

Subprojeto 9: Study of the Regulatory Mechanisms Involved in the in-vitro Generation of Induced Regulatory T cells (iTreg) from Naive T Cells

Principal Investigator: Marco Antonio Zago

Abstract

Regulatory T lymphocytes (Treg) have an important role in the peripheral control of immune system's homeostasis and are involved in autoimmune diseases, transplant tolerance, and in the immune escape of tumors (Sakaguchi, 2004; Shevach, 2000; Maloy & Powrie, 2001). These regulatory roles endow Tregs with an enormous therapeutic potential, since its administration could benefit patients with autoimmune diseases or undergoing organ transplantation, while, on the other hand, inhibition of their generation or function could benefit patients with tumors, allowing its immune system to act against tumor cells (Riley *et al*, 2009). Thus, understanding the processes responsible for the generation of these cells could contribute to the development of therapeutic approaches in both directions. In vitro, iTregs can be generated by activating Naive CD4⁺ T cells, in a TCR signaling dependent process, in the presence of IL-2 (Chen, *et al* 2003, Fantini, *et al* 2004). Addition of TGF- β can contribute to this process, however, in the simultaneous presence of the inflammatory cytokine IL-6 (and activation of the IL-6/JAK-STAT pathway), cells are induced to differentiate into pro-inflammatory TH17 cells (Harrington, *et al* 2005). In the presence of all-trans Retinoic acid (atRA), the conversion into TH17 cells is inhibited, in favor of generation of iTregs (Elias, *et al* 2008, Gao, *et al* 2012, Mucida, *et al* 2007, Zhou, *et al* 2010). Although widely explored, the mechanisms leading to the induction of iTregs are not fully understood.

Adenosina e Tregs: Adenosine and Tregs: Like the IL-6/JAK-STAT, other pathways may act adversely in the generation of Tregs, such as the AKT-mTOR pathway, whose exacerbated activation prevents differentiation of iTregs (Haxhinasto, *et al* 2008) and the use of rapamycin, an immunosuppressive drug that inhibits the mTOR pathway, promotes the expansion of Treg in mice and humans, inhibiting the expansion of effector T cells (Battaglia, *et al* 2012, Kopf, *et al* 2007). The generation of Tregs can also be obtained by co-cultivation of T cells with mesenchymal stem cells - MSC (Maccario, *et al* 2005, Prevosto, *et al* 2007) and, recent microarray studies performed by our group revealed that elements of the AKT-mTOR pathway were expressed at lower levels in T lymphocytes co-cultured with MSCs, as compared to those cultured alone (Saldanha-Araujo, *et al* 2012). These studies led us to identify a new immunoregulatory mechanism of MSC (Saldanha-Araujo, *et al* 2011, Saldanha-Araujo and Panepucci 2011), mediated by increased expression of CD39 by MSCs and the consequent increase in the production of adenosine (ADO), a well known immunosuppressive endogenous nucleotide acting on effector T cells (Sitkovsky and Lukashev 2005). The immunoregulatory effect exerted by ADO signaling is mediated through P1 receptors (A1, A2a, A2b, A3) (Thiel, *et al*

2003) and studies in mice indicated that the A2a receptor would be the dominant receptor mediating lymphocyte responses to ADO, preventing TCR activation and the proliferation of effector T cells, inhibiting the development of Th1, Th2 and Th17 effector cells (Hasko, *et al* 2008), with the reduction of IL-6 expression and increased TGF-beta expression, and inducing the generation of Treg cells (Zarek, *et al* 2008). Furthermore, antagonists of these receptors inhibit the differentiation of Treg without suppressing the activation of effector T cells (Nakatsukasa, *et al* 2011). In contrast, other studies indicate that activation of A2b receptors induce the production of Treg cells (Ehrentraut, *et al* 2012). Despite the accumulation of evidence on the role of ADO signaling in the generation of Treg cells in mice, the role of P1 adenosine receptors in human Tregs is not well defined.

