

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

Jürgen Pahla

**Nelja immuunsünapsi molekuli (CTLA-4, CD28, CD80, CD86)  
ekspressiooni ja funktsiooni analüüs**

Magistritöö

Juhendaja MD Kalle Kisand

Kaasjuhendaja PhD Sulev Ingerpuu

Kaitsmisele lubatud

Juhendajate .....

*allkirjad, kuupäev*

TARTU 2015

# SISUKORD

LÜHENDID.....	4
SISSEJUHATUS.....	6
KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1. Immuunsünaps.....	7
1.1 T-raku immuunsünaps.....	7
1.2 T-raku aktivatsioon.....	10
2. Immunoloogiline tolerantsus.....	11
2.1 Tsentraalne T-lümfotsüüdi tolerantsus.....	11
2.2 Perifeerne T-lümfotsüüdi tolerantsus.....	12
3. Tsütotoksilise T-lümfotsüüdi antigeen 4 (CTLA-4).....	13
3.1 flCTLA-4 funktsioon.....	14
3.2 flCTLA-4 splaissvariandid.....	17
4. T-raku pinnaspetsiifiline glükoproteiin CD28.....	19
4.1 CD28 funktsioon.....	20
4.2 CD28 splaissvariandid.....	21
5. CD80 ja CD86 glükoproteiinid.....	23
5.1 CD80 ning CD86 molekulaargeneetika.....	23
5.2 CD80 versus CD86.....	24
5.3 CD80 ja CD86 splaissvariandid.....	25
6. Immuunsünapsi molekulide roll diabeedi tekkes ja kulgemises.....	27
6.1 flCTLA-4.....	27
6.2 CD28, CD80 ja CD86.....	28
6.3 Anti-CLTA-4 ja CTLA4-Ig.....	29
TÖÖ EESMÄRGID.....	30
MATERJAL JA METOODIKA.....	31
7. Valim.....	31
8. Metoodika.....	31
8.1 Perifeersete mononukleaarsete vererakkude eraldamine.....	31

8.2 Külmutatud lümfotsüütide sulatamine ning alapopulatsioonidesse eristamine .....	32
8.3 RNA eraldamine ning pöördtranskribeerimine.....	33
8.4 Proovide amplifitseerimine.....	34
8.5 Statistika.....	36
TULEMUSED .....	37
9. Koduhoidjageenide ekspressiooni võrdlus ja valik .....	37
10. Geeniekspressiooni võrdlus PBMC segust ja Tempus™ tuubist eraldatud RNA's .....	38
11. Geeniekspressioon alapopulatsioonides .....	39
TULEMUSED JA ARUTELU.....	46
KOKKUVÕTE JA JÄRELDUSED .....	51
SUMMARY.....	52
TÄNUAVALDUSED.....	53
KASUTATUD KIRJANDUS.....	54
KASUTATUD RAAMATUD.....	69
KASUTATUD VEEBIAADRESSID.....	69

## LÜHENDID

Anti-CTLA-4 scFv	membraan-seoseline üheaahelaline anti-CTLA-4 (inglise k. <i>membrane-bound single-chain anti-CTLA-4 Fv</i> )
APC	antigeeni presenteeriv rakk (inglise k. <i>antigen presenting cell</i> )
Box-whiskers	karp-vurrud diagramm (inglise k. <i>box-whiskers diagram</i> )
BSA	veise seerum-albumiin (inglise k. <i>bovine serum albumine</i> )
cSMAC	tsentraalne supramolekulaarne aktivatsiooniklaster (inglise k. <i>central supramolecular activation cluster</i> )
CT	tsükli künnisväärtus (inglise k. <i>cycle threshold</i> )
CTLA-4	tsütotoksilise T-lümfotsüüdi antigeen 4 (inglise k. <i>cytotoxic T-lymphocyte antigen 4</i> )
FBS	veise loote seerum (inglise k. <i>fetal bovine serum</i> )
FDA	toidu- ja ravimitööstus (inglise k. <i>Food and Drug Administration</i> )
fiCTLA-4	täispikk (membraanseoseline) CTLA-4 isovorm (inglise k. <i>full length CTLA-4</i> )
IL-2	interleukiin 2 (inglise k. <i>interleukin 2</i> )
liCTLA-4	ligand-sõltumatu CTLA-4 isovorm (inglise k. <i>ligand-independent CTLA-4</i> )
MHC	koosobivuskompleks (inglise k. <i>major histocompatibility complex</i> )
MTOC	mikrotuubulite organiseerimistsenter (inglise k. <i>Microtubule organizing centre</i> )
NOD	normaalkaaluline diabeetiline hiir (inglise k. <i>non-obese diabetic mouse</i> )
PBMC	perifeersed mononukleaarsed vererakud (inglise k. <i>peripheral blood mononuclear cells</i> )
PBS	fosfaatsoolalahus (inglise k. <i>phosphate-buffered saline</i> )
RPMI-1640	rakusööde, mis on nime saanud Roswell Pargi mälestusinstituudi järgi (inglise k. <i>Roswell Park Memorial Institute medium</i> )
sCD80	lahustuv CD80 isovorm (inglise k. <i>soluble CD80</i> )

sCTLA-4	lahustuv CTLA-4 isovorm (inglise k. <i>soluble CTLA-4</i> )
SMAC	supramolekulaarne aktivatsiooniklaster (inglise k. <i>supramolecular activation cluster</i> )
SNP	ühenukleotiidne polümorfism (inglise k. <i>single nucleotide polymorphism</i> )
T1D	tüüp 1 diabeet (inglise k. <i>type 1 diabetes</i> )
Tc	tsütotoksiline T-rakk (inglise k. <i>cytotoxic T-cell</i> )
TCR	T-raku retseptor (inglise k. <i>T-cell receptor</i> )
Th	abistaja T-rakk (inglise k. <i>helper T-cell</i> )
Tkonv	konventsionaalne T-rakk (inglise k. <i>conventional T-cell</i> )
TLK	trombotsüütide ja leukotsüütide kiht (inglise k. <i>buffy coat</i> )
Treg	regulatoorne T-rakk (inglise k. <i>regulatory T-cell</i> )

## SISSEJUHATUS

Immunsünaps on adaptiivse immuunsüsteemi efektorrakkude vaheline kontaktstruktuur, mis võimaldab rakkudevahelist suhtlust ning vastastikust aktivatsiooni. Sünapsi ülimalt kontsentreerunud ülesehituses on asendamatu roll T-rakkude retseptoril (ingl *T-cell receptor*, TCR) ning antigeeni esitlevate rakkude (ingl *antigen presenting cell*, APC) pinnal ekspresseeruva koosobivuskompleksi antigeenil (ingl *major histocompatibility complex*, MHC). Erinevad MHC kompleksid ning varieeruva TCR repertuaari kujunemine võimaldavad mitmesuguste organismile võõraste antigeenide vastaste reaktsioonide tekkimist. Ent selliste katisemehhanismide liigse aktivatsiooni tagajärjel võivad tekkida organismi rakkude, kudede ning organite vastased autoreaktiivsed T-rakud, mille aktiveerumine põhjustab mitmeid raskeid autoimmuunhaigusi. Immuunsünapsi moodustavate rakkude staatus kujuneb mitmete retseptormolekulide ning ligandide seostumise kaudu: T-rakkude pinnamolekuli CD28 seostumine APC pinnal oleva CD80 või CD86 ligandiga põhjustab rakkude aktivatsiooni ning CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*, CTLA-4) seostumine samade ligandidega soodustab immuunsupressiooni. Immuunsünapsi molekulide regulatsiooni kaudu loodetakse mõjutada haiguste patogeneesi. CTLA-4 molekuli vastu saadud ja immuunreaktsiooni modelleerivad antikehad leiavad kasutust nii kasvaja ravis, aga ka neeru transplantatsioonil.

Käesolevas töös uuriti oluliste immuunsünapsi molekulide CTLA-4, CD28, CD80 ja nende splaissvariantide ning CD86 ekspressiooni ja funktsiooni tervete indiviidide valgetes vererakkudes. Töö käigus väljatöötatud eksperimentaalne skeem on aluseks nimetatud geenide ekspressiooni määramiseks diabeedihaigetel. Antud magistritöö teostati Tartu Ülikooli Bio- ja Siirdemeditsiini instituudis immunoloogia õppetoolis.

# KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1. Immuunsünaps

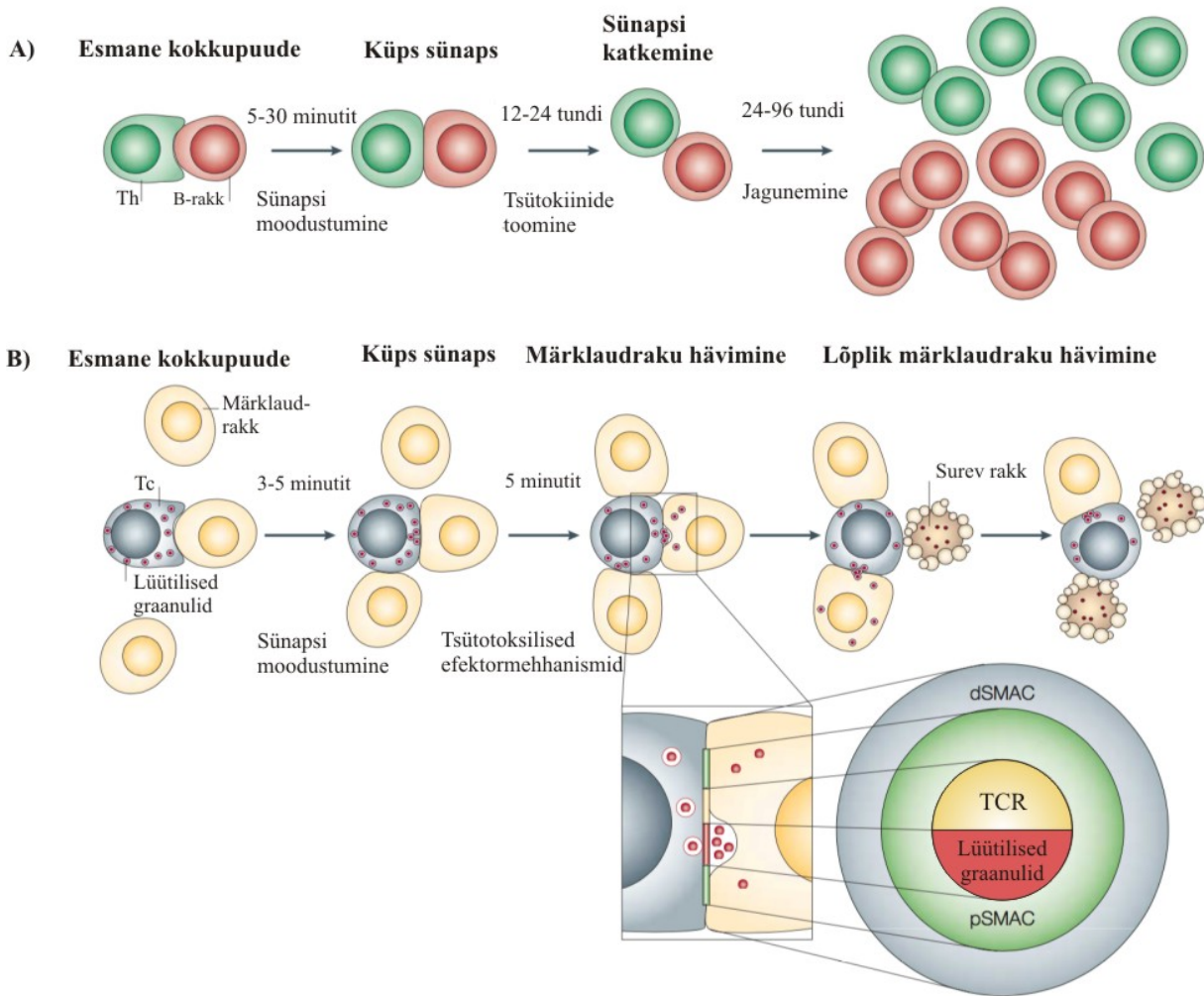
Adaptiivne immuunsüsteem aktiveerub T-raku ning APC interaktsiooni tagajärjel (Bromley jt., 2001). Tekkivat struktuuri nimetatakse immuunsünapsiks, mis koosneb adhesioonimolekulidega ümbritsetud TCR tsentraalsest klastrist (Grakoui, 1999). Sünapsi moodustumisel interakteeruvad T-raku pinnal olev TCR ja APC pinnal olev antigeeni presenteeriv MHC (Bromley jt., 2001). Sünapsi organiseeritus võimaldab rakkudevahelise kontakti märkimisväärset täpsust ning tundidesse ulatuvat kestvust. Samas aktiveerivate ja inhibeerivate molekulaarsete interaktsioonide toimumiseks kuluvad vaid sekundid (Mondino jt., 1996; Iezzi jt., 1998). Mõne minutiga moodustuvad keskse tähtsusega supramolekulaarsed aktivatsiooni klastrid (ingl *supramolecular activation clusters*, SMAC), mis koosnevad kõrge kontsentratsiooniga spetsiifilistest molekulidest (Mondino jt., 1996; Wülfing, 1998). Tsentraalse klastri (ingl *central supramolecular activation cluster*, cSMAC) retseptorid CD3, CD28, täispikk membraanseoseline CTLA-4 (*full length CTLA-4*, flCTLA-4) ning TCR on ülimalt olulised immuunsünapsi moodustamises ning adaptiivse immuunsüsteemi regulatsioonis (Huppa ja Davis, 2003).

