNF α than those from controls (Fig. 1A). An aberrant response to TLR ligands was unexpected because patients with broad TLR pathway defects (such as deficiency of IRAK4, or MyD88) are susceptible to pyogenic bacterial infection (15), while APECED patients only have impaired defense against *C. albicans* (2). Although a deficient response following Dectin-1 ligation in concert with TLR2 and 4 deficiencies could explain susceptibility to *Candida*, it is likely that other *in vivo* inflammatory responses impact TLR function in APECED patients. In this light, the TLR responses of one of the three related patients with the Asp70fsX148 and two patients from a different family with L323fsX51AIRE were partially preserved (Fig. 1A,B). In some cases, however, these patients were actively infected at the time of evaluation.

Since a role for Raf-1 in the Dectin-1 signaling pathway was recently described (8), and Raf-1 activates NF- κ B independently of Syk, we hypothesized that residual function in the Dectin-1 pathway in patients is Raf-1-mediated. To test this, patient or control cells were preincubated with the Raf-1 inhibitor GW5074 prior to TLR or Dectin-1 stimulation. GW5074-treatment reduced stimulation-induced TNF α release from patient, but not control cells to near limits of detection (Fig. 1B). Because Raf-1 is phosphorylated

after Dectin-1 ligation independently of Syk function and occurs downstream of Ras GTPases, it is possible that the role of Raf-1 in the Dectin-1 pathway is distinct from AIRE, and can be utilized to obtain some TLR/Dectin-1 function and bypass AIRE deficiency. The reason for preferential utilization of the Raf-1-mediated pathway under certain circumstances is unclear, but could be related to induction by active infection in these patients. The defective TLR and Dectin-1 response in some patients, and that uncovered by Raf-1 inhibition in others, however, demonstrates that AIRE can participate in innate immunoreceptor function.

AIRE can function as a transcriptional mediator utilizing a consensus DNA binding sequence (16). Since we observed decreased $\text{TNF}\alpha$ responses in APECED patient cells, we evaluated the $\text{TNF}\alpha$ promoter region via database searches and did not find these or similar sequences. Furthermore, microarray studies performed in human myeloid-dendritic cells overexpressing AIRE protein (3), or in AIRE-deficient mice did not demonstrate differences in $\text{TNF}\alpha$ gene expression (17). Thus, it is unlikely that AIRE is serving a direct role in facilitating TNF transcription following TLR and Dectin-1 ligation. It is also unlikely that AIRE is facilitating transcription of Dectin-1, TLR, Syk, or Card9 as demonstrated in a comparative expression study in APECED patient and control monocytes (18).

Since NF- κ B is the principal transcription factor that controls TLR- and Dectin-1-induced $\text{TNF}\alpha$ production (19, 20), we specifically pursued a role for AIRE in the ability of TLR and Dectin-1 ligands to induce NF- κ B activation. For these experiments, we used a THP-1 cell line containing the secreted embryonic alkaline phosphatase (SEAP) gene under the control of NF- κ B sites. This cell line expressed AIRE as determined by Western blot and real time PCR analysis, and the ligation of TLR or Dectin-1 induced NF- κ B reporting (data not shown). To determine the role of AIRE in these pathways, AIRE-

specific siRNA oligonucleotides were introduced into THP-1 cells and resulted in an 87% reduction in AIRE RNA expression compared to control (Fig. 2A). Although the reduction in AIRE expression was not complete, induction of NF- κ B reporting by LPS or curdlan was significantly reduced in cells receiving AIRE-specific siRNA oligonucleotides compared to those receiving control oligonucleotides (Fig. 2B). This demonstrates that AIRE serves a role in enabling NF- κ B activation following TLR or Dectin-1 ligation.

To obtain additional insight into the role of AIRE in innate immunoreceptor signaling, the variability of patient phenotypes in APECED was considered. Although formal genotype-phenotype assessments have not been performed, two mutations have been consistently associated with a diametric phenotype regarding candidal susceptibility (21). Patients with the common Finnish Mutation R257X are highly susceptible, while patients with the common Iranian Jewish mutation Y85C rarely develop candidiasis. This difference could represent a specific feature of AIRE domains affected by the truncation mutation. To determine if these clinical differences were attributable to differentially impaired Dectin-1 function, THP-1 NF- κ B reporter cells were transfected with expression vectors containing WT AIRE or either of the two mutants. Although curdlan-induced NF- κ B activation was not significantly affected by transfection of WT or Y85C AIRE, R257X AIRE reduced NF- κ B activity (Fig. 3). This discordance was more specific to curdlan, as NF- κ B reporting after stimulation with LPS was not significantly different between cells transfected with either R257X or Y85C. These results demonstrate that a disease-derived mutation associated with candidal susceptibility has the capacity to interfere with signal transduction following Dectin-1 ligation. There is specificity in this pathway, as an AIRE mutant not associated with *Candida* infection did not interrupt signaling.

Although NF- κ B activation in R257X AIRE transfected cells was significantly reduced, the reduction was less than that observed in the patient or siRNA-treated cells.

To determine if the preserved function could be a feature of the Raf-1 pathway, transfected cells were pretreated with GW5074. NF- κ B function was drastically reduced in GW5074-treated cells receiving the R257X, but not Y85C, vector (Fig. 3). This suggests a specific involvement of the Raf-1 pathway in Dectin-1 function, as Raf-1 is required for activation when normal AIRE function is interrupted.

The experiments using APECED patient cells or AIRE-specific siRNA define a likely role for AIRE not in transcription, but in facilitating immunoreceptor signaling. As one potential AIRE function is as an adaptor protein or direct signaling intermediate, we evaluated AIRE immunoprecipitates from THP-1 cells for molecules known to be involved in the Dectin-1 signaling pathway: Dectin-1, Syk, and CARD9 (20, 22). In co-immunoprecipitation experiments, only trace constitutive associations between AIRE and Syk (Fig 4A), Dectin-1 and AIRE (Fig 4B), as well as CARD9 and AIRE (Fig 4C) were identified. After 1min curdlan stimulation, however, the association of AIRE with Syk as well as Dectin-1 and CARD9 with AIRE increased (Fig. 4A-C). The association between AIRE and Syk was maximal at 1h, as was that between CARD9 and AIRE. Although the association between Dectin-1 and AIRE was maximal at 1min, all of the associations identified were above constitutive levels for at least 60min. Within 12h of curdlan stimulation, each of the associations identified had returned to levels found in resting cells (Fig. 4A-C). A similar pattern was observed in freshly isolated human monocytes, although a higher basal interaction between AIRE and Dectin-1 was observed (Fig. 4D-E). This could be due to some endogenous Dectin-1 stimulation of monocytes *in vivo* but not THP-1 cells *in vitro*. In this light, the first Dectin-1 ligand described was an as yet unidentified molecule present on T cells (23). Thus, it is possible that the contact between monocytes and T cells *in vivo* maintains basal activation in Dectin-1 that can remain for several hours following isolation of monocytes. Irrespective, stimulation with curdlan induces a stable but

transient complex that involves the receptor Dectin-1 and AIRE. As AIRE also associates with the known Dectin-1 signaling components Syk and CARD9 following curdlan exposure, these results suggest that AIRE is a central component of a complex enabling a response to Dectin-1 ligation.

Since AIRE is considered to be a nuclear protein and Dectin-1 is a membrane receptor, it is unclear how an interaction between the two would take place. Since our biochemical experiments utilized cell lysates that had been centrifuged and thus presumably cleared of most nuclear material, we hypothesized that AIRE would relocate to the cell membrane following Dectin-1 ligation. To evaluate this, we performed confocal microscopy using THP-1 cells stimulated with curdlan for varying times. The cell membrane was identified using fluorescently labeled wheat germ agglutinin (WGA), which binds cell surface lectins. Cells were then stained for AIRE and the nucleus identified using DAPI. Although we did not have an antibody that allowed us to identify Dectin-1 by immunofluorescence, fluorescent signal for AIRE was specific, as demonstrated by comparison to cells stained with pre-immune rabbit IgG (data not shown). In unstimulated cells, the amount of AIRE not colocalized with the nucleus (i.e., in the cytoplasm) or that specifically colocalized with the cell membrane (non-nuclear WGA) was low (Fig. 5A,B). After 1min of curdlan stimulation, however, AIRE colocalization with DAPI was decreased, but had increased with non-nuclear WGA. This relocalization pattern was highest at 10min post-stimulation and had returned toward baseline by 60min. In an analysis of multiple cells, the percentages of total cellular AIRE present both in the cytoplasm and at the membrane had significantly increased following 1min of curdlan stimulation and peaked after 10min. In light of our immunoprecipitation experiments, these results suggest that after activation of the Dectin-1 pathway with curdlan, some AIRE leaves the nucleus, moving to the cytoplasm and membrane to form a complex with Dectin-1, Syk and

CARD9. This phenomenon could be mediated by its previously reported nuclear export signal (24), the functional significance of which has remained elusive.