NF- κ B and Tregs: Another crucial issue in the understanding of Treg generation involves the study of the transcriptional regulation triggered by lymphocyte activation, mediated by downstream signals derived from the TCR and its co-receptors, including CD28 (Deenick, *et al* 2010)(Horwitz *et al*, 2008). These signals lead to the activation of the NF- κ B (nuclear factor kappa B) (Deenick, *et al* 2010, Ghosh and Hayden 2008), implicating this pathway in the generation of Tregs. This pathway is mediated by protein complexes of the NF- κ B family that act as transcriptional factors such as RelA (p65), RelB, c-Rel, NF- κ B1 (p50 and its precursor p105), and NF- κ B2 (p52 and its precursor p100) (Hayden 2004). Several studies show that activation of the pathway, drives c-Rel containing NF- κ B complexes to the Foxp3 gene promoter, which is important for the generation and differentiation of Tregs in the thymus (Amarnath 2013, Benoist and Mathis 2012, Ruan and Chen 2012, Visekruna, *et al* 2010). Moreover, c-Rel would act as the first transcription factor that, directly or indirectly, induces and/or facilitates transcription of FoxP3 gene and the production of cytokines such as IL-2 (Hori 2010, Lio and Hsieh 2011, Ruan and Chen 2012). Despite the evidence demonstrating the importance of NF- κ B pathway in the generation of Treg cells, the fact that c-Rel is not apparently needed for iTreg generation in the periphery, argues in favor of distinct roles of this factor in the generation of Treg in the thymus and periphery (Visekruna, *et al* 2010). Given the lack of comprehensive and systematic studies on the roles mediated by the different NF- κ B subunits and pathways, it becomes clear the need for studies that could provide direct evidence on the role of these factors in the transcriptional regulation that occurs during the process of Treg induction.

microRNAs and Tregs: In addition to the mechanisms of transcriptional regulation, mediated by transcription factors such as NF- κ B and FoxP3, post-transcriptional regulatory mechanisms may also play a relevant role in the process of Treg generation. In this sense, microRNAs (miRNAs or miRs) have received great attention in recent years. MicroRNAs are a class of small non-coding RNAs that regulate gene expression post-transcriptionally by degrading or inhibiting the translation of its mRNA targets (Bartel, 2004). Hundreds of human miRNAs have been identified and many of them are involved in a variety of physiological responses including development, differentiation and homeostasis (Williams, 2008). miRNAs expression profiling studies in the literature, have demonstrated that nTregs generated in the thymus differ from the conventional CD4+ T-cells. However, similarities are observed between Tregs and activated CD4+ T-cells, suggesting that Tregs have a partial activation state and,

aditionally, that FoxP3 would contribute only in part, directly or indirectly, to the control of miRNAs expression on Tregs (Cobb *et al*, 2006).

Goals

To functionally assess the specific roles of different regulatory mechanisms during the process of induction and in vitro generation of regulatory T-lymphocytes, including: the transcriptional regulation mediated by different NF- κ B subunits (RelA, RelB, cRel, NFKB1 and NFKB2); the post-transcriptional regulation mediated by different miRNAs identified in our previous studies; and adenosine signaling through its receptors.

Specific Goals

1) Functional Assessment of the microRNA Roles During the Generation of Induced Regulatory T cells (iTregs)

Synthetic RNA molecules capable of mimicking microRNAs, as well as inhibitor molecules complementary to these microRNAs, will be used. Naive CD4 cells from umbilical cord blood - SCU will be transfected with these molecules and they will be induced to generate iTregs. The populations will be evaluated immunophenotypically for the generation of iTregs, as well as Th17 cells (using as reference for comparisons, the population of cells obtained after transfection with appropriate control molecules). Additionally, target transcripts of transfected miRNA will be validated by real-time PCR. For this, we will:

- a. Generate iTregs from naive CD4 + T cells, transfected with synthetic RNA molecules (selected mimics or microRNA inhibitors), through TCR activation in the presence of IL-2 and in the presence or absence of TGF- β and aTRA;*
- b. Immunophenotypically characterize the populations generated in the different treatments, by flow cytometry (evaluating Tregs and TH17 markers);*
- c. Functionally evaluate the generated population, for their ability to suppress the proliferation of T lymphocytes by flow cytometric assays using CFSE;*
- d. Validate microRNA target transcripts, previously identified, by the transfection with synthetic RNA molecules (miRNA mimics or inhibitors), followed by Real Time PCR transcript evaluation.*

2) Role of the Distinct NF- κ B Signaling Pathways During the in vitro Generation of Treg and Th17 Lymphocytes from CD4 T lymphocytes Naive of Umbilical Cord Blood

The role of different NF- κ B subunits (RelA, RelB, cRel, NFKB1 and NFKB2) will be functionally evaluated using specific siRNAs, during the in vitro generation of Treg and Th17 cells. To do so, a

global characterization of the modulated transcripts (using microarrays) after knockdown of the various subunits will be carried. In parallel, gene promoters directly bound by the different NF- κ B subunits will be identified by Chromatin Immunoprecipitation (ChIP-chip). For this, we will:

- a. Evaluate the effect of siRNAs against different subunits of NF- κ B (RelA, RelB, Crel, NF κ B2 and NF κ B1), during the *in vitro* generation of Treg and Th17 cells from naive T lymphocytes; based on the immunophenotypic characterization of generated populations (looking at TH17 and Treg markers by flow cytometry);
- b. In the case subunits with identified roles in the preliminary tests, globally assess the transcriptional changes resulting from the use of the corresponding siRNA, during the *in vitro* generation of Treg and Th17 cells, using microarrays;
- c. Globally assess promoter occupancy, by the NF- κ B subunits with identified roles in the preliminary tests during the *in vitro* generation of Treg and Th17 cells from naive T lymphocytes; based on the chromatin immunoprecipitation technique (ChIP), coupled to hybridization to promoter microarrays (ChIP-chip), or using next-generation sequencing (ChIP-seq);
- d. Integrate data using bioinformatics tools and specific databases to identify transcriptional targets (both, positively or negatively regulated) of the different NF- κ B sub-units.

3) Signaling role of adenosine in the generation of regulatory T cells from naive T cells

The participation of different adenosine receptors in the generation of induced regulatory T cells (iTreg) will be evaluated using agonists and antagonists. For this, we will:

- a. Generate iTregs from isolated CD4 + naive (CD45RA +) cells from umbilical cord blood, through the activation by anti-CD2 antibodies, anti-CD28 and anti-CD3 in the presence of IL-2, TGF-beta and aTreg and combinations of agonists and antagonists of ADO receptors;
- b. Immunophenotypically characterize the populations generated in the different treatments, by flow cytometry (evaluating Tregs and TH17 markers);
- c. Functionally evaluate the generated population, for their ability to suppress the proliferation of T lymphocytes by flow cytometric assays using CFSE;
- d. Analyze, by Real Time PCR and microarrays, the molecular pathways affected during the induction of naive T cells into Tregs

4) In vivo assays of Treg cells obtained by selected approaches

Once the regulatory mechanisms relevant to the optimization of the *in vitro* generation of lymphocytes iTreg are identified, the generated populations will be tested *in vivo*, using animal models.

- a. Establishment of an animal model for *in vivo* functional testing of Treg cells;
- b. Functional evaluation of the iTregs generated by different approaches (on the basis of the results from studies 1, 2 and 3);

Implementation schedule

Goals	1° Year	2° Year	3° Year	4° Year	5° Year	6° Year
Sub-item a (1, 2, 3)						
Sub-item b (1, 2, 3)						
Sub-item c (1, 2, 3)						
Sub-item d (1, 2, 3)						
Sub-item a (4)						
Sub-item b (4)						
Publications			3			3
PhD Thesis			3			3

Researchers

Amélia Góes Araújo

Josiane Lilian dos Santos Schiavinato

Vitor Leão

Helder Teixeira de Freitas

Rodrigo Alexandre Panepucci

Associated Researchers

Prof. Dimas Tadeu Covas

References

Amarnath, S. (2013) c-Rel in GVHD biology: a missing link. *Eur J Immunol*, **43**, 2255-2258.

Battaglia, M., et al. (2012) Expanding human T regulatory cells with the mTOR-inhibitor rapamycin. *Methods Mol Biol*, **821**, 279-293.

Benoist, C. & Mathis, D. (2012) Treg cells, life history, and diversity. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **4**, a007021.

Chen, W., et al. (2003) Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med*, **198**, 1875-1886.

Deenick, E.K., et al. (2010) c-Rel but not NF-kappaB1 is important for T regulatory cell development. *Eur J Immunol*, **40**, 677-681.

Ehrentraut, H., et al. (2012) Adora2b adenosine receptor engagement enhances regulatory T cell abundance during endotoxin-induced pulmonary inflammation. *PLoS One*, **7**, e32416.

Elias, K.M., et al. (2008) Retinoic acid inhibits Th17 polarization and enhances FoxP3 expression through a Stat-3/Stat-5 independent signaling pathway. *Blood*, **111**, 1013-1020.

Fantini, M.C., et al. (2004) Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *J Immunol*, **172**, 5149-5153.

Gao, Z., et al. (2012) Synergy between IL-6 and TGF-beta signaling promotes FOXP3 degradation. *Int J Clin Exp Pathol*, **5**, 626-633.

Ghosh, S. & Hayden, M.S. (2008) New regulators of NF-kappaB in inflammation. *Nat Rev Immunol*, **8**, 837-848.