### 1.1 T-raku immuunsünaps

Abistaja T-rakud (ingl *helper T-cell*, Th) säilitavad kontakti APC'ga 12-24 tunniks (joonis 1). Interaktsioon põhjustab intratsellulaarse kaltisumi kontsentratsiooni tõusu (Huppa ja Davis, 2003; Iezzi jt., 1998), mis mõjutab rakutsükli, apoptoosi, pinnaretseptorite ja tsütokiinide produktsiooni ning signaalmolekulide sünteesi reguleerivate geenide transkriptsiooni (Feske jt., 2001). Interleukiin 2'e (ingl *interleukin 2*, IL-2) sekretsioon suunatakse immuunsünapsi piirkonda, mis soodustab sünapsi rakkude kvantitatiivset kasvu ning diferentseerumist. Th raku jagunemine algab 24-48 tundi pärast sünapsi moodustumist, mille jooksul toimub kolm kuni neli jagunemist (Huppa ja Davis, 2003). Sünapsi katkemisel on oluline roll CTLA-4 molekulil, mille seostumine APC pinnal oleva CD80 või CD86 ligandiga inhibeerib TCR signaali (Egen ja Allison, 2002; Egen, Kuhns ja Allison 2002). Nimetatud regulaatormolekul paikneb antigeeni presenteeriva rakuga kontakteerunud T-raku ehk aktiveeruva T-raku endosomaalsetes

kompartimentides. Rakkudevaheline interaktsioon põhjustab intratsellulaarse flCTLA-4 transpordi immuunsünapsi piirkonda (Egen ja Allison, 2002).

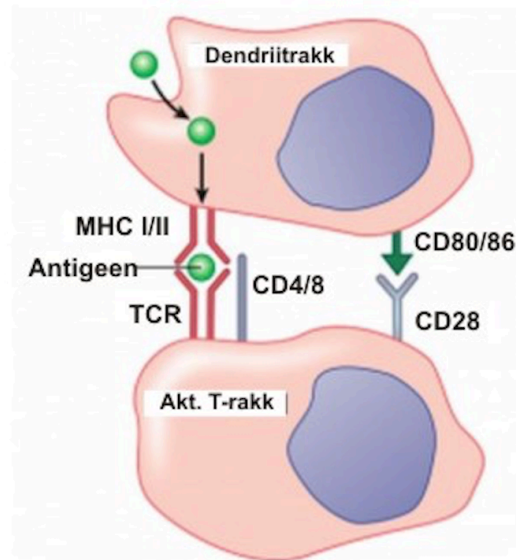
Võrreldes Th rakuga moodustab tsütotoksiline T-rakk (ingl *cytotoxic T-cell*, Tc) immuunsünapsi APC'ga kiiremini (joonis 1). Mehhanism, kuidas organismi võõr-antigeeni eest kaitstakse on Tc ja Th puhul erinev (Huppa ja Davis, 2003). Tc-APC kontakt soodustab tsütokiinide produktsiooni (Harty jt., 2000), kuid esmane eesmärk on tsütotoksiliste graanulite eksotsütoos. Graanulid kogunevad immuunsünapsi piirkonda mikrotuubulite organiseerimistsentri (ingl *microtubule organizing centre*, MTOC) lähedusse. Graanulid transporditakse APC tsütoplasmasse läbi TCR-vaba cSMAC piirkonna (joonis 1) (Stinchcombe jt., 2001). Märklaudraku lagunemiseks võib kuluda tunde, ent apoptoosi pöördumatuks initsiatsiooniks on tarvis vaid mõne minuti pikkust Tc-APC kontakti. Tc ja Th rakud on antigeeni suhtes äärmiselt tundlikud. Sellest tulenevalt piisab nende funktsiooni tagamiseks vaid mõnest stimulaatorsest MHC-peptiid kompleksi signaalist. Erinevalt Th rakkudest on Tc rakud tänu MTOC liikuvusele märklaudrakkude kontaktpunktide vahel (Kuhn ja Poenie, 2002) võimelised moodustama mitu sünapsi üheaegselt (McGavern jt., 2002).



**Joonis 1.** Th ja Tc rakkude immuunsünaps. A) Th rakud moodustavad sünapsi B-rakuga 5-30 minuti jooksul pärast esialgset kokkupuudet. Sünaps vajab pidevat TCR signaali ning säilib mitme tunni vältel, mille jooksul tsütokiinide produktsioon ning sekretsioon suureneb. Sünapsi katkemisel läbivad rakud mitu jagunemist. B) Tc rakud moodustavad märklaudrakuga lühiajalise sünapsi. Lüütilised graanulid transporditakse märklaudraku tsütoplasmasse läbi TCR-vaba cSMAC piirkonna. Graanulite eksotsütoos kestab mõne minuti ning märklaudraku lagunemine ligikaudu 20-30 minutit, mille jooksul rakud võivad säilitada nõrga kontakti. dSMAC, distaalne supramolekulaarne aktivatsiooniklaster; pSMAC, perifeerne supramolekulaarne aktivatsiooniklaster (kohandatud Huppa ja Davis, 2003 järgi).

## 1.2 T-raku aktivatsioon

Aktivatsiooni käivitab APC pinnal oleva MHC klass I'e või klass II'e kontakt TCR'ga (joonis 2). Interaktsiooni eesmärk on MHC'ga seotud peptiidse antigeeni presenteerime T-rakule. Sidet tugevdavad koretseptoorsete signaalmolekulide (CD4 või CD8) seostumine MHC-peptiid kompleksiga. Aktivatsiooniks vajaliku kostimulatoorse signaali annab Tc ja Th rakus ekspresseeruv CD28 retseptor, mis interakteerub APC pinnal leiduva CD80 või CD86 ligandiga (Linsley jt., 1991). Väidet toetavad *in vitro* (Lucas jt., 1995) ja *in vivo* (Vallejo, 2005) uuringud. Lisaks aktiveeriva signaali edastamisele määrab CD28 T-raku arengusuuna, juhivad reguleerivate T-rakkude küpsemist (ingl *regulatory T-cell*, Treg) (Guo jt., 2008) ning takistab anergia seisundi kujunemist (Kuklina, 2013). Organismi kaasasündinud immuunsüsteemi aktiivsus tagab CD80 ning CD86 ligandide rohkuse dendriitrakkude pinnal. Ilma loomupärase immuunsuseta kujuneb T-rakkude aktivatsiooni asemel T-rakkude tolerantsus (Miller jt., 2009).

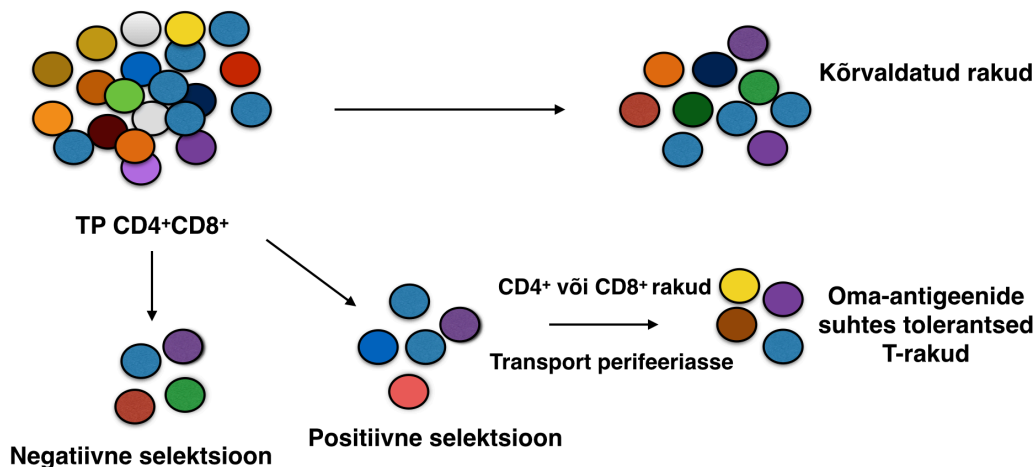


**Joonis 2.** T-raku aktivatsioon. Lihtsustatud illustratsioon dendriitraku ning aktiveeruva T-raku immuunsünapsist. T-raku aktivatsiooni esimeseks signaaliks on TCR ja MHC-peptiid kompleksi interaktsioon. Lisaks vajab aktivatsioon kostimulatoorset signaali, mille annab CD28 ning CD80/86 ligandide interaktsioon (kohandatud <http://www.cram.com/flashcards/fa-immunology-4663033> järgi).

## 2. Immunoloogiline tolerantsus

### 2.1 Tsentraalne T-lümfotsüüdi tolerantsus

Ulatuslik TCR'de repertuaar tagab immuunsüsteemi võime ära tunda mitmeid erinevaid patogeene, millega inimorganism kokku puutub. Tuumuses selekteeritakse valmivaid T-rakke ehk tümotsüüte läbi kahe kontrollmehhanismi. Positiivse selektsiooni käigus kõrvaldatakse suur hulk valmivaid rakke, millel puudub igasugune afiinsus tüumuses paiknevate antigeenide suhtes. Organismi omaste antigeenide vastaste immuunreaktsioonide vältimiseks presenteeritakse tüumuses paiknevate APC'de pinnal mitmeid organismile omaseid proteiine. T-rakud, mis seovad võõraid, aga ka organismile omaseid antigeene liiga tugevalt, hävitatakse negatiivse selektsiooni teel (joonis 3). Kirjeldatud mehhanism on oluline Tc ning Th lümfotsüütide tolerantsuse kujunemisel. Kõiki organismile omaste antigeenide vastaseid reaktiivseid T-rakke ei hävitata, vaid nendest moodustuvad Treg rakud, mis tüumusest väljudes inhibeerivad autoimmuunseid protsesse (Abbas ja Lichtman, 2005). Selektiooni edukalt läbinud rakud diferentseeruvad  $CD4^+$  ehk Th rakkudeks või  $CD8^+$  ehk Tc rakkudeks, mis migreeruvad perifeersetesse kudedesse (joonis 3) (Romagnani, 2006).