Here we demonstrate that AIRE can function independently of its role as a nuclear localized transcription factor, and show specifically that AIRE is involved in the Dectin-1 and TLR pathways to NF- κ B activation required for responses to pathogenic elements. In the case of APECED, this may underlie the susceptibility to *Candida*, which has been previously undefined at a mechanistic level and clinically poorly understood. Our data demonstrate the involvement of AIRE in the response to the fungal β -glucan curdlan, likely through the rapid formation of a cytosolic or membrane complex containing Syk and CARD9, which links to Dectin-1. Although required for optimal Dectin-1 function, the role of AIRE in this complex remains unclear. There are several hypotheses that can be derived from existing data regarding AIRE. AIRE can act as an E3 ubiquitin ligase (25) and the appropriate function of the NF- κ B pathway depends upon several distinct E3 ligases (26). Thus the inclusion of AIRE in the complex could serve a direct role in NF- κ B regulation. AIRE also has pleckstrin-homology domain (PHD) that can facilitate protein interactions (16). Most PHD-containing proteins facilitate nuclear protein interactions, and the AIRE PHD binds non-methylated histone H3K4 to potentially regulate gene expression (27). Although most of the PHD-containing proteins are located in the nucleus, a role for the AIRE PHD in facilitating cytoplasmic protein interactions is plausible. Finally, AIRE also has a caspase recruitment domain (CARD) within its first 100 amino acids (28), which could conceivably interact with other CARD-containing proteins. Since we found that AIRE interacts with CARD9, it is likely that the interaction is critical for the innate anti-*Candida* response. Interestingly, a mutation in *CARD9* has been associated with Chronic Mucocutaneous Candidiasis (29). Although the role of CARD9 in inducing an NF- κ B response is not completely understood, it does form a complex with MALT1 and Bcl-10 to

activate NF- κ B after ligation of ITAM-containing receptors (22). CARD9 is also critical for RIP2-mediated TLR signaling and activation of MAPK activity (30). Thus, a deficiency of normal AIRE function could disrupt the formation of a CARD9/MALT1/Bcl-10 complex, thus interfering with NF- κ B and MAPK activation that occurs after Dectin-1 or TLR ligation.

We also found that AIRE interacts with Syk after Dectin-1 ligation. This is relevant, as it has been shown that APECED patient antigen-presenting cells have defects in tyrosine kinase activation following exposure to *C. albicans* antigens (9). Although the kinase(s) affected in patient cells were not identified, Syk is a likely candidate. Specifically, this deficiency could result from aberrant Dectin-1-mediated signaling via Syk, arising from an abnormal AIRE-directed complex. Since Syk is required for Dectin-1 signaling (20), we propose that Syk-dependent function of Dectin-1 is aberrant in APECED and that AIRE is required for optimal generation of a Dectin-1/Syk/CARD9/NF- κ B-dependent anti-candidal immune response.

For the first time, to our knowledge, we present evidence for a non-transcriptional and extranuclear role for AIRE, which is required for TLR and Dectin-1 function through the rapid assembly of a Dectin-1-associated signaling complex. Because Dectin-1 is critical for a protective response against *C. albicans* (14), we propose a model in which AIRE functions as an adaptor for Dectin-1 after recognition of β -glucan, and AIRE deficiency perturbs the normal activity of this pathway. This would lead to a defective response to *Candida* by antigen-presenting and other cells, resulting in the generation of ineffective anti-candidal immunity and chronic candidiasis. Through the evaluation of APECED patient cells, our results provide insight into the innate immune response to fungi and the potential mechanism of candidal susceptibility in APECED patients.

Acknowledgements

The authors thank Dr. Ismo Ulmanen for patient-derived mutations in expression vectors, Drs. Diane Mathis and Diana Gavanescu for helpful discussions, as well as Drs. Rebecca H. Buckley, Dewton Vasconcelos and Elena Perez for contributing patients with APECED. This work was supported by Children's Hospital of Philadelphia and Jeffrey Modell Diagnostic center (J.S.O.), the Vagelos scholars program of the University of Pennsylvania for (V.K.), NIH training grant T32 GM07229 (K.B.S.) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Brazil) for (L.A.P.). The authors declare no conflicting financial interests.

References

1. 1997. An autoimmune disease, APECED, caused by mutations in a novel gene featuring two PHD-type zinc-finger domains. *Nat Genet* 17:399-403.
2. Mathis, D., and C. Benoist. 2007. A decade of AIRE. *Nat Rev Immunol* 7:645-650.
3. Sillanpaa, N., C.G. Magureanu, A. Murumagi, A. Reinikainen, A. West, A. Manninen, M. Lahti, A. Ranki, K. Saksela, K. Krohn, R. Lahesmaa, and P. Peterson. 2004. Autoimmune regulator induced changes in the gene expression profile of human monocyte-dendritic cell-lineage. *Mol Immunol* 41:1185-1198.
4. Netea, M.G., G.D. Brown, B.J. Kullberg, and N.A. Gow. 2008. An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nat Rev Microbiol* 6:67-78.
5. LeibundGut-Landmann, S., O. Gross, M.J. Robinson, F. Osorio, E.C. Slack, S.V. Tsoni, E. Schweighoffer, V. Tybulewicz, G.D. Brown, J. Ruland, and C. Reis e Sousa. 2007. Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. *Nat Immunol* 8:630-638.
6. Ryan, K.R., M. Hong, P.D. Arkwright, A.R. Gennery, C. Costigan, M. Dominguez, D. Denning, V. McConnell, A.J. Cant, M. Abinun, G.P. Spickett, and D. Lilic. 2008. Impaired dendritic cell maturation and cytokine production in patients with chronic mucocutaneous candidiasis with or without APECED. *Clin Exp Immunol* 154:406-414.
7. Ma, C.S., G.Y. Chew, N. Simpson, A. Priyadarshi, M. Wong, B. Grimbacher, D.A. Fulcher, S.G. Tangye, and M.C. Cook. 2008. Deficiency of Th17 cells in hyper IgE syndrome due to mutations in STAT3. *J Exp Med* 205:1551-1557.
8. Gringhuis, S.I., J. den Dunnen, M. Litjens, M. van der Vlist, B. Wevers, S.C. Bruijns, and T.B. Geijtenbeek. 2009. Dectin-1 directs T helper cell differentiation by controlling noncanonical NF-kappaB activation through Raf-1 and Syk. *Nat Immunol* 10:203-213.
9. Brannstrom, J., S. Hassler, L. Peltonen, B. Herrmann, and O. Winqvist. 2006. Defect internalization and tyrosine kinase activation in Aire deficient antigen presenting cells exposed to *Candida albicans* antigens. *Clin Immunol* 121:265-273.
10. Pontynen, N., M. Strengell, N. Sillanpaa, J. Saharinen, I. Ulmanen, I. Julkunen, and L. Peltonen. 2008. Critical immunological pathways are downregulated in APECED patient dendritic cells. *J Mol Med* 86:1139-1152.
11. Bjorses, P., M. Halonen, J.J. Palvimo, M. Kolmer, J. Aaltonen, P. Ellonen, J. Perheentupa, I. Ulmanen, and L. Peltonen. 2000. Mutations in the AIRE gene: effects on subcellular location and transactivation function of the autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy protein. *Am J Hum Genet* 66:378-392.
12. Deering, R.P., and J.S. Orange. 2006. Development of a clinical assay to evaluate toll-like receptor function. *Clin Vaccine Immunol* 13:68-76.
13. Banerjee, P.P., R. Pandey, R. Zheng, M.M. Suhoski, L. Monaco-Shawver, and J.S. Orange. 2007. Cdc42-interacting protein-4 functionally links actin and microtubule networks at the cytolytic NK cell immunological synapse. *J Exp Med* 204:2305-2320.

14. Ferwerda, G., F. Meyer-Wentrup, B.J. Kullberg, M.G. Netea, and G.J. Adema. 2008. Dectin-1 synergizes with TLR2 and TLR4 for cytokine production in human primary monocytes and macrophages. *Cell Microbiol* 10:2058-2066.
15. Puel, A., K. Yang, C.L. Ku, H. von Bernuth, J. Bustamante, O.F. Santos, T. Lawrence, H.H. Chang, H. Al-Mousa, C. Picard, and J.L. Casanova. 2005. Heritable defects of the human TLR signalling pathways. *J Endotoxin Res* 11:220-224.
16. Purohit, S., P.G. Kumar, M. Laloraya, and J.X. She. 2005. Mapping DNA-binding domains of the autoimmune regulator protein. *Biochem Biophys Res Commun* 327:939-944.
17. Johnnidis, J.B., E.S. Venanzi, D.J. Taxman, J.P. Ting, C.O. Benoist, and D.J. Mathis. 2005. Chromosomal clustering of genes controlled by the aire transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:7233-7238.
18. Hong, M., K.R. Ryan, P.D. Arkwright, A.R. Gennery, C. Costigan, M. Dominguez, D.W. Denning, V. McConnell, A.J. Cant, M. Abinun, G.P. Spickett, D.C. Swan, C.S. Gillespie, D.A. Young, and D. Lilic. 2009. Pattern recognition receptor expression is not impaired in patients with chronic mucocutaneous candidiasis with or without autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy. *Clin Exp Immunol* 156:40-51.
19. Kawai, T., and S. Akira. 2007. Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol Med* 13:460-469.
20. Dennehy, K.M., G. Ferwerda, I. Faro-Trindade, E. Pyz, J.A. Willment, P.R. Taylor, A. Kerrigan, S.V. Tsoni, S. Gordon, F. Meyer-Wentrup, G.J. Adema, B.J. Kullberg, E. Schweighoffer, V. Tybulewicz, H.M. Mora-Montes, N.A. Gow, D.L. Williams, M.G. Netea, and G.D. Brown. 2008. Syk kinase is required for collaborative cytokine production induced through Dectin-1 and Toll-like receptors. *Eur J Immunol* 38:500-506.
21. Halonen, M., P. Eskelin, A.G. Myhre, J. Perheentupa, E.S. Husebye, O. Kampe, F. Rorsman, L. Peltonen, I. Ulmanen, and J. Partanen. 2002. AIRE mutations and human leukocyte antigen genotypes as determinants of the autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy phenotype. *J Clin Endocrinol Metab* 87:2568-2574.
22. Gross, O., A. Gewies, K. Finger, M. Schafer, T. Sparwasser, C. Peschel, I. Forster, and J. Ruland. 2006. Card9 controls a non-TLR signalling pathway for innate anti-fungal immunity. *Nature* 442:651-656.
23. Ariizumi, K., G.L. Shen, S. Shikano, S. Xu, R. Ritter, 3rd, T. Kumamoto, D. Edelbaum, A. Morita, P.R. Bergstresser, and A. Takashima. 2000. Identification of a novel, dendritic cell-associated molecule, dectin-1, by subtractive cDNA cloning. *J Biol Chem* 275:20157-20167.
24. Pitkanen, J., P. Vahamurto, K. Krohn, and P. Peterson. 2001. Subcellular localization of the autoimmune regulator protein. characterization of nuclear targeting and transcriptional activation domain. *J Biol Chem* 276:19597-19602.
25. Uchida, D., S. Hatakeyama, A. Matsushima, H. Han, S. Ishido, H. Hotta, J. Kudoh, N. Shimizu, V. Doucas, K.I. Nakayama, N. Kuroda, and M. Matsumoto. 2004. AIRE functions as an E3 ubiquitin ligase. *J Exp Med* 199:167-172.
26. Natoli, G., and S. Chiocca. 2008. Nuclear ubiquitin ligases, NF-kappaB degradation, and the control of inflammation. *Sci Signal* 1:pe1.
27. Org, T., F. Chignola, C. Hetenyi, M. Gaetani, A. Rebane, I. Liiv, U. Maran, L. Mollica, M.J. Bottomley, G. Musco, and P. Peterson. 2008. The autoimmune