Harrington, L.E., et al. (2005) Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol*, **6**, 1123-1132.

Hasko, G., et al. (2008) Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nat Rev Drug Discov*, **7**, 759-770.

Haxhinasto, S., et al. (2008) The AKT-mTOR axis regulates de novo differentiation of CD4+Foxp3+ cells. *J Exp Med*, **205**, 565-574.

Hayden, M.S. (2004) Signaling to NF- B. *Genes & Development*, **18**, 2195-2224.

Hori, S. (2010) c-Rel: a pioneer in directing regulatory T-cell lineage commitment? *Eur J Immunol*, **40**, 664-667.

Kopf, H., et al. (2007) Rapamycin inhibits differentiation of Th17 cells and promotes generation of FoxP3+ T regulatory cells. *Int Immunopharmacol*, **7**, 1819-1824.

Lio, C.W. & Hsieh, C.S. (2011) Becoming self-aware: the thymic education of regulatory T cells. *Curr Opin Immunol*, **23**, 213-219.

Maccario, R., et al. (2005) Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4+ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. *Haematologica*, **90**, 516-525.

Mucida, D., et al. (2007) Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science*, **317**, 256-260.

Nakatsukasa, H., et al. (2011) Adenosine A2B receptor antagonist suppresses differentiation to regulatory T cells without suppressing activation of T cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **409**, 114-119.

Prevosto, C., et al. (2007) Generation of CD4+ or CD8+ regulatory T cells upon mesenchymal stem cell-lymphocyte interaction. *Haematologica*, **92**, 881-888.

- Ruan, Q. & Chen, Y.H. (2012) Nuclear factor-kappaB in immunity and inflammation: the Treg and Th17 connection. *Adv Exp Med Biol*, **946**, 207-221.
- Saldanha-Araujo, F., et al. (2011) Mesenchymal stromal cells up-regulate CD39 and increase adenosine production to suppress activated T-lymphocytes. *Stem Cell Res*, **7**, 66-74.
- Saldanha-Araujo, F., et al. (2012) Mesenchymal stem cells promote the sustained expression of CD69 on activated T lymphocytes: roles of canonical and non-canonical NF-kappaB signalling. *J Cell Mol Med*, **16**, 1232-1244.
- Saldanha-Araujo, F. & Panepucci, R.A. (2011) CD39 expression in mesenchymal stromal cells. *J Immunother*, **34**, 568.
- Sitkovsky, M. & Lukashov, D. (2005) Regulation of immune cells by local-tissue oxygen tension: HIF1 alpha and adenosine receptors. *Nat Rev Immunol*, **5**, 712-721.
- Thiel, M., et al. (2003) The critical role of adenosine A2A receptors in downregulation of inflammation and immunity in the pathogenesis of infectious diseases. *Microbes Infect*, **5**, 515-526.
- Visekruna, A., et al. (2010) c-Rel is crucial for the induction of Foxp3(+) regulatory CD4(+) T cells but not T(H)17 cells. *Eur J Immunol*, **40**, 671-676.
- Zarek, P.E., et al. (2008) A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells. *Blood*, **111**, 251-259.
- Zhou, X., et al. (2010) Cutting edge: all-trans retinoic acid sustains the stability and function of natural regulatory T cells in an inflammatory milieu. *J Immunol*, **185**, 2675-2679.

Subprojeto 9: Estudo de Mecanismos Regulatórios Envolvidos no Processo de Geração in-vitro de Células T Regulatórias Induzidas (iTreg) a partir de Células T Naive

Pesquisador Responsável: Marco Antonio Zago

Introdução

Linfócitos T regulatórios (Tregs): Os linfócitos T regulatórios (Tregs) atuam de maneira fundamental no controle periférico da homeostase do sistema imune, estando envolvidas no controle de doenças autoimunes, na tolerância de transplantes, assim como, no escape imune de tumores (Sakaguchi, 2004; Shevach, 2000; Maloy & Powrie, 2001). O papel regulatório das Tregs confere a estas células um enorme potencial terapêutico, uma vez que sua administração poderia beneficiar pacientes com doenças autoimunes ou submetidos a transplantes e, por outro lado, a inibição de sua geração ou função poderia beneficiar pacientes portadores de tumores, permitindo a atuação do sistema imune contra as células tumorais (Riley *et al*, 2009). Assim, o entendimento dos processos responsáveis pela geração destas células, poderia contribuir para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas em ambos os sentidos. As iTregs podem ser geradas in vitro a partir de células T CD4+ Naive ativadas, num processo dependente da sinalização pela via TCR, e da presença de IL-2 (Chen, *et al* 2003, Fantini, *et al* 2004). A adição de TGF- β pode favorecer este processo, no entanto, na presença adicional da citocina inflamatória IL-6, e ativação da via IL-6/JAK-STAT, as células são induzidas a se diferenciarem em células pró-inflamatórias TH17 (Harrington, *et al* 2005). A conversão em células TH17 é inibida, em favor da geração de iTregs, na presença do Acido all-trans Retinóico (atRA) Th17 (Gao, *et al* 2012, Zhou, *et al* 2010) (Elias, *et al* 2008, Mucida, *et al* 2007). Apesar de largamente explorados, os mecanismos que levam à indução de células T em iTregs ainda não são totalmente conhecidos.