**Joonis 3.** Tsentraalse T-lümfotsüüdi tolerantsus. Antigeenide suhtes puuduva afiidsusega topeltpositiivsed (TP)  $CD4^+CD8^+$  T-rakud kõrvaldatakse. Negatiivsel selektsioonil eemaldatakse T-rakud, mis seovad antigeene liiga tugevalt. Positiivselt valitud rakud migreeruvad tüumuse medulla piirkonda, kus organismile omaseid antigeene tugevalt siduvad rakud suunatakse negatiivse selektsiooni kaudu apoptoosi. Selektiooni läbinud  $CD4^+$  või  $CD8^+$  rakud migreeruvad sekundaarsetesse lümfoidorganitesse ning moodustavad tervikliku, erinevaid MHC-peptiid komplekse äratundva T-raku repertuaari (Romagnani, 2006 järgi).

## 2.2 Perifeerne T-lümfotsüüdi tolerantsus

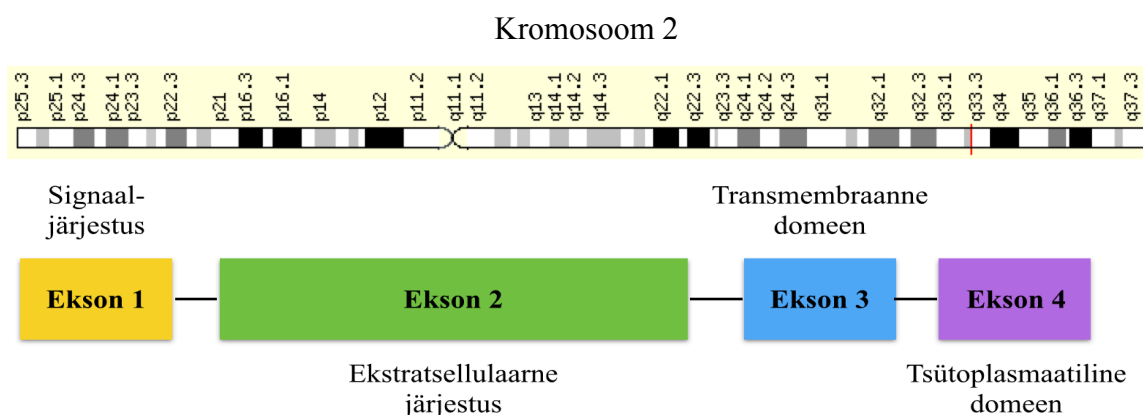
Perifeerne tolerantsus takistab organismile omaste antigeenide vastaseid immuunreaktsioone. Sama mehhanismi kaudu võidakse supresseerida immuunreaktsioon ka võõr-antigeeni vastu (Abbas ja Lichtman, 2005). Üheks perifeerse tolerantsuse mehhanismiks on anergia, mille käigus toimub TCR signaali vaigistamine ja IL-2 ekspressiooni pidurdamine (Xing ja Hogquist, 2012). Anergiat kirjeldasid esmalt *in vitro* süsteemis Th rakkude näitel Jenkins ja Schwartz 1980'tel. Nad leidsid, et T-rakkude jagunemine toimus aeglasemalt, juhul kui antigeeni presenteeriv rakk ei andnud kostimulatoorseid signaale (Jenkins & Schwartz, 1987). Anergia seisundi korral ei ole immuunsünapsi moodustanud T-rakud võimelised aktiveeruma. Seda kahel põhjusel:

- 1) Antigeen presenteeritakse APC poolt, mis ei anna piisavalt kostimulatoorseid signaale (Romagnani, 2006);
- 2) Immuunsünapsi moodustumisel seostub CD80/86 ligandiga immuunvastust supresseeriv fICTLA-4 retseptor, mis takistab T-raku aktivatsiooni (Romagnani, 2006).

Hoolimata tütümuse kaitsemehhanismidest tekivad erinevate T-raku retseptorite moodustumisel organismi oma rakke ning kudesid ohustavad reaktiivsed T-rakud (Walker ja Sansom, 2015). fICTLA-4 on peamine selliseid rakke kontrolliv molekul, mida leidub kõige rohkem Treg rakkudes (Takahashi jt., 2000; Read jt., 2000). fICTLA-4 vähesus Treg pinnal ei mõjuta raku arengut ega homöostaasi, samuti ei muutu rakud patogeenseks, vaid muutuvad anergiliseks ning on vähem supressiivsed võrreldes metsik-tüüpi rakkudega (Onishi jt., 2008). Treg rakud on asendamatul kohal immunoloogilise tolerantsuse reguleerimises ning inimorganismile kahjulike immuunreaktsioonide supresseerimises. Treg rakud moodustavad funktsionaalse T-rakkude alapopulatsiooni ning kujunevad tütümuse selektsiooni käigus või IL-2 toimel perifeersetest naiivsetest CD4<sup>+</sup> Th rakkudest (Sakaguchi jt., 2008; Laurence jt., 2007). Erinevalt tütümuses valmivatest naiivsetest Tc ja Th rakkudest, mis saavutavad funktsionaalsuse perifeerias, on Treg rakud tütümusest väljudes küpsed ehk võimelised autoimmuunsust supresseerima (Sakaguchi jt., 1982; Itoh jt., 1999). Treg pinnal oleva fICTLA-4 ja APC membraanil paikneva CD80 või CD86 interaktsioon pidurdab või isegi blokeerib viimaste raku pinnal avaldumist, mis takistab APC ja konventsionaalse T-raku (ingl *conventional T-cell*, Tkonv) vahelise immuunsünapsi moodustumist ning põhjustab immuunsupressiooni (Onishi jt., 2008).

### 3. Tsütotoksilise T-lümfotsüüdi antigeen 4 (CTLA-4)

*f*CTLA-4 avastati hiire tsütotoksilise T-raku cDNA raamatukogu skriinimisel, kirjeldati 223 aminohappe pikkusena ning määrati immuunoglobuliinide superperekonda (Brunet jt., 1987). Inimese *CTLA-4* geen paikneb 2q33 kromosomaalses regioonis (Linsley jt., 1992) ning koosneb 4<sup>st</sup> eksonist. Esimesed kaks kodeerivad molekuli ekstratsellulaarset osa, ekson 1 sisaldab liiderjärjestust ning ekson 2 ekstratsellulaarset järjestust; ekson 3 kodeerib transmembraanset regiooni ning ekson 4 valgu tsütoplasmaatilist saba (joonis 4) (Teft jt., 2006). Uuringud on näidanud *CTLA-4* lookuse seost tüüp 1 diabeedi (ingl *type 1 diabetes*, T1D) kujunemisega (Butty jt., 2007; Ueda jt., 2003).



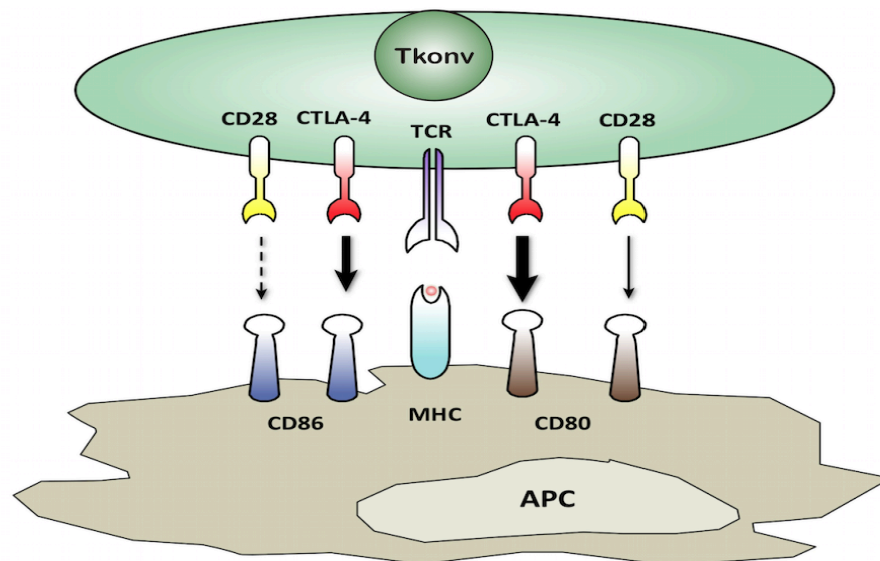
**Joonis 4.** *f*CTLA-4 geeni struktuur ja paiknemine kromosoomis. Geen pikkusega 6175 aluspaari asub 2. kromosoomi pikas õlas (asukoht 2q33) ning koosneb 4 eksonist. Joonisel toodud eksonite suurused on illustratiivsed ning ei peegelda tegelikku geeni struktuuri (aluseks Teft jt., 2006; <http://genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CTLA4&search=ctla4>).

*CTLA-4* geen ekspresseerub peamiselt T-rakkude aktivatsioonil, kuid geeni transkriptsiooni on tuvastatud ka CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg rakkudes (Lindsten jt., 1993), kus geen ekspresseerub konstitutiivselt ning on oluline immuunvastuse mahasurumises (Zheng jt., 2006; Schmidt jt., 2009; Wing jt., 2008; Miller jt., 2009). Mälu-T-rakkude tsütoplasmas leidub suur hulk *f*CTLA-4 molekule, mille raku pinnal avaldumine ja püsimine, võrreldes naiivsete aktiveeritud T-rakkudega, on kordades ulatuslikum ning pikemaajalisem (Jago jt., 2004). Mitmed uuringud näitavad *f*CTLA-4 ekspressiooni B-rakkudes, monotsüütides, granulotsüütides, CD34<sup>+</sup> tüvirakkudes, teatud fibroplastides, aga ka hiire embrüonaalsetes rakkudes ning embrüo kehas (Pioli jt., 2000; Pistillo jt., 2003; Kaufman jt., 1999; Wang, Giscombe jt., 2002; Ling jt., 1998).

fICTLA-4 mRNA on T-rakkudes detekteeritav tund pärast TCR-MHC-peptiid interaktsiooni ning jõuab haripunkti 24-36 tundi pärast stimulatsiooni (Lindsten jt., 1993; Harper jt., 1991; Perkins jt., 1996).

### 3.1 fICTLA-4 funktsioon

fICTLA-4 signaal takistab T-rakkudes IL-2'e sünteesi, pidurdab rakutsükli ja rakkude jagunemist. fICTLA-4 molekul seostub CD80/CD86 ligandiga tugevamalt kui CD28 (joonis 5) ning takistab CD28'l immuunvastuse esile kutsumist (Wing jt., 2011). T-raku retseptorite fICTLA-4 ning CD28 transport cSMAC piirkonda sõltub CD80 ligandi kontsentratsioonist. Immuunsünapsi moodustumisel algab fICTLA-4 transport cSMAC piirkonda enne CD28 transporti, kuna viimane vajab kõrgemat CD80 kontsentratsiooni (Yokosuka jt., 2010). Sellest tulenevalt kontrollib fICTLA-4 T-raku aktivatsiooni kostimulatoorse CD80 ligandi vähesuse korral (Wing jt., 2011). Lisaks leidsid Berg ja Zavazava, et fICTLA-4 ekspressioon T-rakkudes põhjustab CD28 internalisatsiooni ning degradatsiooni (Berg ja Zavazava, 2008).