- regulator PHD finger binds to non-methylated histone H3K4 to activate gene expression. *EMBO Rep* 9:370-376.
28. Ferguson, B.J., C. Alexander, S.W. Rossi, I. Liiv, A. Rebane, C.L. Worth, J. Wong, M. Laan, P. Peterson, E.J. Jenkinson, G. Anderson, H.S. Scott, A. Cooke, and T. Rich. 2008. AIRE's CARD revealed, a new structure for central tolerance provokes transcriptional plasticity. *J Biol Chem* 283:1723-1731.
 29. Grimbacher, B., A. hennigs, M. Nabavi, E.O. Glocker, M. Schafer, C. Woellner, U. Salzer, D. Pfeifer, F. Tahami, A. Plebani, M. Amirzagar, and N. Rezaei. 2008. Chronic mucocutaneous candidiasis is associated with a homozygous mutation in CARD9. *Clin Exp Immunol* 154:S213.
 30. Hsu, Y.M., Y. Zhang, Y. You, D. Wang, H. Li, O. Duramad, X.F. Qin, C. Dong, and X. Lin. 2007. The adaptor protein CARD9 is required for innate immune responses to intracellular pathogens. *Nat Immunol* 8:198-205.

Figure Legends

Figure 1. $TNF\alpha$ production by APECED patient PBMCs after specific ligation of TLRs and Dectin-1. (A.) PBMCs from 4 APECED patients (patients 1-4) were stimulated with specific agonists for innate immunoreceptors. These included 2 μ g/mL PAM2CSK4 (TLR2), 40 μ g/mL Poly(I:C) (TLR3), 2 μ g/mL LPS (TLR4), 4 μ g/mL flagellin (TLR5), 40 μ g/ μ L loxoribine (TLR7), 4 μ g/mL ODN 2216 (TLR9), 2 μ g/mL zymosan (TLR2/Dectin-1), and 10 μ g/mL curdlan (Dectin-1). (B). PBMCs from 2 distinct APECED patients (patients 5 and 6) were preincubated for 1h with 40 μ M of GW5074 and then stimulated with LPS (TLR4) or curdlan (Dectin-1). Cells were incubated with ligands for 24h at 37°C in duplicate, after which supernatants were harvested and secreted $TNF\alpha$ determined by ELISA. Mean values of the duplicate assays are presented.

Figure 2. Effect of AIRE siRNA on curdlan- and LPS-induced NF- κ B function. (A) THP-1 cells containing an SEAP NF- κ B reporter were nucleofected with AIRE-specific or control siRNA and the specific reduction of AIRE expression after 24h was confirmed by TaqMan PCR. (B) After 24h of incubation with siRNA, cells were incubated with 10 μ g/mL curdlan, or 10 μ g/mL LPS for 24h. Cell supernatants were harvested and NF- κ B activity measured by the presence of SEAP, determined by color change upon substrate addition. Results are presented as the percent inhibition relative to control siRNA. Each bar represents the mean $\pm$ SD of three independent experiments each performed in duplicate.

Figure 3. Effect of exogenous WT or APECED-patient derived mutant AIRE on NF- κ B function. THP-1 cells containing an SEAP NF- κ B reporter were nucleofected with expression vectors containing WT, R257X, or Y85C AIRE. After 24h cells were incubated

with 10µg/mL curdlan, or 10µg/mL LPS at 37°C in duplicate with or without 1µM of GW5074 pretreatment. After 24h of ligand exposure, cell supernatants were harvested and NF-κB activity measured by the presence of SEAP. Values were normalized to those obtained with cells nucleofected with WT AIRE. Each bar represents the mean ±SD of three independent experiments. The mean activity of R257X transfected cells was lower than the WT and Y85C ($p<0.01$).

Figure 4. Presence of AIRE in a curdlan-induced Dectin-1-containing complex. THP-1 cells (A-C) or human monocytes (D-E) were incubated at 37°C with media or 10µg/mL curdlan for 1, 10, 60min or 12h. Cells were lysed and immunoprecipitated using AIRE (A and D), Dectin-1 (B and E), or CARD9 (C) antibodies. Immunoprecipitates were evaluated by Western blot for Syk, AIRE, Dectin-1, and CARD9 (top blots). To ensure that the immunoprecipitated protein was present in equal quantities at the different time points, each blot was stripped and reprobed using the immunoprecipitating antibody (bottom blots). To control for non-specific precipitation, IgG-conjugated protein-G-agarose was used with lysates of THP-1 cells that had been stimulated with curdlan for 60min in each experiment (IgG lanes). Each result shown is representative of 3 independent experiments.

Figure 5. AIRE relocates from the nucleus to the cell membrane after Dectin-1 ligation. (A) THP-1 cells were incubated at 37°C with media or 10µg/mL curdlan for 1, 10 or 60min, and stained for membrane (WGA-green), AIRE (red), and nucleus (DAPI-blue). Transmitted light (left) and fluorescent signals obtained from individual specific filter sets are shown as well as overlays of AIRE and WGA, and three fluorescence signals to show colocalization. Quantitation of the amount of AIRE in the cytoplasm (B), nucleus (C) or cell

membrane (D) calculated using Volocity is represented as the percentage of total AIRE in each compartment at different time points. Each bar represents the mean $\pm$ SD of ≥ 19 independently analyzed cells and differences between unstimulated and other means (*= $p < 0.05$), as well as 10 and 60min means (**= $p < 0.05$) noted.