Adenosina e Tregs: Assim como a via IL-6/JAK-STAT, outras vias podem atuar de forma desfavorável à geração dos linfócitos Treg, como é o caso da via AKT-mTOR, cuja ativação exacerbada previne a diferenciação de iTregs (Haxhinasto, *et al* 2008) e o uso da rapamicina, uma droga imunossupressora inibidora da via mTOR, promove a expansão das Tregs de camundongos e humanos inibindo a expansão conjunta de células T efectoras (Battaglia, *et al* 2012, Kopf, *et al* 2007). A geração de Tregs também pode ser obtida através do co-cultivo de células T com células-tronco mesenquimais - CTM (Maccario, *et al* 2005, Prevosto, *et al* 2007) e, recentemente, estudos de *microarray* realizados por nosso grupo revelaram que elementos da via AKT-mTOR estavam menos expressos em linfócitos T co-cultivados com MSCs, quando comparados àqueles não co-cultivados (Saldanha-Araujo, *et al* 2012). Estes estudos nos levaram a identificar um novo mecanismo de imunoregulação das CTM (Saldanha-Araujo, *et al* 2011, Saldanha-Araujo and Panepucci 2011), mediado pelo aumento da expressão de CD39 pelas CTMs e o consequente aumento na produção de adenosina (ADO), um nucleotídeo endógeno

conhecidamente imunossupressor das células T efectoras (Sitkovsky and Lukashev 2005). O efeito imunorregulatório exercido pela ADO ocorre pela sinalização dessa molécula nos seus receptores P1 (A_1 , A_{2a} , A_{2b} , A_3) (Thiel, *et al* 2003) e estudos em camundongos indicam que o receptor A_{2a} seria o receptor dominante na resposta dos linfócitos aos efeitos da ADO (Hasko, *et al* 2008), prevenindo a ativação de TCR e a proliferação das células T efectoras, além de inibir o desenvolvimento das células efectoras Th1 e Th2 e Th17 (Hasko, *et al* 2008), com a diminuição da expressão de IL-6 e aumento da expressão de TGF-beta, induzindo a geração de células Treg (Zarek, *et al* 2008). Por outro lado, agentes antagonistas destes receptores inibem a diferenciação de Tregs sem suprimir a ativação das células T efectoras (Nakatsukasa, *et al* 2011). Em contraste, outros estudos indicam que a ativação de receptores A_{2b} induziriam a produção de células Treg (Ehrentraut, *et al* 2012). Apesar do acúmulo de indícios sobre o papel da sinalização da ADO na geração dos linfócitos Treg de camundongos, o papel dos receptores P1 da adenosina nas Tregs humanas ainda não é totalmente conhecido.

NF- κ B e Tregs: Outra questão crucial no entendimento do processo de geração das células Treg, envolve o entendimento dos mecanismos de regulação transcricional desencadeados pela ativação dos linfócitos, que decorre dos sinais derivados de TCR e seus co-receptores (incluindo CD28), dado que a geração de células Treg é dependente destes sinais (Deenick, *et al* 2010)(Horwitz *et al*, 2008). Estes sinais levam à ativação da via NF- κ B (fator nuclear kappa B) (Deenick, *et al* 2010, Ghosh and Hayden 2008), implicando esta via na geração das Tregs. Esta via é mediada por complexos de proteínas da família NF- κ B que atuam como fatores transcricionais, tais como RelA (p65), RelB, c-Rel, NF- κ B1 (p50 e seu precursor p105) e NF- κ B2 (p52 e seu precursor p100) (Hayden 2004). Diversos estudos evidenciam que a ativação da via conduz complexos de NF- κ B contendo a subunidade c-Rel aos sítios promotores do gene Foxp3 em Tregs, sendo importante para a diferenciação e geração destas células no timo (Amarnath 2013, Benoist and Mathis 2012, Ruan and Chen 2012, Visekruna, *et al* 2010). Ainda, o c-Rel atuaria como o primeiro fator de transcrição que, direta ou indiretamente, induz e/ou facilita a transcrição do gene FoxP3 e a produção de citocinas como IL-2 (Hori 2010, Lio and Hsieh 2011, Ruan and Chen 2012). Apesar de muitos indícios demonstrando a importância da via NF- κ B na geração de linfócitos Treg, o fato de c-Rel não ser aparentemente necessário para a geração de células T regulatórias induzidas em regiões periféricas, argumenta para papéis distintos deste fator durante a geração de Treg no timo e na periferia (Visekruna, *et al* 2010). Tendo em vista a falta de informações abrangentes e sistemáticas sobre o papel da sinalização mediada pelas diferentes vias e subunidades de NF- κ B, fica evidente a necessidade de trabalhos que forneçam evidências diretas do papel destes fatores na regulação transcricional que ocorre durante o processo de indução de células Treg.