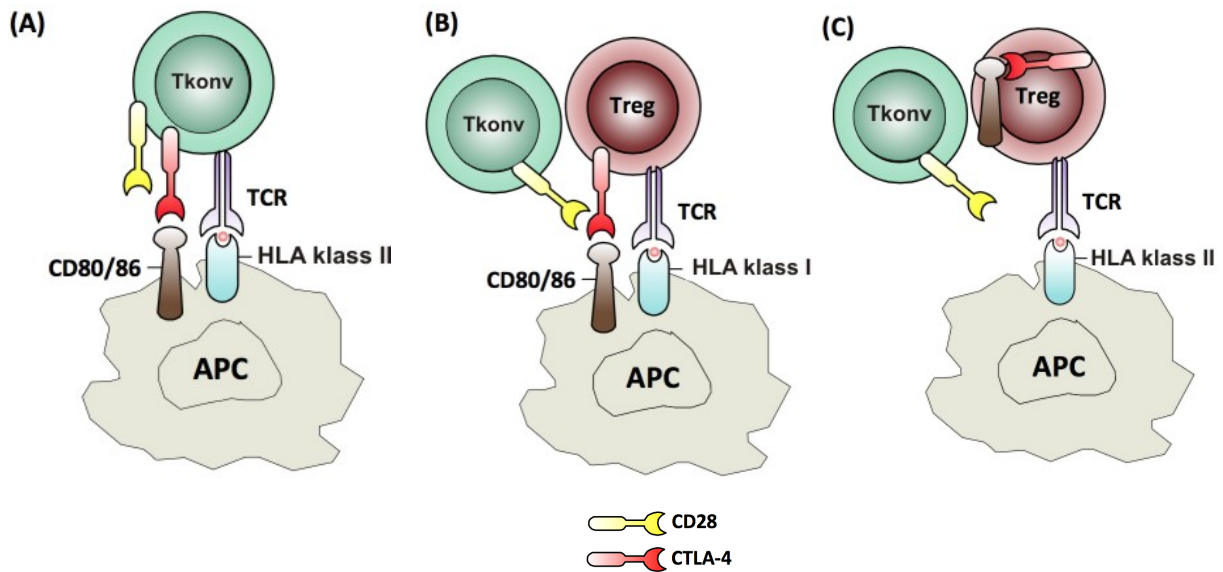


**Joonis 5.** Mõlemad T-raku retseptorid fICTLA-4 ning CD28 seostuvad APC pinnal olevate CD80 ja CD86 ligandidega. Jooned retseptorite ja ligandide vahel tähistavad interaktsiooni tugevust, kõige jämedam joon tähistab kõige tugevamat ning kõige peenem katkendlik joon tähistab kõige nõrgemat kontakti. Kuna mõlemad retseptorid interakteeruvad CD80 ning CD86 ligandidega tekib immuunsünapsis fICTLA-4 ning CD28 vaheline konkurents (kohandatud Walker ja Sansom, 2015 järgi).

Mitmed uuringud on seostanud *fiCTLA-4* inhibitoorset signaali erinevate molekulaarsete protsessidega (Walker ja Sansom, 2015). On leitud, et *fiCTLA-4* mõjutab CD3 $\zeta$  ahela fosforülatsiooni (Lee jt., 1998), teised jällegi ei leidnud sellist seost (Calvo jt., 1997). Schneider jt. näitasid, et *fiCTLA-4* takistab ZAP-70 mikroklastrite moodustumist (Schneider jt., 2008). Samuti on uuringutest selgunud *fiCTLA-4* interaktsioon fosfoinositiid 3-kinaasiga (Hu jt., 2001), samas varasem töö ensüümiga seost ei leidnud (Stein jt., 1994). On näidatud, et türosiini fosfataas SHP-2 seostub *fiCTLA-4* tsütoplasmaatilise saba kindla järjestusega (Marengere jt., 1996), ent hilisemas uuringus seati nimetatud interaktsioon küsimuse alla (Lee jt., 1998). Edasised uuringud tõestasid, et SHP-2 ja *fiCTLA-4* vahel ei ole otsest interaktsiooni (Schneider ja Rudd, 2000).

Allison jt. uurisid *fiCTLA-4* ekspresiooni muutust molekuli ekspresseerivates ja mitte ekspresseerivates T-rakkudes antigeeni juuresolekul *in vivo*. Võrreldes kahte T-rakkude populatsiooni tuvastati kõigest 10 geeni ekspresiooni suurenemine rakkudes, mis ekspresseerisid *fiCTLA-4* molekuli. Töö järeldusena toodi välja, et *fiCTLA-4* ei oma aktiivset negatiivse signalisatsiooni mehhanismi (Corse ja Allison, 2012). Bluestone jt. uurisid mutantset *fiCTLA-4* molekuli ekspresseerivat hiirt. Autorid eeldasid, et mutantse vormi tõttu ei suuda T-rakud *fiCTLA-4* kaudu immuunsüsteemi supresseerida. Antigeeni juuresolekul tekkis hiirel autoimmuunne haigus, ent lähemal vaatlusel selgus, et põhjuseks oli Treg rakkude defekt, mitte *fiCTLA-4* molekuli mutatsioon. Seega töö ei anna olulist tõestust *fiCTLA-4* negatiivse signalisatsiooni mudelile (Stumpf jt., 2014). Mitmete signaalmehhanismide seostamine *fiCTLA-4* funktsiooniga näitab konsensuse puudumist ning molekuli uurimise keerukust (Walker ja Sansom, 2015). Lisaks on spekuleeritud, et *fiCTLA-4* mõjutab T-rakkude liikuvust läbi rakusiseste või rakuväliste mehhanismide, kuid uuringud kimäärse hiire luuüdist eraldatud T-rakkudega ei näidanud *fiCTLA-4* ekspresiooni ning raku mobiilsuse vahel olulist seost (Bachmann jt., 1999; Bachmann jt., 2001; Homann jt., 2006; Walker ja Sansom, 2011). On võimalik, et erinevates lümfotsüütides on *fiCTLA-4* molekulil lahknevad funktsioonid, ent sellise mudeli tõestamiseks ei ole piisavalt teaduslikku materjali (Walker ja Sansom, 2015). Yokosuka jt. leidsid, et *fiCTLA-4* ja CD28 molekulide CD80 või CD86 ligandiga seostumisest tingitud rakusisene konkurents on sarnane Treg ja Tkonv rakkudes (Yokosuka jt., 2010). *In vivo* uuringud tõestavad, et *fiCTLA-4* rakuväline funktsioon on samuti sarnane Treg ning Tkonv rakkudes (Corse ja Allison, 2012; Wang jt., 2012). *fiCTLA-4* molekul reguleerib immuunvasust mitmel moel. Aktiveerunud T-rakk ekspresseerib *fiCTLA-4* ning CD28 molekuli, mis tekitab ligandiga

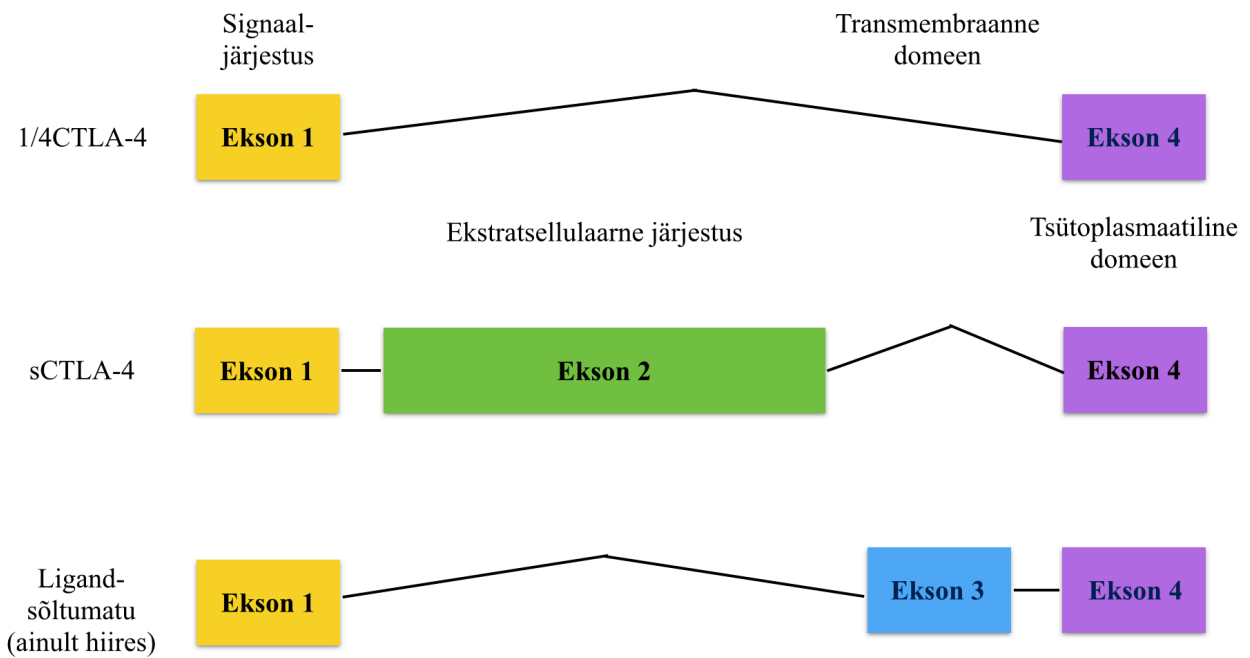
seostumisest tingitud rakusisese konkurentsi (joonis 5, A). Treg rakk ekspresseerib flCTLA-4 molekuli, mis interakteerudes CD80/86 ligandiga takistab CD28 seostumist APC'ga ning tekitab rakuvälise, aga ka rakulise konkurentsi (joonis 5, B) (Walker ja Sansom, 2015). Üks arutelu tekitanud flCTLA-4 funktsioon on selle võime mõjutada CD80 ja CD86 regulatsiooni APC pinnal (Cederbom jt., 2000; Oderup jt., 2006; Misra jt., 2004) (joonis 5, C). Sakaguchi jt. leidsid, et Treg rakud reguleerivad CD80 ja CD86 avaldumist dendriitraku pinnal (Sakaguchi jt., 2008), mis on adhesioon-sõltuv protsess (Onishi jt., 2008): anti-flCTLA-4 antikeha takistab ning flCTLA-4 puudumine Treg rakus välistab CD80/86 ligandide allaregulatsiooni (Wing jt., 2008). Nimetatud mudeli kohaselt seostub flCTLA-4 APC pinnal olevate ligandidega ning eemaldab viimased transendotsütoosi teel, mis seejärel lüsoosoomides lagundatakse (Qureshi jt., 2011). Kirjeldatud rakuväline mehhanism toimub eelkõige Treg vahendusel, kuna nimetatud rakud sünteesivad rohkem flCTLA-4 molekuli, kui Tkonv rakud (Corse ja Allison 2012; Wang jt., 2012). Transendotsütoos on üks võimalik immuunsünapsi regulatsiooni mudel, mis näitab kuidas flCTLA-4 konkureerib CD28'ga (Yokosuka jt., 2010; Pentcheva-Hoang jt., 2004). Treg rakud seostuvad organismile omaste antigeenidega tugevamalt kui Tkonv rakud (Moran jt., 2011; Lee jt., 2012) ning moodustavad APC'ga stabiilsema interaktsiooni (Onishi jt., 2008), mis võimaldab transendotsütoosi toimumist. Kostimulatoorsete molekulide hulga reguleerimine APC pinnal näitab flCTLA-4 olulist funktsiooni immuunsüsteemis ning organismi kaitses (Walker ja Sansom, 2015).



**Joonis 5.** Kolm võimalikku fICTLA-4 funktsiooni T-rakkudes. A) Aktiveerunud T-rakud ekspresseerivad fICTLA-4 kui ka CD28 molekuli, moodustub rakusisene konkurents. Eksperimentaalsed katsed kimäärse hiire luüdrist eraldatud T-rakkudega näitavad, et nimetatud rakusisene mehhanism ei ole kõige olulisem fICTLA-4 funktsioon *in vivo*. B) Treg rakud moodustavad fICTLA-4 kaudu kontakti CD80/86 ligandiga ning takistavad Tkonv raku interaktsiooni APC'ga. C) Moodustunud Treg-APC sünapis eemaldab fICTLA-4 molekul CD80/86 ligandi transendotsütoosi teel. Seejärel sünap katkeb, mis annab võimaluse järgmisele Treg rakule. Tegemist on kõige olulisema fICTLA-4 funktsiooniga *in vivo* (kohandatud Walker ja Sansom, 2015 järgi).