Figure 1

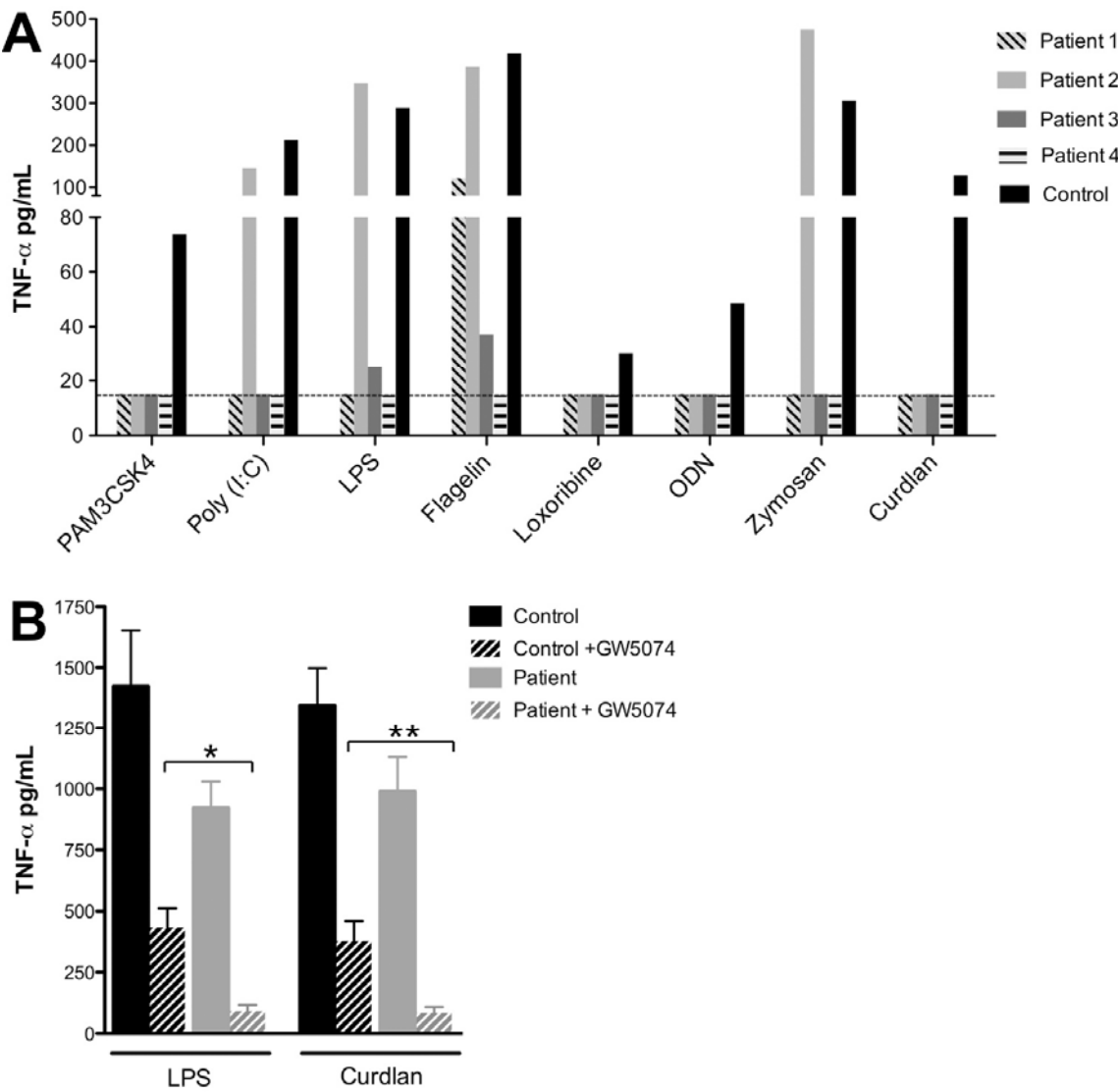


Figure 2

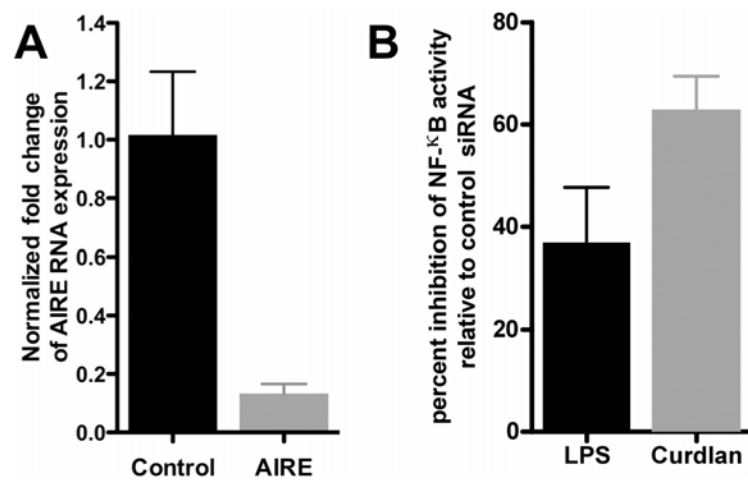


Figure 3

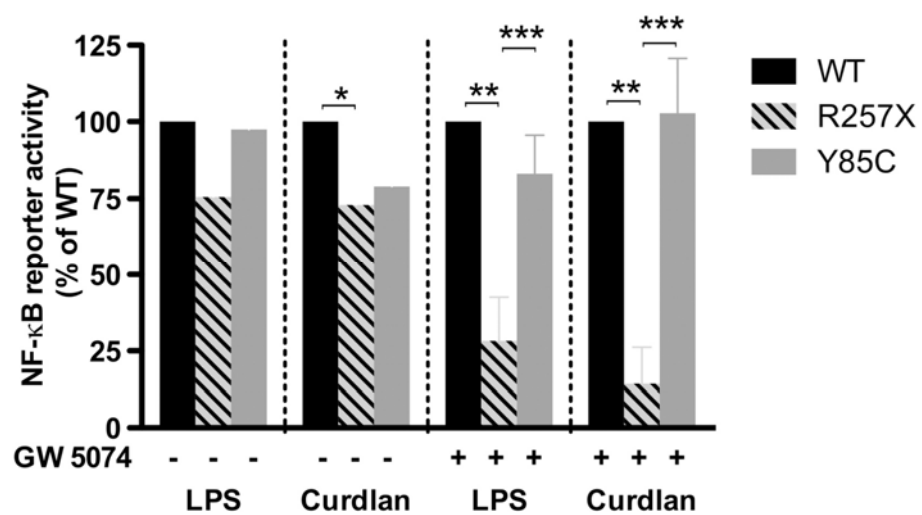


Figure 4

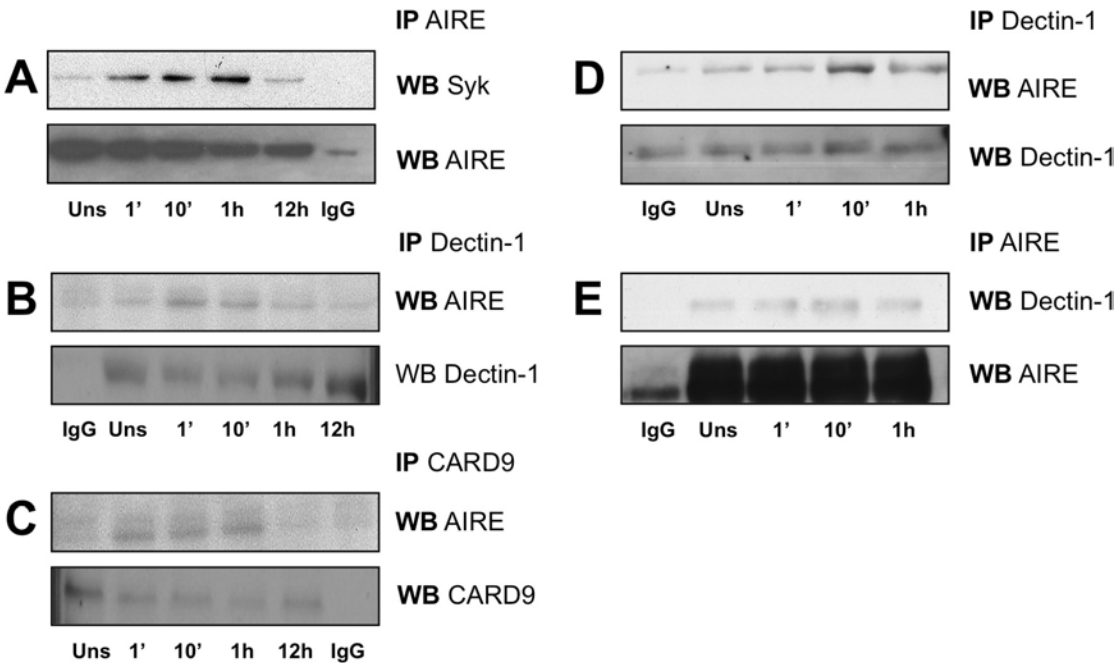
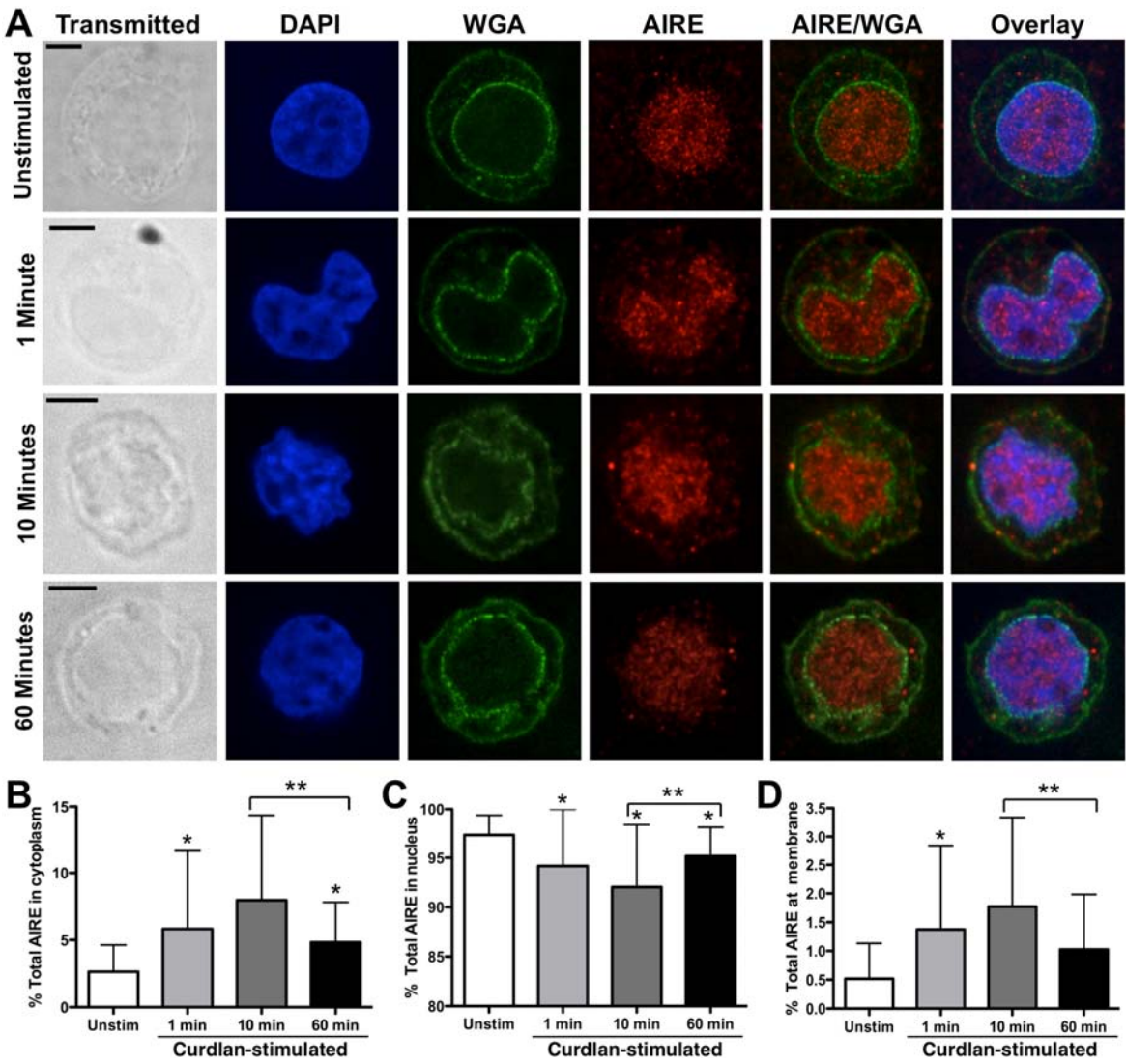