microRNAs e Tregs: Além dos mecanismos de regulação transcricional, mediado por fatores de transcrição como NF- κ B e FoxP3, mecanismos de regulação pós-transcricional também podem ter papel relevante durante o processo de geração dos linfócitos Treg. Neste contexto, os microRNAs (miRNAs ou miRs), têm recebido grande atenção nos últimos anos. Os microRNAs são uma classe de pequenos RNAs não codificantes que regulam a expressão gênica de maneira pós-transcricional através da degradação ou inibição da tradução de RNAs mensageiros alvos (Bartel, 2004). Centenas de miRNAs humanos foram identificados e muitos deles estão envolvidos em uma variedade de respostas fisiológicas incluindo desenvolvimento,

diferenciação e homeostase (Williams, 2008). Trabalhos da literatura, demonstraram que o perfil de expressão de miRNAs das nTregs é diferente das células T CD4+ convencionais. Porém, similaridades são observadas entre as Tregs e as células T CD4+ ativadas, sugerindo que as Tregs possuem um estado parcial de ativação e; adicionalmente, FoxP3 contribuiria apenas em parte, direta ou indiretamente, no controle da expressão de miRNAs das Tregs (Cobb *et al*, 2006).

Objetivo Geral:

Avaliar funcionalmente o papel específico de diferentes mecanismos de regulação durante o processo de indução e geração *in vitro* de linfócitos T regulatórios, incluindo: a regulação transcricional mediada pelas diferentes subunidades de NF- κ B (RelA, RelB, cRel, NF κ B1 e NF κ B2); a regulação pós-transcricional mediada por diferentes microRNAs identificados em nossos estudos anteriores; e o papel da sinalização por adenosina e seus receptores.

Metas:

1) Avaliação Funcional do Papel dos microRNAs Durante a Geração de Células T Regulatórias Induzidas (iTregs)

Utilizaremos moléculas sintéticas de RNA capazes de mimetizar os microRNAs mencionados, assim como moléculas complementares inibidoras destes microRNAs. Estas moléculas serão transfectadas nas células T CD4 Naives de SCU, antes das mesmas serem submetidas ao processo de geração das iTregs. As populações geradas (nas condições CD4_{TGF/atRA} e CD4_{Med}) serão avaliadas imunofenotipicamente, para avaliarmos a geração de iTregs, assim como de células TH17 (utilizando como referencia para as comparações, a população de células obtida após a transfecção com moléculas controle adequadas). Ainda, transcritos alvos dos microRNAs transfectados, serão avaliados (por PCR em tempo real) nas diferentes condições (assim como na CD4_{Naive}), para validarmos a regulação de forma específica. Para isso, iremos:

- a. Gerar iTregs a partir de células T CD4+ naive, transfectadas com moléculas sintéticas de RNA (mimicas ou inibidoras de microRNA selecionados), pela ativação da via TCR na presença de IL-2, na presença ou ausência de TGF- β e atRA;*
- b. Caracterizar imunofenotipicamente as populações geradas nos diferentes tratamentos, por citometria de fluxo (avaliando marcadores de células T regulatórias e TH17);*
- c. Avaliar funcionalmente as populações geradas, quanto a sua capacidade de suprimir a proliferação de linfócitos T, por ensaios de citometria de fluxo utilizando CFSE;*

d. Validar a regulação dos transcritos alvos previamente identificados, pelos respectivos microRNAs; pela transfecção com moléculas sintéticas de RNA (mimicas ou inibidoras de microRNA), seguido de avaliações por PCR em Tempo Real.