### 3.2 fICTLA-4 splaissvariandid

Inimese organismis on fICTLA-4 molekulist leitud 2 splaissvarianti: lahustuv CTLA-4 (ingl *soluble CTLA-4*, sCTLA-4), millel puudub ekson 3 ning 1/4CTLA-4, millel puuduvad eksonid 2 ja 3 (Brunet jt., 1987; Dariavach jt., 1988; Magistrelli jt., 1999; Oaks jt., 2000; Ueda et al., 2003; Vijayakrishnan jt., 2004). Hiire organismist on lisaks leitud ligand-sõltumatu CTLA-4 (ingl *ligand-independent CTLA-4*, liCTLA-4) molekul, mis koosneb eksonitest 1, 3 ning 4 (Ueda jt., 2003) (joonis 6).



**Joonis 6.** Kõik võimalikud flCTLA-4 molekuli splaissvariandid. Ekson 1/4 transkript, mis koosneb kahest eksonist; lahustuv ning ligand-sõltumatu transkript, mis mõlemad koosnevad kolmest eksonist. Joonisel toodud eksonite suurused on illustratiivsed ning ei peegelda tegelikku geeni struktuuri (Teft jt., 2006 järgi).

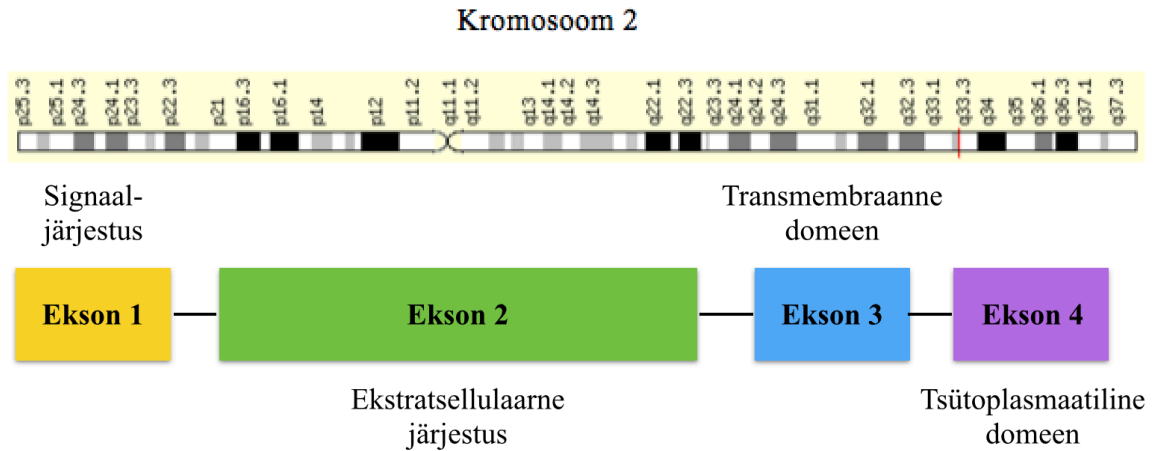
Lahustuva CTLA-4 transkripti funktsiooni määramiseks loodi RNA interferentsi meetodi abil spetsiifiline hiiremudel. sCTLA-4 mRNA 2. ning 4. eksoni piirile seostuvad lühikesed juuksenõela struktuuriga RNA konstruktid vaigistavad vastava molekuli sünteesi. Võrreldes sCTLA-4 vaigistatud hiirt metsiktüüpi hiirega ei leitud olulist muutust T-rakkude arengus, fenotüübis ning hulgas. *In vitro* sCTLA-4 ekspressiooni vaigistamine ei muutnud T-lümfotsüütide jagunemist ning Treg rakkude pinnamarkerite ekspressiooni. Samas sCTLA-4 vaigistamine transgeenses hiires takistab Treg rakkude funktsiooni (Gerold jt., 2011), kuna geen ekspresseerub põhiliselt Treg rakkudes (Ward jt., 2013), aga ka ka stimuleerimata T-rakkudes (Magistrelli jt., 1999). On leitud, et geeni vaigistamine suurendab autoimmuunse haiguse T1D tekkimist, mis tõestab sCTLA-4 tähtsust immuunsüsteemis (Gerold jt., 2011). Oaks jt. leidsid, et sCTLA-4 võib seostuda CD80/86 molekulidega ning pidurdada T-rakkude aktivatsiooni (Oaks jt., 2000). Samas võib sCTLA-4 CD80/86 molekulidega seostunult takistada Treg raku pinnal oleva flCTLA-4 retseptori interaktsiooni APC'ga ning pärssida supressiivsete signaalide edastamist T-rakkudele.

Sellest tulenevalt võib järeldada, et sCTLA-4'l on mitu T-rakkude aktiivsust mõjutavat funktsiooni (Gerold jt., 2011).

1/4CTLA-4 funktsiooni uurimiseks loodi nimetatud molekuli üle-ekspressiooniv transgeenne hiiremudel (Liu jt., 2012). Katsete käigus selgus, et transgeenses hiires, võrreldes metsiktüüpi hiirega, toodavad T-rakud rohkem tsütokiine. Samuti tõusis mälu-T-rakkude protsent, mis kasvas hiire vananedes. Rohkem kui aasta vanustes transgeensetes hiirtes suurenes T-rakkude poolt toodetavate aktivatsioonimarkerite hulk, mis põhjustasid spontaanset autoimmuunsust ning autoantikehade tootmist (Liu jt., 2012). Lisaks täheldati Treg rakkude arvukuse kasvu, mis ei olnud võimelised inhibeerima jämesoolepõletiku teket. Saadud andmed viitavad, et 1/4CTLA-4 käitub flCTLA-4'st erinevalt ning soodustab T-rakkude aktivatsiooni, mis tekitab autoimmuunsust (Liu jt., 2012).

#### ***4. T-raku pinnaspetsiifiline glükoproteiin CD28***

Sarnaselt flCTLA-4'le liigitatakse ka 220 aminohappe pikkune CD28 molekul immunoglobuliinide perekonda (Aruffo ja Seed, 1987). Nimetatud molekulid on kõige rohkem kirjeldatud immunoglobuliinid (Rudd jt., 2009), mille aminohappeline järjestus on 31% ulatuses homoloogne (Linsley jt., 1992). Geen pikkusega 32,438 aluspaari asub 2. kromosoomi pikas õlas (asukoht 2q33) ning koosneb 4 eksonist (joonis 7). Ekson 1 sisaldab signaalpeptiidi järjestust ning ekson 2 kodeerib suurt osa ekstratsellulaarsest domeenist (kaasaarvatud aminohappelisi järjestusi ligandi sidumiseks); ekson 3 ning ekson 4 kodeerivad vastavalt transmembraanset regiooni ning tsütoplasmaatilist saba (joonis 7) (Hanawa jt., 2002).



**Joonis 7.** Inimese *CD28* geeni struktuur ja paiknemine kromosoomis. Geen pikkusega 32,438 aluspaari asub 2. kromosoomi pikas õlas (asukoht 2q33) ning koosneb 4 eksonist. Joonisel toodud eksonite suurused on illustratiivsed ning ei peegelda tegelikku geeni struktuuri (aluseks Hanawa jt., 2002; <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CD28>).

*CD28* ekspresseerub enamikes  $CD4^+$  T-rakkudes (Vallejo jt., 1998), ent hoolimata geeni lakkamatust ekspressioonist on *CD28* hulka raku pinnal muutuv, mida mõjutab TCR vahendatud T-rakkude aktivatsioon (Lenschow jt., 1996; Eck jt., 1996). *CD28* ekspressiooni on täheldatud ka inimese NK-rakkudes (Galea-Lauri jt., 1999) ning ekspressioon on tüümuse arengu käigus kindlalt reguleeritud. Geen ekspresseerub väga madalal tasemel topelt-negatiivsetes tümotsüütides ning kõrgel tasemel topelt-positiivsetes tümotsüütides. *CD28* molekuli interaktsioon *CD80/86* ligandiga indutseerib T-raku ülemineku topelt-negatiivsest olekust topelt-positiivsesse olekusse (Williams jt., 2005).

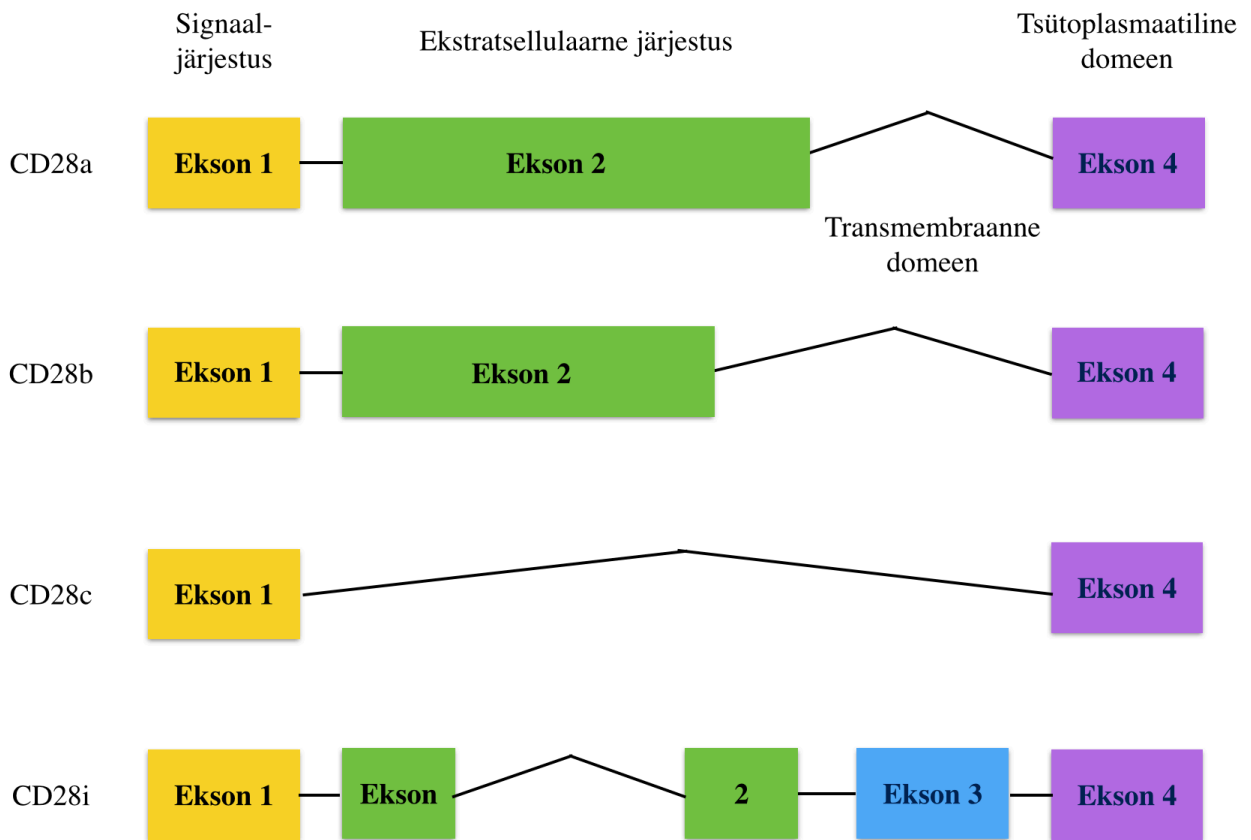
#### 4.1 *CD28* funktsioon

Ollakse ühel arvamusel, et *CD28* edastab T-rakkude aktivatsiooniks vajaliku kostimulatoorse signaali. Samuti muudab T-rakkude jagunemise (Gett ja Hodgkin, 2000) ja tsütokiinide tootmise oluliselt efektiivsemaks (Thompson, 1993; Boise jt., 1993). *CD28* aktiveerib fosfatidüülinositol-3-kinaasi ekspressiooni (Ward jt., 1993), mis on oluline ensüüm raku kasvu, jagunemise, diferentseerumise, liikumise jpm regulatsioonis (Cantley, 2002). Samuti reguleerib *CD28* ATK kinaasi (Sansom ja Walker, 2006), mille funktsioonide hulka kuuluvad glükoosi metabolismi,