Figure 5



CAPÍTULO 2

AIRE-1 interaction with Keratin-17

Luis A. Pedroza, Antonio Condino-Neto from University of Campinas Medical School,
Center for Investigation in Pediatrics, Campinas, SP 13081-970, Brazil

Vipul Kumar, and Jordan S. Orange from Children's Hospital of Philadelphia,
Department of Pediatrics, Division of Immunology, Philadelphia, PA 19104, USA

Correspondence: Antonio Condino-Neto e mail: condino@icb.usp.br

Autoimmune Polyendocrinopathy Candidiasis Ectodermal Dystrophy (APECED) is a complex disease characterized by a multiple endocrine failure of autoimmune origin, chronic infections by *Candida albicans* (skin, nails and oral restricted), and ectodermal dystrophy mainly represented by nail dystrophy, vitiligo enamel hypoplasia and alopecia (1997; Mathis and Benoist 2007). These patients have an increased level of auto-antibodies, responsible for the destruction of many tissues (endocrine and non endocrine) and then, the endocrinopathy manifestation of the disease (1997; Mathis and Benoist 2007). APECED is inherited as autosomal recessive trait, and the AutoImmune REgulator (AIRE) was identified as the

mutated gene responsible for the disease (1997; Nagamine, Peterson et al. 1997). AIRE protein has a putative DNA binding domains, a nuclear localization (Bjorses, Halonen et al. 2000), and because of this, it is believed their role as a transcription factor. At the tissue level AIRE is expressed mainly at the thymus, and at low levels in the monocyte and DC (Mathis and Benoist 2007). Although, in the last ten years all the data showed that the putative molecular mechanism of the disease was related to the direct role of AIRE as facilitator of transcription and ectopic expression of self antigens in the thymus, new evidence pointed the AIRE protein is also an important mediator in medullary thymic epithelium maturation, where the negative T cell selection take place (Dooley, Erickson et al. 2008). Almost all the works are centered in the autoimmune component of the disease, only few experiments have been done to explore the molecular mechanism of the other mainly components of the disease: the chronic infections by *C albicans* and the ectodermal dystrophy. Some recent works showed that AIRE have an putative extranuclear activity, may be as a key molecule in different pathways in response to *C albicans* antigens (Brannstrom, Hassler et al. 2006, and our unpublished results).

In order to expand the few existent data about the role of AIRE at the extra-thymic environment, we investigated putative interacting proteins. We performed immunoprecipitation assays with specific AIRE anti-body, using a whole cell lysate from THP1 cells. AIRE expression was confirmed by WB and a semiquantitative RT PCR. The cell lysate was pre-cleared twice during 20 minutes with Protein G agarose. In addition specific antibody against AIRE and the correspondent isotype

were pre-absorbed during one hour in different samples of Protein G agarose. The pre-cleared lysate and the preabsorbed ProteinG agarose were incubated for two hours. The samples were boiled 5 minutes and resolved with the Nupage system, and then the gel was stained with colloidal comassie blue. Although, many proteins were pulled down as evidenced by the number of observed bands, a strong band with an apparent molecular weight of 50KD was differentially observed in all the performed experiments (fig 1a). This band was sliced, and sequenced by mass spectra. Twelve peptides corresponding to 28% of Keratin 17 were sequenced (fig 1b). Because the keratins are common contaminants observed in mass spectra test, the expression of this protein in THP1 cells was confirmed by semiquantitative RT PCR of RNA from THP-1 cells and also specific western blot (in both, the whole cell lysate and the pulled down proteins).

Keratin 17 is an intermediate filament protein, broadly expressed in many complex epithelia like skin appendages (nails, and hair bulbs) (McGowan and Coulombe 2000) and although their function is not completely clear, it may play a role for cell growth and size (McGowan and Coulombe 1998). Mutations in K17 lead to Congenital pachonychia, a disease characterized by nail dystrophy, oral leukokeratosis, and alopecia (McGowan and Coulombe 2000). Because K17 is normally expressed in human keratinocytes, where it is important for formation of intermediate filaments, we investigated if interaction with AIRE takes place in these cells. For this we used the HaCaT cell line, a non-tumorigenic keratinocyte population derived from adult trunk skin (Boukamp, Petrussevska et al. 1988). First the K17 and AIRE expression was confirmed by both, RT-PCR and western blot

(data not show). Next, immunoprecipitation assays using cell lysate from HaCaT cells as described before were performed. Figure 2 shows an interaction between K17 and AIRE. This interaction between AIRE and K17 in monocytic and keratinocyte cell lines was unexpected since AIRE is mainly a nuclear protein, while K17 is a component of intermediate filament, a structure present mostly on cytoplasm. Because with the cell lyses protocol, it is expected to lyse only the cell membrane but not the nuclear membrane, the cell lysate must be mainly composed by cytoplasmic proteins, suggesting that this AIRE/K17 interaction takes place on the cytoplasm. To explore this, we performed confocal microscopy using HaCaT cells. Freshly trypsinized cells were cultured 24 hours directly on slides, then fixed and permeabilized. Cells were then stained for the nucleus, DAPI, and with specific antibodies for K17 and AIRE. During the cell culture we observed three different types of cell arrangement, within the first hours after trypsin treatment, cells were mostly in a globular pattern. After 24 hours of culture, cells became attached to the slide, acquiring a pattern of spreading cells with presence of various filopodia and initiating a cell migration. Finally when cell-cell contacts take place, they form multicellular structures. At the initial stages the K17 pattern is mainly cytoplasmatic, almost all perinuclear and is not observed in the nucleus. Meanwhile AIRE expression is mostly nuclear and observed in small dots. Approximately 20 % of AIRE is localized on the Cytoplasm with a diffuse pattern. After 24 hours of culture, while the confluence was low and the cell spreading was taking place, almost all K17 is organized in filaments (intermediate filaments) and AIRE is again localized mainly on nucleus. Nevertheless, as was observed in the

IP experiments, among 30% of cytoplasmatic AIRE is colocalized with the K17, mostly within the organized filaments (fig 3A and 3C). Interestingly when the cells reach a high confluence, this colocalization is lost, the cytoplasmatic AIRE is again diffuse as observed in the initial stages, while the K17 staining keeps the same pattern. The expression of K17 (together with K6 and K16) has been associated with the wound healing response, a process in which cell migration is important (McGowan and Coulombe 1998). In this line we can hypothesize that when cell migration is initiated, a reorganization of intermediate filaments takes place, and this reorganization is important for the filopodia formation a crucial step in cell migration, and because of the AIRE/K17 only occur at this stage, it is plausible that AIRE have a unknown role in the formation or stability of intermediate filaments, at least in those involved in cell migration or filopodia formation.

Although APECED and Pachonychia Congenita Type II are completely different clinical entities, they share common features like nail dystrophy and alopecia. In addition, a recent study showed that AIRE absence in the Mtec is related with altered patterns of Keratin5 and Keratin8 expression (Dooley, Erickson et al. 2008). Based on our own results and previous publications about the two diseases, we speculate that by an unknown mechanism, AIRE is important for the appropriate development or intracellular distribution of K17, and the absence of AIRE lead to the abnormal function of K17 and then to the mild form of pachonychia congenital characterized by nail distrophia and alopecia, the common "ectodermal dystrophy features" observed in APECED patients.

A second scenario could be related with the highly susceptibility to *Candida albicans* observed in APECED patients. In fact a recent report pointed that the nail destruction observed in APECED patients is more a dysplasia because the chronic *Candida* infection rather than an “inborn” dystrophy (Collins, Dominguez et al. 2006). In this line it is possible to speculate that the defect in AIRE lead to a dysregulation in keratinocyte organization and or differentiation in part because of a K17 defect, creating an ideal environment for *Candida* growth, colonization, and destruction of nail bed. In fact recently Rollenhagen *et al.* reported that the motility and cell differentiation of oral keratinocytes is affected by *Candida* infection, which could lead to a differentiation of the oral stratified epithelial cells, favorable for *candida* growth and survival, which is likely to play an important role in the pathogenesis of candidiasis (Rollenhagen, Wollert et al. 2009).

In summary we described for the first time the interaction of AIRE with Keratin 17. This interaction takes place in monocytes and keratinocytes, two cells considered critical for defence against *C.albicans*. Since it is observed during cell spreading it is possible the AIRE plays a role in cell motility, nevertheless the molecular mechanism of this interaction and the relevance for the cell (monocytes or keratinocytes) physiology or even its role on candidiasis susceptibility remains to be determined.