2) Papel das Diferentes Vias de NF- κ B na Geração in vitro de Linfócitos Treg e Th17 a partir de Linfócitos CD4 T Naive de Sangue de Cordão Umbilical

Avaliaremos funcionalmente o papel das diferentes subunidades de NF- κ B (RelA, RelB, cRel, NFKB1 e NFKB2), utilizando siRNAs específicos, durante a geração in vitro de células Treg e Th17. Para isso, faremos uma caracterização global (utilizando microarrays) dos transcritos modulados após o knockdown das diferentes subunidades, associada à identificação dos promotores gênicos diretamente ligados às diferentes subunidades de NF- κ B (por meio da técnica de CHIP). Para isso, iremos:

- a. Avaliar o efeito da introdução de siRNAs contra as diferentes subunidades de NF- κ B (RelA, RelB, cRel, NFKB1 e NFKB2), na geração in vitro de células Treg e Th17, a partir de linfócitos T Naive. Realizando para isso, a caracterização imunofenotípica das populações geradas, avaliando marcadores de células T regulatórias e TH17, por citometria de fluxo.
- b. No caso das subunidades com papel identificado nos ensaios preliminares, avaliar globalmente as alterações transcricionais decorrentes do uso do siRNA, durante a geração in vitro de células Treg e Th17. Utilizando microarrays.
- c. Avaliar a ocupação global de promotores, pelas subunidades de NF- κ B com papel identificado nos ensaios preliminares, durante a geração in vitro de células Treg e Th17, a partir de linfócitos T Naive. Utilizando a técnica de imunoprecipitação de cromatina (ChIP), atrelada à hibridação em microarrays com sequências promotoras (ChIP-chip), ou utilizando sequenciamento de próxima geração (ChIP-seq);
- d. Integrar os dados utilizando ferramentas bioinformáticas e bases de dados específicas de forma a identificar potenciais alvos de regulação, tanto positiva como negativa, das diferentes sub-unidades de NF- κ B.

3) Mecanismos de geração de células T regulatórias a partir de células T naive: papel da sinalização da adenosina

Avaliaremos a participação dos diferentes receptores de adenosina na indução e geração de células T regulatórias (iTreg), utilizando agonistas e antagonistas. Para isso, iremos

- a. Gerar iTregs a partir de células T CD4+ naive (CD45RA+), isoladas de sangue de cordão umbilical, através da ativação por anticorpos anti-CD28, anti-CD2 e anti-CD3, na presença de IL-2 e combinações de agonistas e antagonistas de receptores de ADO, TGF- β e atRA;
- b. Caracterizar imunofenotipicamente as populações geradas, por citometria de fluxo;
- c. Avaliar funcionalmente as populações geradas quanto a sua capacidade de suprimir a proliferação de linfócitos T, em ensaios utilizando CFSE;
- d. Analisar, por PCR em tempo real e, eventualmente, microarray, vias moleculares relacionadas com a indução de células T naive em Tregs

4) Ensaios in vivo de linfócitos Treg obtidos por abordagens selecionadas

Uma vez identificados os mecanismos regulatórios pertinentes à otimização do processo de geração in vitro de linfócitos iTreg, as populações geradas serão testadas in vivo, por meio de modelos animais.

a. Estabelecimento do modelo in vivo para teste funcional de linfócitos Treg;

b. Avaliação funcional das diferentes das iTregs geradas por diferentes abordagens, estabelecidas com base nos resultados dos estudos anteriores (1, 2 e 3);

Cronograma:

Metas	1º Ano	2º Ano	3º Ano	4º Ano	5º Ano	6º Ano
Sub-item a (1, 2, 3)						
Sub-item b (1, 2, 3)						
Sub-item c (1, 2, 3)						
Sub-item d (1, 2, 3)						
Sub-item a (4)						
Sub-item b (4)						
Publicações			3			3
Defesas de Doutorado			3			3

Equipe:

Amélia Góes Araújo

Helder Teixeira de Freitas

Josiane Lilian dos Santos Schiavinato

Vitor Leão

Colaboradores:

Prof. Dimas Tadeu Covas

Referencias:

- Amarnath, S. (2013) c-Rel in GVHD biology: a missing link. *Eur J Immunol*, **43**, 2255-2258.
- Battaglia, M., et al. (2012) Expanding human T regulatory cells with the mTOR-inhibitor rapamycin. *Methods Mol Biol*, **821**, 279-293.
- Benoist, C. & Mathis, D. (2012) Treg cells, life history, and diversity. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **4**, a007021.
- Chen, W., et al. (2003) Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med*, **198**, 1875-1886.
- Deenick, E.K., et al. (2010) c-Rel but not NF-kappaB1 is important for T regulatory cell development. *Eur J Immunol*, **40**, 677-681.
- Ehrentraut, H., et al. (2012) Adora2b adenosine receptor engagement enhances regulatory T cell abundance during endotoxin-induced pulmonary inflammation. *PLoS One*, **7**, e32416.
- Elias, K.M., et al. (2008) Retinoic acid inhibits Th17 polarization and enhances FoxP3 expression through a Stat-3/Stat-5 independent signaling pathway. *Blood*, **111**, 1013-1020.
- Fantini, M.C., et al. (2004) Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *J Immunol*, **172**, 5149-5153.
- Gao, Z., et al. (2012) Synergy between IL-6 and TGF-beta signaling promotes FOXP3 degradation. *Int J Clin Exp Pathol*, **5**, 626-633.
- Ghosh, S. & Hayden, M.S. (2008) New regulators of NF-kappaB in inflammation. *Nat Rev Immunol*, **8**, 837-848.
- Harrington, L.E., et al. (2005) Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol*, **6**, 1123-1132.
- Hasko, G., et al. (2008) Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nat Rev Drug Discov*, **7**, 759-770.
- Haxhinasto, S., et al. (2008) The AKT-mTOR axis regulates de novo differentiation of CD4+Foxp3+ cells. *J Exp Med*, **205**, 565-574.
- Hayden, M.S. (2004) Signaling to NF- B. *Genes & Development*, **18**, 2195-2224.
- Hori, S. (2010) c-Rel: a pioneer in directing regulatory T-cell lineage commitment? *Eur J Immunol*, **40**, 664-667.
- Kopf, H., et al. (2007) Rapamycin inhibits differentiation of Th17 cells and promotes generation of FoxP3+ T regulatory cells. *Int Immunopharmacol*, **7**, 1819-1824.
- Lio, C.W. & Hsieh, C.S. (2011) Becoming self-aware: the thymic education of regulatory T cells. *Curr Opin Immunol*, **23**, 213-219.

- Maccario, R., et al. (2005) Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4+ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. *Haematologica*, **90**, 516-525.
- Mucida, D., et al. (2007) Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science*, **317**, 256-260.
- Nakatsukasa, H., et al. (2011) Adenosine A2B receptor antagonist suppresses differentiation to regulatory T cells without suppressing activation of T cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **409**, 114-119.
- Prevosto, C., et al. (2007) Generation of CD4+ or CD8+ regulatory T cells upon mesenchymal stem cell-lymphocyte interaction. *Haematologica*, **92**, 881-888.
- Ruan, Q. & Chen, Y.H. (2012) Nuclear factor-kappaB in immunity and inflammation: the Treg and Th17 connection. *Adv Exp Med Biol*, **946**, 207-221.
- Saldanha-Araujo, F., et al. (2011) Mesenchymal stromal cells up-regulate CD39 and increase adenosine production to suppress activated T-lymphocytes. *Stem Cell Res*, **7**, 66-74.
- Saldanha-Araujo, F., et al. (2012) Mesenchymal stem cells promote the sustained expression of CD69 on activated T lymphocytes: roles of canonical and non-canonical NF-kappaB signalling. *J Cell Mol Med*, **16**, 1232-1244.
- Saldanha-Araujo, F. & Panepucci, R.A. (2011) CD39 expression in mesenchymal stromal cells. *J Immunother*, **34**, 568.
- Sitkovsky, M. & Lukashev, D. (2005) Regulation of immune cells by local-tissue oxygen tension: HIF1 alpha and adenosine receptors. *Nat Rev Immunol*, **5**, 712-721.
- Thiel, M., et al. (2003) The critical role of adenosine A2A receptors in downregulation of inflammation and immunity in the pathogenesis of infectious diseases. *Microbes Infect*, **5**, 515-526.
- Visekruna, A., et al. (2010) c-Rel is crucial for the induction of Foxp3(+) regulatory CD4(+) T cells but not T(H)17 cells. *Eur J Immunol*, **40**, 671-676.
- Zarek, P.E., et al. (2008) A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells. *Blood*, **111**, 251-259.
- Zhou, X., et al. (2010) Cutting edge: all-trans retinoic acid sustains the stability and function of natural regulatory T cells in an inflammatory milieu. *J Immunol*, **185**, 2675-2679.