apoptoosi, jagunemise, transkriptsiooni ja raku migratsiooni regulatsioon (Liu jt., 2013). CD28 mõjutab IL-2 ekspressiooni modifitseerides geeni transkriptsiooni ning mRNA regulatsiooni. Lisaks kontrollib CD28 teiste tsütokiinide stabiilsust ning osaleb immuunsünapsi moodustamises (Miller jt., 2009). CD28-poolsed signaalid mõjutavad ka anti-apoptootiliste valkude regulatsiooni (Wu jt., 2005; Okkenhaug jt., 2001). Seega võib CD28 kostimulatsiooni pidada oluliseks signaaliks, mis lisaks TCR signaalile tagab T-raku jagunemise ning stabiilsuse (Sansom ja Walker, 2006). On pakutud, et sellised signaalid hoiavad ära T-rakkude anergia (Appleman jt Boussiotis, 2003) ehk mittekommunikatiivse seisundi kujunemise, mida on laialdaselt seletatud Treg rakkudel (Takahashi jt., 1998).

#### **4.2 CD28 splaissvariandid**

Inimese organismis on CD28 molekulist leitud 4 erinevat splaissvarianti: lahustuv CD28a, mis ekspresseerub puhkavates T-rakkudes täispika CD28'ga sarnasel tasemel, kuid millel on puudu 3. ekson; CD28b ja CD28c, mis ekspresseeruvad võrreldes CD28a'ga madalamal tasemel ning moodustuvad vastavalt 2. eksoni 3' otsa ja 3. eksoni deletsioonil ning 2. ja 3. eksoni deletsioonil (Magistrelli jt., 1999) ning CD28i, mis ekspresseerub T-rakkudes võrreldes CD28'ga madalamal tasemel ning millel puudub suur osa 2. eksonist (Hanawa jt., 2002) (joonis 8).



**Joonis 8.** Kõik võimalikud CD28 molekuli splaissvariandid. CD28a transkript, millel puudub 3. ekson; CD28b transkript, millel puudub 2. eksoni 3' ots ning 3. ekson; CD28c transkript, millel puudub 2. ja 3. ekson ning CD28i, millel puudub 2. eksoni sisemine ala. Joonisel toodud eksonite suurused on illustratiivsed ning ei peegelda tegelikku geeni struktuuri (Magistrelli jt., 1999; Hanawa jt., 2002 järgi).

Aktiveerunud T-rakud ekspresseerivad täispikka membraanset molekuli, seega puhkavad T-rakud võivad ekspresseerida täispikka ja lahustuvat molekuli. Sellest tulenevalt usutakse, et täispikk ja lahustuv CD28 molekul reguleerivad T-rakulist vastust erinevalt. Magistrelli jt. spekulatsioonid, et lahustuv CD28 võib seostuda CD80 või CD86 molekuliga ning takistada T-raku interaktsiooni APC'ga ja sellest tulenevalt pidurdada T-rakkude aktivatsiooni (Magistrelli jt., 1999). CD28i isovorm ekspresseerub T-rakus ning võib koostöös CD28'ga soodustada T-rakkude aktivatsiooniks vajalikku kostimulaatorset signaali (Hanawa jt., 2002). Seega lisaks täispikale CD28 molekulile võivad ka alternatiivsed variandid mõjutada adaptiivse immuunsüsteemi aktivatsiooni (Zhou jt., 2013).

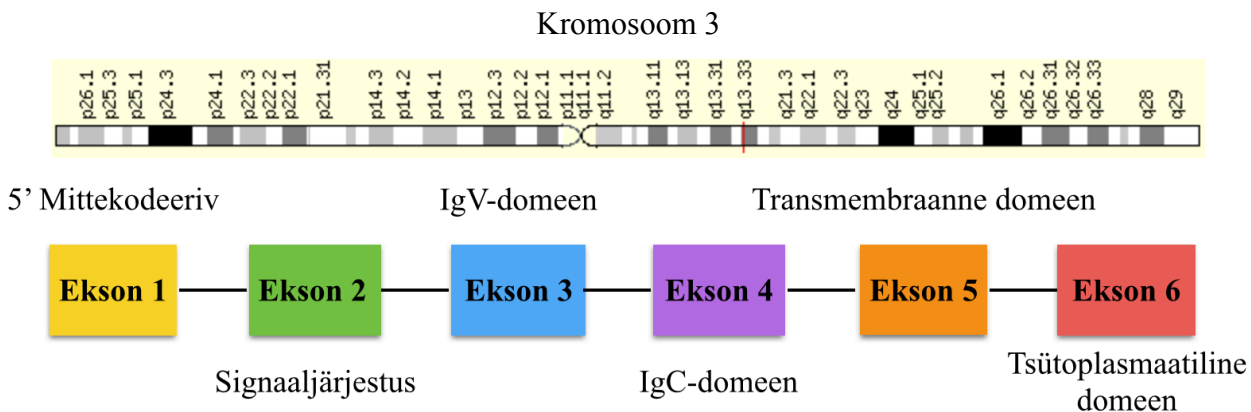
## 5. CD80 ja CD86 glükoproteiinid

B-raku aktivatsioonimolekul CD80 avastati 1981. aastal (Yokochi jt., 1982) ning kirjeldati esimese ligandina, mis seostub CD28'ga kui ka fICTLA-4'ga (Linsley jt., 1990). *CD80* geen liigitati immuunoglobuliinide superperekonda (Freeman jt., 1989). CD80 funktsionaalne tähtsus on tõestatud mitmes T-raku aktivatsiooni uurivas töös (Lenschow jt., 1996).

Freeman jt. ning Azuma jt. leidsid, et CD86 struktuur on sarnane CD80'ga ning koosneb ekstratsellulaarsest ja transmembraanses domeenist ning tsütoplasmaatilisest sabast (Freeman, Gribben jt., 1993; Azuma jt., 1993). Katsete tulemusena on selgunud, et CD86 interakteerub CD28'ga ja fICTLA-4'ga (Freeman, Gribben jt., 1993; Azuma jt., 1993; Freeman, Borriello jt., 1993) ning soodustab T-rakkude jagunemist ning IL-2 produktsiooni.

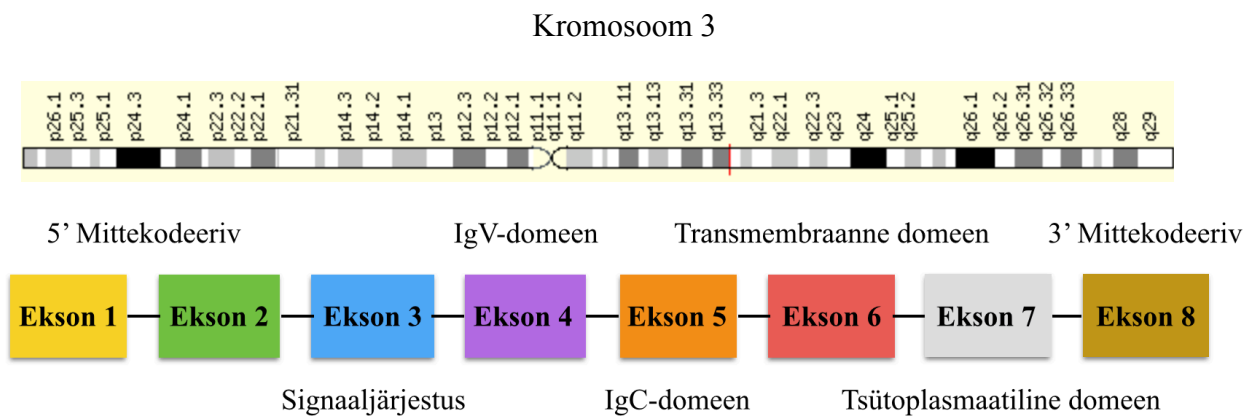
### 5.1 CD80 ning CD86 molekulaargeneetika

CD80 koosneb 6'st eksonist ning katab ligikaudu 32 kilobaasi genoomist. Ekson 1 on mittekodeeriv; ekson 2 sisaldab ATG initsiaatorkoodonit ning signaaljärjestust; eksonid 3 ja 4 koosnevad kahest Ig-tüüpi domeenist ning eksonid 5 ja 6 kodeerivad transmembraanset domeeni ning tsütoplasmaatilist saba (joonis 9) (Selvakumar jt., 1992).



**Joonis 9.** Inimese *CD80* geeni struktuur ja paiknemine kromosoomis. Geen pikkusega 35,342 aluspaari asub 3. kromosoomi pikas õlas (asukoht 3q13.33) ning koosneb 6 eksonist. Joonisel toodud eksonite suurused on illustratiivsed ning ei peegelda tegelikku geeni struktuuri (aluseks Selvakumar jt., 1992; <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CD80>).

CD86 koosneb 8'st eksonist ning katab ligikaudu 22 kilobaasi genoomist. Eksonite 1 ja 2 alla kuulub 5' mittetransleeruv ala; ekson 3 kodeerib signaaljärjestust; eksonid 4 ja 5 kodeerivad IgV ning IgC ekstratsellulaarseid domeene; ekson 6 kodeerib transmembraanset regiooni ja tsütoplasmaatilise saba algust ning eksonid 7 ja 8 jätkavad tsütoplasmaatilise saba ning 3' mittetransleeruva ala kodeerimist (joonis 10) (Jellis jt., 1995).



**Joonis 10.** Inimese *CD86* geeni struktuur ja paiknemine kromosoomis. Geen pikkusega 65,782 aluspaari asub 3. kromosoomi pikas õlas (asukoht 3q13.33) ning koosneb 8 eksonist. Joonisel toodud eksonite suurused on illustratiivsed ning ei peegelda tegelikku geeni struktuuri (aluseks Jellis jt., 1995; <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CD86>).

*CD80* ekspresseerub aktiveerunud makrofaagides, B-rakkudes ja NK-rakkudes, minimaalselt ka dendriitrakkudes ning ei ekspresseeru inaktiivsetes monotsüütides (Hathcock jt., 1994). Lisaks on leitud, et *CD80* ekspresseerub psoriaasi kolletes leiduvates T-rakkudes (Nickoloff jt., 1994) ja süsteemse erütematoosse luupuse patsientide perifeerse vere T-rakkudes (Takasaki jt., 1998). *CD80* ekspressioon on tuvastatud ka polüskleroosi patsientide perifeerse vere  $CD4^+$  T-rakkudes (Mena ja Rohowsky-Kochan, 1999). *CD86* ekspresseerub inaktiivsetes monotsüütides ja aktiveerunud B-rakkudes (Boussiotis jt., 1993).