Figure Legends

Figure 1. Proteins immunoprecipitated from THP1 cell lysate with AIRE-1 specific antibody (a). The indicated band was submitted to Mass Spectra and the peptides sequenced covering 28% of K17 sequence were highlighted (b). Keratin 17 identification by mass spectrometry. The left panel shows sequence coverage comprising 12 unique tryptic peptides. The right three panels show individual representative product ion spectra assigned to the K17 tryptic peptide sequences as indicated by the arrows. Assigned b- and y-ions are labeled.

Figure 2. Evaluation of AIRE and K17 association by Immunoprecipitation in HaCat cells. Whole cell lysate from HaCat cells was immunoprecipitated with either IgG control and Aire polyclonal antibody (AB, left), control IgG. or K17 polyclonal AB (right), and evaluated for the presence of AIRE (top) or K17 (bottom) by Western Blot.

Figure 3. Evaluation of AIRE and K17 association by confocal microscopy in HaCaT cells. The cells were incubated for 24 hours in sterile slides at 37°C, fixed and stained for AIRE (red), K17 (green), and nucleus (DAPI-blue). Transmitted light (left) and fluorescent signals obtained from individual specific filter sets are shown as well as overlays of AIRE and K17, and three fluorescence signals to show co-localization. Quantitation of the amount of AIRE in the cytoplasm (B), nucleus (C) calculated using Volocity is represented as the percentage of total AIRE in each compartment at different time points.

Bibliography

- (1997). "An autoimmune disease, APECED, caused by mutations in a novel gene featuring two PHD-type zinc-finger domains." Nat Genet **17**(4): 399-403.
- Bjorses, P., M. Halonen, et al. (2000). "Mutations in the AIRE gene: effects on subcellular location and transactivation function of the autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy protein." Am J Hum Genet **66**(2): 378-92.
- Boukamp, P., R. T. Petrussevska, et al. (1988). "Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line." J Cell Biol **106**(3): 761-71.
- Brannstrom, J., S. Hassler, et al. (2006). "Defect internalization and tyrosine kinase activation in Aire deficient antigen presenting cells exposed to Candida albicans antigens." Clin Immunol **121**(3): 265-73.
- Collins, S. M., M. Dominguez, et al. (2006). "Dermatological manifestations of autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy syndrome." Br J Dermatol **154**(6): 1088-93.
- Dooley, J., M. Erickson, et al. (2008). "Alterations of the medullary epithelial compartment in the Aire-deficient thymus: implications for programs of thymic epithelial differentiation." J Immunol **181**(8): 5225-32.
- Mathis, D. and C. Benoist (2007). "A decade of AIRE." Nat Rev Immunol **7**(8): 645-50.
- McGowan, K. and P. A. Coulombe (1998). "The wound repair-associated keratins 6, 16, and 17. Insights into the role of intermediate filaments in specifying keratinocyte cytoarchitecture." Subcell Biochem **31**: 173-204.
- McGowan, K. M. and P. A. Coulombe (1998). "Onset of keratin 17 expression coincides with the definition of major epithelial lineages during skin development." J Cell Biol **143**(2): 469-86.
- McGowan, K. M. and P. A. Coulombe (2000). "Keratin 17 expression in the hard epithelial context of the hair and nail, and its relevance for the pachyonychia congenita phenotype." J Invest Dermatol **114**(6): 1101-7.
- Nagamine, K., P. Peterson, et al. (1997). "Positional cloning of the APECED gene." Nat Genet **17**(4): 393-8.
- Rollenhagen, C., T. Wollert, et al. (2009). "Stimulation of cell motility and expression of late markers of differentiation in human oral keratinocytes by Candida albicans." Cell Microbi

Figure 1.

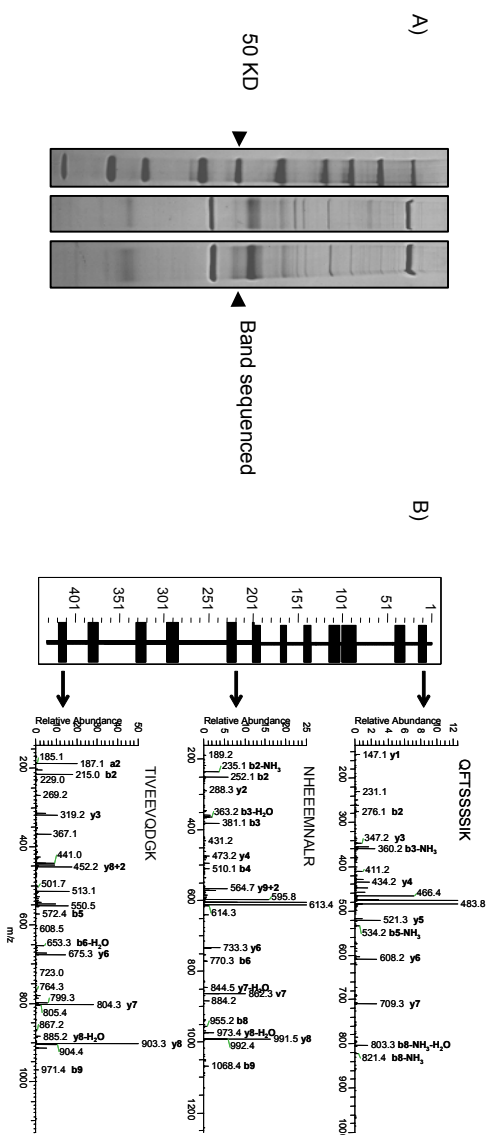


Figure 2.

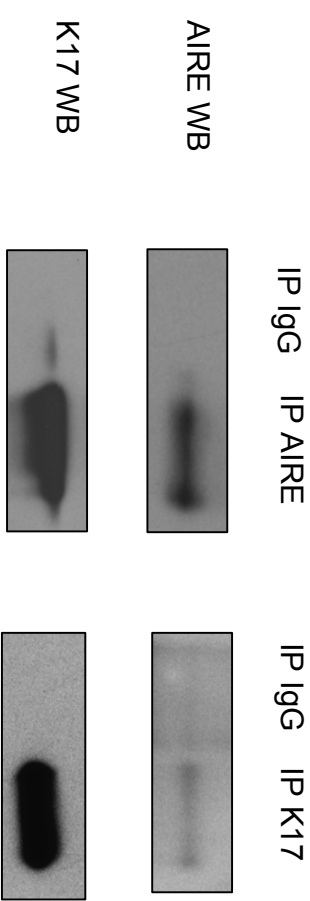
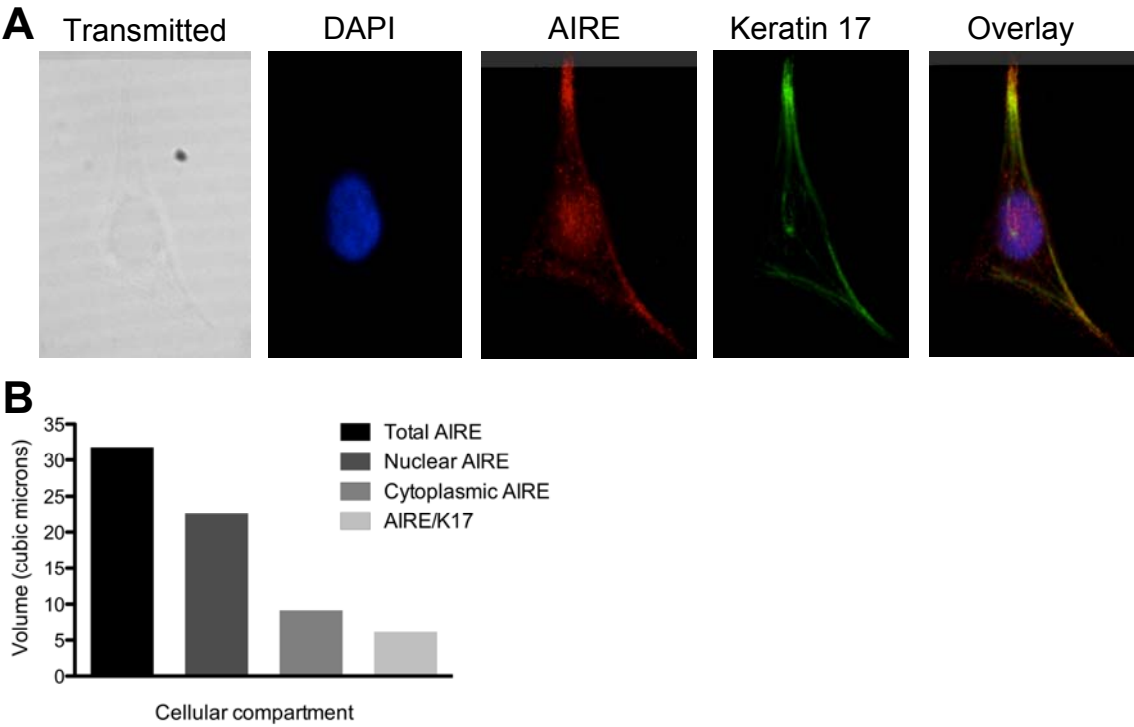


Figure 3.



\

DISCUSSÃO GERAL

A associação do APECED com mutações no gene *AIRE* foi primeiramente descrita em 1997. Desde então, uma grande quantidade de informação obtida do estudo da proteína AIRE em modelos *in vivo* e *in vitro*, levou a elaboração de um modelo onde AIRE é crítico na expressão de proteínas ectópicas no timo, e conseqüentemente forneceram uma explicação plausível para a presença elevada de manifestações autoimunes nestes pacientes. No entanto, durante este tempo, pouca informação sobre a associação entre defeitos na proteína AIRE e a susceptibilidade a infecções por *Candida* e a distrofia do ectodermo foram descritas.

No presente trabalho apresentamos evidências que sugerem o envolvimento da proteína AIRE com vias de sinalização importantes na resposta a *Candida albicans*. A Dectina-1 é um receptor capaz de reconhecer Beta-glucanos derivados de diversos microorganismos incluído da *Candida albicans*. Interessantemente, recentes estudos mostraram que mutações em Dectina-1 ou CARD9 estão presentes em pacientes com Candidíase mucocutânea crônica (sem mutação conhecida no *AIRE*) e levam a deficiência na liberação de citocinas pro inflamatórias após o estímulo com antígenos de *Candida albicans*. Seguindo esta evidencia é possível pensar que, no caso de pacientes com defeitos na proteína AIRE, existe um defeito similar que leva ao funcionamento anormal na resposta a *Candida albicans* e, conseqüentemente, a uma elevada suscetibilidade a infecções por este fungo. Como descrito anteriormente, após a ligação da Dectina-1 é estabelecida uma sinalização que

envolve a ativação da quinase SYK, a formação de um complexo que envolve CARD9/MALT1/BCL10 e, finalmente, a ativação do NF- κ B. No entanto, o link entre a ativação da proteína SYK e a formação do complexo, não foi demonstrada. Nossos resultados sugerem que a Proteína AIRE funciona, mediante um mecanismo desconhecido, como ponte de enlace entre estes dois eventos da via da sinalização da Dectina-1.

Até agora foi descrito que a proteína AIRE possui 5 domínios, (CARD, LXXLL, SAND e 2 domínios PHD). Estes domínios são importantes na interação proteína-proteína. De fato, o novo modelo do papel do AIRE na expressão ectópica de antígenos no timo, aponta que esta proteína é importante no estabelecimento ou estabilização de complexos transcricionais, que finalmente vão levar a expressão destes antígenos nas células do epitélio tímico. Assim, é possível pensar que no caso da via de sinalização da Dectina-1, o papel do AIRE é similar, provavelmente estabilizando a interação entre as proteínas anteriormente descritas. Deste modo é possível formular hipóteses sobre diversos cenários nos quais AIRE pode cumprir esta função. Como descrito na introdução, a Dectina-1 possui somente um domínio ITAM, diferentemente dos outros receptores que ativam estas vias onde são encontrados pelo menos dois destes domínios. No entanto, a ativação da quinase SYK pela Dectina-1 precisa de dois resíduos SH2 (domínio que interage com os resíduos ITAM fosforilados). Assim é possível que a proteína AIRE seja necessária para estabilizar esta interação, que de outra forma não aconteceria. Uma segunda hipótese poderia envolver a interação com a

proteína CARD9. Recentemente foi descrita a presença de um domínio CARD na extremidade N terminal da proteína AIRE. Assim, como as proteínas que possuem domínios CARD podem interagir mediante ligações homotípicas, é possível uma interação do AIRE com a CARD9. No entanto, o cenário provável pelo qual AIRE influencia a atividade do CARD9 ainda precisaser determinado. Espera-se que a proteína Syk, tenha uma atividade quinase sobre o CARD9. Assim, baseado no fato de que a única função conhecida do AIRE é interação com outras proteínas, uma possibilidade seria servir como adaptador na interação do Syk com o CARD9 que, após esta ativação, seria liberado deste complexo transitório para formar o complexo com MALT-1 e BCL10.

Da mesma maneira que a suscetibilidade a candidíase em pacientes com APECED não foi ainda esclarecida, a relação com o desenvolvimento de distrofias do ectodermo ainda é desconhecida. Interessantemente, os nossos experimentos realizados na segunda parte do trabalho mostraram que a proteína AIRE pode interagir com a proteína K17, que é defeituosa em pacientes com paquioniquia congênita, doença caracterizada também pela presença de distrofias do ectodermo, similares a encontrada nos pacientes com APECED. Qual poderia ser a relação entre estas duas doenças? Como se conhece pouco os mecanismos moleculares da paquioniquia congênita e da fisiologia da K17 é difícil estabelecer possíveis cenários. Baseado em nossas observações, é possível que AIRE seja importante em algum tipo de modificação pós- transcricional da K17. As moléculas de K17 mudam de um estado fosforilado para um estado não fosforilado para ser incluídas nos filamentos intermediários. Assim, como em nossos resultados, a interação entre AIRE e K17 aconteceu no estágio onde os

filamentos estão sendo formados e as células são aderentes, é possível, portanto pensar que AIRE influencia a polimerização ou despolimerização ou a estabilização da K17 nos filamentos intermediários. Uma segunda possibilidade é que K17 influencie a atividade do AIRE. Recentemente, foi demonstrado que K17 possui um sinal que ajuda a proteína 14-3-3 sigma a se deslocar do núcleo. Interessantemente, a proteína AIRE é preferencialmente encontrada no núcleo, mas mediante mecanismos desconhecidos, é exportada ao citoplasma, o que poderia levar a hipótese de que a K17 poderia mediar a exportação nuclear do AIRE.

CONCLUSÃO GERAL

Conclusão Geral

Reunindo os dados apresentados aqui, podemos sugerir um modelo onde AIRE possui atividade extratômica e extranuclear. Está envolvida na resposta imune inata, mediando a ativação do NF- κ B via Dectina-1, possivelmente formando complexos com as principais proteínas desta via, Dectina-1 Syk e Card9 o que poderia estar envolvido na suscetibilidade a candidíase comumente observada em pacientes com APECED.

Da mesma maneira, nosso estudo encontrou uma nova interação de AIRE com K17, que poderia explicar outra característica clínica destes pacientes: a distrofia ectodérmica. Esta interação sugere um novo papel do AIRE na fisiologia estrutural da célula mediando os filamentos intermediários

A procura pelo mecanismo molecular destas novas interações descritas assegura novos trabalhos nesta nova linha de pesquisa.

BIBLIOGRAFIA GERAL

- Abbas, A. H. L. a. A. K. (2003). Celular and Molecular Immunology. Philadelphia, Elsevier.
- Agrawal, S., A. Agrawal, et al. (2003). "Cutting edge: different Toll-like receptor agonists instruct dendritic cells to induce distinct Th responses via differential modulation of extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase and c-Fos." J Immunol **171**(10): 4984-9.
- An, H., Y. Yu, et al. (2002). "Involvement of ERK, p38 and NF-kappaB signal transduction in regulation of TLR2, TLR4 and TLR9 gene expression induced by lipopolysaccharide in mouse dendritic cells." Immunology **106**(1): 38-45.
- Ariizumi, K., G. L. Shen, et al. (2000). "Identification of a novel, dendritic cell-associated molecule, dectin-1, by subtractive cDNA cloning." J Biol Chem **275**(26): 20157-67.
- Bienz, M. (2006). "The PHD finger, a nuclear protein-interaction domain." Trends Biochem Sci **31**(1): 35-40.
- Bjorses, P., M. Halonen, et al. (2000). "Mutations in the AIRE gene: effects on subcellular location and transactivation function of the autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy protein." Am J Hum Genet **66**(2): 378-92.
- Blank, M., O. Barzilai, et al. (2007). "Molecular mimicry and auto-immunity." Clin Rev Allergy Immunol **32**(1): 111-8.
- Bottomley, M. J., M. W. Collard, et al. (2001). "The SAND domain structure defines a novel DNA-binding fold in transcriptional regulation." Nat Struct Biol **8**(7): 626-33.
- Bragulla, H. H. and D. G. Homberger (2009). "Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia." J Anat **214**(4): 516-59.
- Brannstrom, J., S. Hassler, et al. (2006). "Defect internalization and tyrosine kinase activation in Aire deficient antigen presenting cells exposed to Candida albicans antigens." Clin Immunol **121**(3): 265-73.
- Brown, G. D., J. Herre, et al. (2003). "Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans." J Exp Med **197**(9): 1119-24.
- Carroll, M. C. (2004). "The complement system in regulation of adaptive immunity." Nat Immunol **5**(10): 981-6.
- Clark, R. A., K. Yamanaka, et al. (2005). "Human skin cells support thymus-independent T cell development." J Clin Invest **115**(11): 3239-49.
- Collins, S. M., M. Dominguez, et al. (2006). "Dermatological manifestations of autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy syndrome." Br J Dermatol **154**(6): 1088-93.
- Consortium, F.-G. A. (1997). "An autoimmune disease, APECED, caused by mutations in a novel gene featuring two PHD-type zinc-finger domains." Nat Genet **17**(4): 399-403.
- Coulombe, P. A. and M. B. Omary (2002). "'Hard' and 'soft' principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments." Curr Opin Cell Biol **14**(1): 110-22.
- Doyle, S., S. Vaidya, et al. (2002). "IRF3 mediates a TLR3/TLR4-specific antiviral gene program." Immunity **17**(3): 251-63.
- Ferguson, B. J., C. Alexander, et al. (2008). "AIRE's CARD revealed, a new structure for central tolerance provokes transcriptional plasticity." J Biol Chem **283**(3): 1723-31.