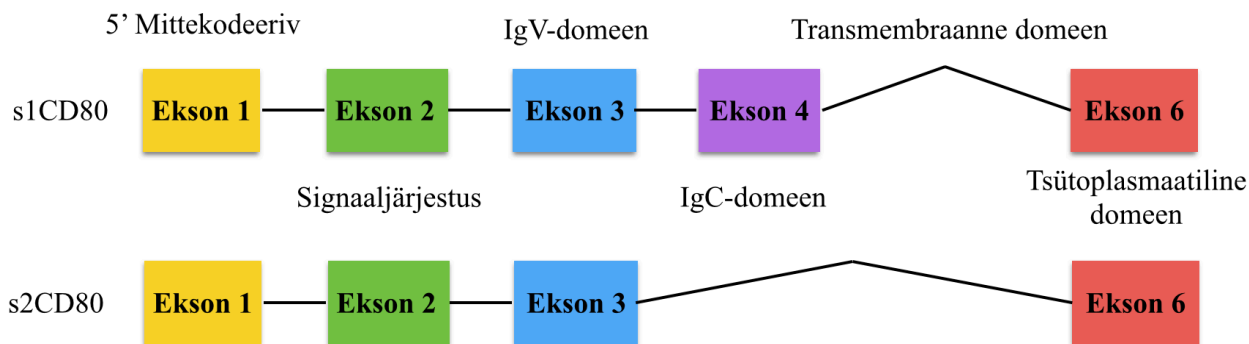
## 5.2 *CD80 versus CD86*

*CD80* ja *CD86* on glükoproteiinid, mis koosnevad kahest ekstratsellulaarsest Ig-sarnasest domeenist, transmembraansest regioonist ja tsütoplasmaatilisest sabast (Vasu jt., 2003).

Nimetatud valkude funktsiooni osas on teaduses lahkavamusi. Mitme uuringute kohaselt edastavad CD80 ja CD86 molekulid sarnaseid T-rakkude jagunemist ja tsütokiinide produktsiooni soodustavaid signaale (Lanier jt., 1995; Schweitzer jt., 1997). Teisalt arvatakse, et valkude funktsioon on erinev (Freeman jt., 1995; Kuchroo jt., 1995; Matulonis jt., 1996). Loomkatsetest CD80 ja CD86 *knockout* hiirtega leiti, et molekulide mõju immuunvastuse aktivatsioonis oleneb kasutatava antigeeni ning adjuvandi tüübist (Flo jt., 2000; Santra, Barouch, Jackson jt., 2000; Santra, Barouch, Sharpe jt., 2000). CD80- ja CD86-puudulikus hiires ei tekkinud kunstlikult sisestatud inimese HI-viiruse peptiidi vastast immuunreaktsiooni. Reaktsiooni saamiseks sisestati plasmiididel kandjal CD80 või CD86 molekul hiire organismi (Santra, Barouch, Jackson jt., 2000; Santra, Barouch, Sharpe jt., 2000). CD86-puuduliku hiire põrnast eraldatud T-rakkude eellaste kokkupuutel allogeensete valgevererakkudega ei arenenud eellasrakud immuunaktiivseteks T<sub>c</sub> rakkudeks. Samas CD80 puudumine ei takistanud T-rakkude arenemist samadel katsetingimustel (McAdam jt., 2000). Üheks oluliseks erinevuseks võib pidada CD80 ja CD86 ekspressiooni iseärasusi. CD86 ekspresseerub püsivalt kõrgel tasemel, samas CD80 ekspressioon on efektiivsem 24-48 tundi pärast retseptor-ligand interaktsiooni (Lenschow jt., 1996; Greenfield jt., 1998). CD86 seostub f<sub>1</sub>CTLA-4 ning CD28 retseptoritega nõrgemini kui CD80 kuid interakteerub CD28 molekuliga 2 kuni 3 korda efektiivsemalt kui CD80. Lisaks teatakse, et CD80 seostub eelistatult f<sub>1</sub>CTLA-4'ga ja CD86 CD28'ga (Collins jt., 2002). Samuti dissotsieerub CD86 kontaktist f<sub>1</sub>CTLA4'ga kiiremini kui CD80 (Van der Merwe jt., 1997). Freeman jt. ning Azuma jt. leidsid, et CD80 ja CD86 struktuur on sarnane (Freeman, Gribben jt., 1993; Azuma jt., 1993). Samas Collins jt. pakuvad, et CD80 ja CD86 erinev struktuur ning seostumisomadused tingivad ka nende erineva rolli T-rakkude aktivatsioonis (Collins jt., 2002).

### **5.3 CD80 ja CD86 splaissvariandid**

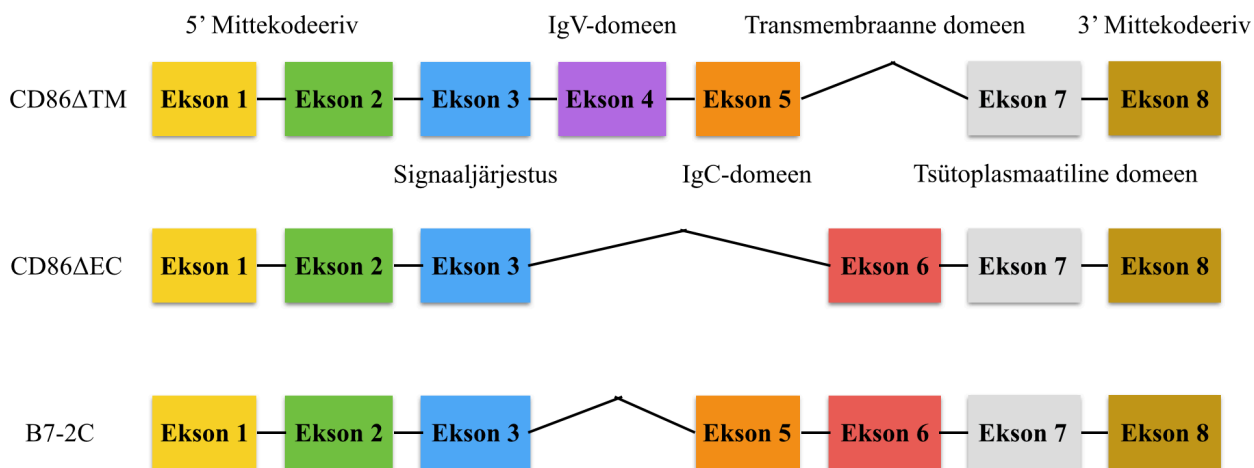
Inimese organismis on CD80 molekulist leitud 2 erinevat splaissvarianti: s1CD80, mis ekspresseerub stimuleerimata monotsüütides kui ka B-rakkudes ning millel puudub transmembraanne domeen ja s2CD80, mis ekspresseerub aktiveerunud T-rakkudes ja monotsüütides ning millel puudub IgC-tüüpi domeen kui ka transmembraanne domeen (Kakoulidou jt., 2007) (joonis 11).



**Joonis 11.** Kõik võimalikud CD80 molekuli splaissvariandid. s1CD80 transkript, millel puudub 5 ekson ning s2CD80, millel puuduvad 4 ja 5 ekson. Joonisel toodud eksonite suurused on illustratiivsed ning ei peegelda tegelikku geeni struktuuri (aluseks Kakoulidou jt., 2007).

Inimese organismis tuvastatud sCD80 (ingl *soluble CD80*, sCD80) kuulub lahustuvate retseptorite perekonda ning täidab immuunsüsteemis olulist funktsiooni. sCD80 seostumine flCTLA-4 retseptoriga takistab T-rakkude aktivatsiooni (Haile jt., 2013). Kakoulidou jt. leidsid, et rekombinantne s1CD80 seostub rekombinantse flCTLA-4'ga ja CD28'ga, aga ka aktiveerunud T-rakkudega ning rekombinantne s2CD80 takistab T-rakkude jagunemist (Kakoulidou jt., 2007). sCD80 supressiivne funktsioon võimaldab molekuli kasutamist hüperaktiveeritud T-rakkudega assotsieeritud haiguste ravis (Kakoulidou jt., 2007).

Inimese organismis on CD86 molekulist leitud 3 splaissvarianti: lahustuv CD86 (CD86 $\Delta$ TM), mis ekspresseerub puhkavates monotsüütides (Jeannin jt., 2000) ning millel puudub ekson 6; CD86 $\Delta$ EC, mis ekspresseerub mittestimuleeritud monotsüütides ning millel puuduvad eksonid 4 ja 5 (Magistrelli jt., 2001) ja B7-2C, mis ekspresseerub monotsüütides ning millel puudub ekson 4 (Kapsogeorgou jt., 2008) (joonis 12).



**Joonis 12.** Kõik võimalikud CD86 molekuli splaissvariandid. CD86 $\Delta$ TM transkript, millel puudub 6 ekson; CD86 $\Delta$ EC, millel puuduvad 4 ja 5 ekson ning B7-2C, millel puudub 4 ekson. Joonisel toodud eksonite suurused on illustratiivsed ning ei peegelda tegelikku geeni struktuuri (aluseks Magistrelli jt., 2001; Kapsogeorgou jt., 2008).

Rekombinantne CD86 $\Delta$ TM seostub CD28'ga ja flCTLA-4'ga ning mõjutab anti-CD3 monoklonaalse antikehaga stimuleeritud T-rakkude aktivatsiooni *in vitro*. Samuti soodustab CD86 $\Delta$ TM interferoon  $\gamma$  produktsiooni gripiviiruse M1 peptiidiga stimuleeritud mälu-Tc rakkudes. On leitud, et inimese organismis on lahustuva CD86 molekuli ekspressioon kõrge ning täidab bioloogilist funktsiooni. Seega on nimetatud molekul oluline immuunsüsteemi regulatsioonis ning kontrollis (Jeannin jt., 2000).

## 6. Immuunsünapsi molekulide roll diabeedi tekkes ja kulgemises

### 6.1 flCTLA-4

Muutused flCTLA-4 molekuli transkriptsioonis või translatsioonis võivad omada olulist immunoloogilist tagajärge. Sellest tulenevalt on laialdaselt uuritud molekuli polümorfismide (ingl *single nucleotide polymorphism*, SNP) seost immunoloogiliste haigustega (Teft jt., 2006). Inimese flCTLA-4 molekulis on leitud mitmed SNP'd: -1722T/C, -1661A/G ning -318C/T, mis asuvad reguleerivas piirkonnas ja promooteri regioonis; +49A/G, mis asub esimeses eksonis ning muudab signaaljärjestuse aminohappelist struktuuri (Nistico jt., 1996; Deichmann jt., 1996;

Donner jt., 1997; Wang, Zhao jt., 2002; Kristiansen jt., 2000); dinukleotiidne (AT)<sub>n</sub> kordusjärjestus ning +6230A/G (CT60), mis asuvad 3' UTR järjestuses (Huang jt., 2000 ja Ueda jt., 2003). *In vitro* uuringud on näidanud, et mutantse +49A/G flCTLA-4 molekuli ebatavaline protsessimine endoplasmaatilises retiikulumis põhjustab flCTLA-4 ekspressiooni langust (Anjos jt., 2002). Samas -318C/T polümorfism soodustab flCTLA-4 ekspressiooni (Wang, Zhao jt., 2002). (AT)<sub>n</sub> SNP flCTLA-4 molekuli 3'UTR's põhjustab mRNA ebastabiilsust ning flCTLA-4 ekspressiooni langust (Wang, Kakoulidou jt., 2002). CT60 G alleel esineb T1D patsientidel ning põhjustab sCTLA-4 mRNA ebastabiilsust (Ueda jt., 2003).

Kavvoura jt. viisid läbi mahuka meta-analüüsi 33 publitseeritud artikli põhjal, et uurida flCTLA-4 +49A/G, -318C/T ning (AT)<sub>n</sub> polümorfismide mõju T1D tekkes. Analüüsiti 5,637 diabeedi juhtumit ning 6,759 kontrolli, millest vastavalt 4,775 ja 5,829 puhul uuriti +49A/G polümorfismi. Statistilisest analüüsist (*p*-väärus < 0.001) selgus, et G alleeli kandval indiviidil kujuneb T1D 1,45 korda suurema tõenäosusega. Mitmes CT60 G alleeli uurivas töös on leitud SNP seos autoimmuunsete haigustega, sealhulgas T1D'ga (Mayans jt., 2007; Orozco jt., 2004; Ueda jt., 2003). -318C/T ning (AT)<sub>n</sub> polümorfismid ei ole seotud T1D tekkega (Kavvoura ja Ioannidis, 2005).