- Fiorini, M., R. Franceschini, et al. (2004). "BTK: 22 novel and 25 recurrent mutations in European patients with X-linked agammaglobulinemia." Hum Mutat **23**(3): 286.
- Fischer, A. (2004). "Human primary immunodeficiency diseases: a perspective." Nat Immunol **5**(1): 23-30.
- Gibson, T. J., C. Ramu, et al. (1998). "The APECED polyglandular autoimmune syndrome protein, AIRE-1, contains the SAND domain and is probably a transcription factor." Trends Biochem Sci **23**(7): 242-4.
- Gillard, G. O., J. Dooley, et al. (2007). "Aire-dependent alterations in medullary thymic epithelium indicate a role for Aire in thymic epithelial differentiation." J Immunol **178**(5): 3007-15.
- Goodridge, H. S., R. M. Simmons, et al. (2007). "Dectin-1 stimulation by *Candida albicans* yeast or zymosan triggers NFAT activation in macrophages and dendritic cells." J Immunol **178**(5): 3107-15.
- Gray, D., J. Abramson, et al. (2007). "Proliferative arrest and rapid turnover of thymic epithelial cells expressing Aire." J Exp Med **204**(11): 2521-8.
- Gringhuis, S. I., J. den Dunnen, et al. (2009). "Dectin-1 directs T helper cell differentiation by controlling noncanonical NF-kappaB activation through Raf-1 and Syk." Nat Immunol **10**(2): 203-13.
- Gross, O., A. Gewies, et al. (2006). "Card9 controls a non-TLR signalling pathway for innate anti-fungal immunity." Nature **442**(7103): 651-6.
- Gu, L. H. and P. A. Coulombe (2007). "Keratin function in skin epithelia: a broadening palette with surprising shades." Curr Opin Cell Biol **19**(1): 13-23.
- Harada, T. and N. Ohno (2008). "Contribution of dectin-1 and granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) to immunomodulating actions of beta-glucan." Int Immunopharmacol **8**(4): 556-66.
- Hayashi, F., K. D. Smith, et al. (2001). "The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5." Nature **410**(6832): 1099-103.
- Herrmann, H., H. Bar, et al. (2007). "Intermediate filaments: from cell architecture to nanomechanics." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(7): 562-73.
- Hong, M., K. R. Ryan, et al. (2009). "Pattern recognition receptor expression is not impaired in patients with chronic mucocutaneous candidiasis with or without autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy." Clin Exp Immunol **156**(1): 40-51.
- Husebye, E. S., J. Perheentupa, et al. (2009). "Clinical manifestations and management of patients with autoimmune polyendocrine syndrome type I." J Intern Med **265**(5): 514-29.
- Ioannidis, J. P., D. G. Contopoulos-Ioannidis, et al. (2003). "Effects of CCR5-delta32 and CCR2-64I alleles on disease progression of perinatally HIV-1-infected children: an international meta-analysis." Aids **17**(11): 1631-8.
- Jin, Y., C. Mazza, et al. (2004). "Mutations of the Wiskott-Aldrich Syndrome Protein (WASP): hotspots, effect on transcription, and translation and phenotype/genotype correlation." Blood **104**(13): 4010-9.
- Jouault, T., S. Ibata-Ombetta, et al. (2003). "*Candida albicans* phospholipomannan is sensed through toll-like receptors." J Infect Dis **188**(1): 165-72.
- Kawai, T. and S. Akira (2008). "Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling." Ann N Y Acad Sci **1143**: 1-20.

- Kim, S. and P. A. Coulombe (2007). "Intermediate filament scaffolds fulfill mechanical, organizational, and signaling functions in the cytoplasm." *Genes Dev* **21**(13): 1581-97.
- Kim, S., P. Wong, et al. (2006). "A keratin cytoskeletal protein regulates protein synthesis and epithelial cell growth." *Nature* **441**(7091): 362-5.
- Kogawa, K., S. Nagafuchi, et al. (2002). "Expression of AIRE gene in peripheral monocyte/dendritic cell lineage." *Immunol Lett* **80**(3): 195-8.
- Kumar, P. G., M. Laloraya, et al. (2001). "The autoimmune regulator (AIRE) is a DNA-binding protein." *J Biol Chem* **276**(44): 41357-64.
- LeibundGut-Landmann, S., O. Gross, et al. (2007). "Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17." *Nat Immunol* **8**(6): 630-8.
- Lemaitre, B., E. Nicolas, et al. (1996). "The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults." *Cell* **86**(6): 973-83.
- Mathis, D. and C. Benoist (2009). "Aire." *Annu Rev Immunol* **27**: 287-312.
- McGowan, K. M. and P. A. Coulombe (1998). "Onset of keratin 17 expression coincides with the definition of major epithelial lineages during skin development." *J Cell Biol* **143**(2): 469-86.
- McLean, W. H., E. L. Rugg, et al. (1995). "Keratin 16 and keratin 17 mutations cause pachyonychia congenita." *Nat Genet* **9**(3): 273-8.
- Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, et al. (1997). "A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity." *Nature* **388**(6640): 394-7.
- Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, et al. (1998). "MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways." *Mol Cell* **2**(2): 253-8.
- Moll, R., W. W. Franke, et al. (1982). "The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells." *Cell* **31**(1): 11-24.
- Netea, M. G., C. Van der Graaf, et al. (2004). "Recognition of fungal pathogens by Toll-like receptors." *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **23**(9): 672-6.
- Paramio, J. M., M. L. Casanova, et al. (1999). "Modulation of cell proliferation by cytokeratins K10 and K16." *Mol Cell Biol* **19**(4): 3086-94.
- Patino, P. J., J. E. Perez, et al. (1999). "Molecular analysis of chronic granulomatous disease caused by defects in gp91-phox." *Hum Mutat* **13**(1): 29-37.
- Patino, P. J., J. Rae, et al. (1999). "Molecular characterization of autosomal recessive chronic granulomatous disease caused by a defect of the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced form) oxidase component p67-phox." *Blood* **94**(7): 2505-14.
- Planko, L., K. Bohse, et al. (2007). "Identification of a keratin-associated protein with a putative role in vesicle transport." *Eur J Cell Biol* **86**(11-12): 827-39.
- Pontynen, N., M. Strengell, et al. (2008). "Critical immunological pathways are downregulated in APECED patient dendritic cells." *J Mol Med* **86**(10): 1139-52.
- Roeder, A., C. J. Kirschning, et al. (2004). "Induction of nuclear factor- kappa B and c-Jun/activator protein-1 via toll-like receptor 2 in macrophages by antimycotic-treated *Candida albicans*." *J Infect Dis* **190**(7): 1318-26.
- Rosenzweig, S. D. and S. M. Holland (2004). "Phagocyte immunodeficiencies and their infections." *J Allergy Clin Immunol* **113**(4): 620-6.

- Rothfuchs, A. G., A. Bafica, et al. (2007). "Dectin-1 interaction with Mycobacterium tuberculosis leads to enhanced IL-12p40 production by splenic dendritic cells." J Immunol **179**(6): 3463-71.
- Ryan, K. A., M. F. Smith, Jr., et al. (2004). "Reactive oxygen and nitrogen species differentially regulate Toll-like receptor 4-mediated activation of NF-kappa B and interleukin-8 expression." Infect Immun **72**(4): 2123-30.
- Ryan, K. R., M. Hong, et al. (2008). "Impaired dendritic cell maturation and cytokine production in patients with chronic mucocutaneous candidiasis with or without APECED." Clin Exp Immunol **154**(3): 406-14.
- Schweizer, J., P. E. Bowden, et al. (2006). "New consensus nomenclature for mammalian keratins." J Cell Biol **174**(2): 169-74.
- Shah, V. B., Y. Huang, et al. (2008). "Beta-glucan activates microglia without inducing cytokine production in Dectin-1-dependent manner." J Immunol **180**(5): 2777-85.
- Takeuchi, O., T. Kawai, et al. (2001). "Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6." Int Immunol **13**(7): 933-40.
- Taylor, P. R., G. D. Brown, et al. (2002). "The beta-glucan receptor, dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages." J Immunol **169**(7): 3876-82.
- Trojanovsky, S. M., R. E. Leube, et al. (1992). "Characterization of the human gene encoding cytokeratin 17 and its expression pattern." Eur J Cell Biol **59**(1): 127-37.
- Tsoni, S. V. and G. D. Brown (2008). "beta-Glucans and dectin-1." Ann N Y Acad Sci **1143**: 45-60.
- Tykocinski, L. O., A. Sinemus, et al. (2008). "The thymus medulla slowly yields its secrets." Ann N Y Acad Sci **1143**: 105-22.
- van der Vliet, H. J. and E. E. Nieuwenhuis (2007). "IPEX as a result of mutations in FOXP3." Clin Dev Immunol **2007**: 89017.
- Wesche, H., W. J. Henzel, et al. (1997). "MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex." Immunity **7**(6): 837-47.
- Worth, A., A. J. Thrasher, et al. (2006). "Autoimmune lymphoproliferative syndrome: molecular basis of disease and clinical phenotype." Br J Haematol **133**(2): 124-40.
- Wyllie, D. H., E. Kiss-Toth, et al. (2000). "Evidence for an accessory protein function for Toll-like receptor 1 in anti-bacterial responses." J Immunol **165**(12): 7125-32.
- Xie, J., M. Sun, et al. (2006). "Human Dectin-1 isoform E is a cytoplasmic protein and interacts with RanBPM." Biochem Biophys Res Commun **347**(4): 1067-73.