## 6.2 CD28, CD80 ja CD86

CD28 geenis on leitud kaks polümorfismi. Kolmandas intronis paiknev dimorfism (T19int3C) (Heinzmann jt., 2000) ning 3'UTR's paiknev CAA kordus. Viimase uurimisel ei leitud olulist seost T1D'ga (Marron jt., 2000). Samuti ei leitud Wood jt. poolt tehtud uuringus assotsiatsiooni T19int3C ning T1D tekke vahel (Wood jt., 2002). Samas leidsid Ihara jt. dimorfismi ja T1D seose jaapanlaste populatsioonis (Ihara jt., 2001).

Turpeinen jt. uurisid kolme CD86 polümorfismi ning nende seost T1D tekkega soomlaste populatsioonis. Uuritavad geeni muutused olid -891T/C promooteri regioonis, +51A/G eksonis 1, +19G/A eksonis 2 ning +35G/A eksonis 8. Assotsiatsiooni T1D'ga ei näidanud ükski uuritud SNP (Turpeinen jt., 2002).

Matsushita jt. uurisid CD80 SNP seost reumatoidartriidi ja süsteemse erütematoosse luupuse tekkega jaapanlaste populatsioonis. Uuritavad SNP'd olid +452G/A, +614C/G ning +846A/G. SNP'de ning nimetatud haiguste vahel olulist assotsiatsiooni ei leitud (Matsushita jt., 2000).

### 6.3 Anti-CTLA-4 ja CTLA4-Ig

Immuunoteraapia eesmärk on takistada autoimmuunhaiguse teket ja kulgu tekitamata süsteemset immuunsupressiooni (Shieh jt., 2009). Mitmetes NOD (*non-obese diabetic mouse*, NOD) hiirtega tehtud töödes on tõestatud flCTLA-4 supressiivset funktsiooni (Luhder jt., 1998; Luhder jt., 2000; Kristiansen jt., 2000; Chen jt., 2006). Membraan-seoseline üheaahelaline anti-CTLA-4 Fv (ingl *membrane-bound single-chain anti-CTLA-4 Fv*, anti-CTLA-4 scFv) molekul seostub flCTLA-4'ga ning pidurdab T-rakkude aktivatsiooni *in vitro* (Griffin jt., 2000). Fife jt. poolt loodi anti-CTLA-4 scFv'd ekspresseerivad B-rakud ning leiti, et molekul takistab T-rakkude aktivatsiooni ning supresseerib T1D teket NOD hiires (Fife jt., 2006). Pankreast kahjustavate autoagressiivsete T-rakkude supresseerimiseks koostasid Shieh jt.  $\beta$ -rakkudes anti-CTLA-4 scFv'd üle-ekspresseeriva transgeense NOD hiire. Mudelil tehtud katsetest selgus, et molekul kergendab insuliidi tõsidust ning langetab spontaanse diabeedi tekkeoenäosust NOD hiires (Shieh jt., 2009). Anti-CTLA-4 molekuli üle-ekspressioon  $\beta$ -rakkudes ei mõjutanud süsteemsete lümfotsüütide arengut, mis näidab et antikeha mõju on lokaalne (Shieh jt., 2009).

Abatacept (Orencia; Bristol-Myers Squibb) võeti 2005. aastal Ameerika toidu- ja ravimitööstuse (ingl *United States Food and Drug Administration*, FDA) poolt kasutusele reumatoidartriidi ravimina. Abatacept koosneb immuunoglobuliin G1 (IgG1) modifitseeritud Fc fragmendist, mis tagab valgu lahustuvuse ning millele on kinnitatud flCTLA-4 molekuli ekstratsellulaarne domeen, mis seostub CD80/86 ligandiga ning takistab T-rakkude aktivatsiooni (Moreland jt., 2006).

Belatacept (Nulojix; Bristol-Myers Squibb) võeti 2011. aastal FDA poolt kasutusele profülaktilise ravimina, mis takistab neerusiirde operatsioonil retsipient organismis tekkivat organ-spetsiifilist immuunreaktsiooni (Wojciechowski ja Vincenti, 2012). Belatacept koosneb samuti IgG1 Fc fragmendist ning flCTLA-4 ekstratsellulaarsest domeenist, kuid tingitult kahe aminohappe muudatusest seostub CD80/86 ligandidega tugevamalt (Larsen jt., 2005).

Ipilimumab (Yervoy; Bristol-Myers Squibb) võeti FDA poolt kasutusele 2011. aastal hilise staadiumi melanoomi ravimina (Lipson ja Drake, 2011). Ipilimumab on anti-CTLA-4 monoklonaalne IgG1 antikeha, mis seostudes flCTLA-4 molekuliga soodustab immuunsüsteemi aktivatsiooni (Robert ja Chiringhelli, 2009).

## TÖÖ EESMÄRGID

Käesoleva töö idee saadi lähtudes Pruul jt. tehtud töö tulemustest, kus uuriti CD28, CD80 ning CD86 geenide ekspressiooni T1D patsientidel (Pruul jt., 2013). Selle töö autorid määrasid nende geenide üldist ekspressiooni täisveres. RNA eraldamiseks kasutati Tempus™ täisvere RNA tuubi meetodit kuid see ei andnud andmeid ekspressiooni kohta valgete vererakkude alapopulatsioonides. Seetõttu käesoleva töö eksperimentaalses osas eristati 6 vererakkude alapopulatsiooni, milles määrati immuunsünapsi nelja geeni ekspressioon.

Käesoleval uurimistööl oli 3 peamist eesmärki:

1. Leida uuritavate geenide (*CTLA-4*, *CD28*, *CD80* ja *CD86*) ekspressiooni määramiseks mononukleaarsetes vererakkudes sobivaim referentsgeen (koduhooldaja).
2. Määrata *CTLA-4*, *CD28*, *CD80* ja *CD86* ekspressioon perifeersete mononukleaarsete vererakkude (ingl *peripheral blood monocytes*, PBMC) segust ning Tempus™ vere RNA'st ja võrrelda geeniekspressiooni kasutades  $2^{-ddCt}$  meetodit.
3. Määrata *CTLA-4*, *CD28*, *CD80* ja *CD86* ekspressioon perifeersetes mononukleaarsetes vererakkudes (k.a monotsüütides, B-rakkudes, NK-rakkudes, abistaja T-rakkudes, tsütotoksilistes T-rakkudes ning regulatoorsetes T-rakkudes) ja võrrelda geeniekspressiooni kasutades  $2^{-ddCt}$  meetodit.

## MATERJAL JA METOODIKA

### *7. Valim*

Uurimuse läbiviimiseks kasutati vabatahtlike veredoonorite verest eraldatud trombotsüütide ja leukotsüütide kihti (edaspidiselt TLK), mis saadi Tartu Ülikooli Kliinikumi Verekeskusest. Selles töös kasutati kuue veredoonori proove, kuid ühe doonori materjali ei olnud võimalik kasutada, kuna eraldatud valged vererakud moodustasid rakkude sorteerimist takistavaid agregate. Seega jäi valimi suuruseks 5 indiviidi, kellest kõik olid meessoost, keskmine vanus 32 (25-42). Käesoleva töö raames teostatavate uuringute läbiviimiseks on katsealused andnud informeeritud nõusoleku ning olemas on Tartu Ülikooli inimuuringute eetika komitee luba.

### *8. Metoodika*

#### **8.1 Perifeersete mononukleaarsete vererakkude eraldamine**

Perifeersete mononukleaarsete vererakkude (PBMC) eraldamiseks kasutati Ficoll-Paque™ PLUS tihedusgradiendi lahust (GE Healthcare, USA), mida pandi 15ml-sse katsutisse 3ml. Seejärel segati 50ml katsutis võrdses koguses PBS-i (Lonza, Šveits) ja katsealuselt saadud TLK-d (st. 1ml TLK kohta 1ml PBS'i). PBS ja TLK segu kanti Ficoll- Paque™ PLUS lahuse pinnale. Proov tsentrifugiti 450 x G juures 30 minutit toatemperatuuril. Järgnevalt eraldati Pasteur'i pipeti (Sarstedt, Saksamaa) abil mononuklearsed rakud Ficoll-Paque™ PLUS-i ning vereplasma vahelisest kihist 15ml katsutisse, kuhu lisati 12ml PBS-i ning segati. Proov tsentrifugiti 450 x G juures 10 minutit toatemperatuuril, supernatant eemaldati ning rakkude sade suspendeeriti 12ml-s PBS-s ning tsentrifugiti 450 x G juures 10 minutit toatemperatuuril. Supernatant eemaldati ning valgete vererakkude sademele lisati 1ml PBS-i, segati ning kanti ligikaudu 20µl rakusegu 1,5ml Eppendorfi tuubi (Axygen, Union City, USA) rakkude loendamiseks. 15ml katsutisse lisati 12ml PBS-i ning proov tsentrifugiti 450 x G juures 10 minutit toatemperatuuril. Rakkude loendamiseks lisati 10µl rakkude suspensioonile 90µl Trypan Blue (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) värvi, millest viidi 10µl segu loenduskambrisse (Neubauer Improved Bright-line, 0.100mm Tiefe Depth Profondeur, Blau Brand, Saksamaa). Lõpuks eemaldati supernatant ning olenevalt rakkude arvust lisati rakusademele külmutussegu (CTL-Cryo™ ABC Freezing Kit, Cellular

Technology Limited, USA) (näit. 10 miljoni raku kohta lisati 1ml söödet). Ühes krüotuubis külmutati 10 miljonit rakku. Krüotuub pandi isopropanooli sisaldavasse anumasse (Biocision CoolCell<sup>®</sup>, USA) ning asetati -80°C kappi. Rakkude pikemaks säilitamiseks hoiti neid vedela lämmastiku temperatuuril.

## **8.2 Külmutatud lümfotsüütide sulatamine ning alapopulatsioonidesse eristamine**

Külmutatud lümfotsüütide alapopulatsioonidesse sorteerimiseks sulatati PBMC segu üles, rakud märgistati antikehadega ning kasutades Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudi BD FACSAria™ (BD Biosciences, USA) läbivoolu tsütofluorimeetrit eraldati järgnevad alapopulatsioonid: B-rakud, monotsüüdid, NK-rakud, Tc rakud, Th rakud ning Treg rakud.

Rakkude sulatamiseks viidi krüotuubi 1ml FBS-RPMI segu. Ülessulanud rakud viidi 10% FBS (Inbio, Eesti) – RPMI-1640 (OÜ Naxo, Tartu, Eesti) segusse, misjärel tsentrifugiti rakususpensiooni 200 x G, +4°C juures 10 minutit. Supernatant eemaldati ning rakuademele lisati 10ml 5% PBS-BSA ja 10µl 0,005mg/ml DNAaSI (AppliChem GmbH, Darmstadt Germany) lahust, segu suspendeeriti ning rakkude loendamiseks pipeteeriti 10µl segu eraldi Eppendorfi tuubi. PBS-BSA lahuse valmistamiseks segati 50ml 10xPBS (Lonza, USA); 450ml H<sub>2</sub>O; 2,5g BSA puhver (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) ning 500µl 10% NaN<sub>3</sub> (SERVA Electrophoresis GmbH, Saksamaa) magnetsegajal. Katsut tsentrifugiti 200 x G, +4°C juures 10 minutit. Loendamiseks lisati 10µl rakususpensioonile 90µl Trypan Blue värvi, millest viidi 10µl segu loenduskambrisse. Tsentrifugimise lõppedes eemaldati supernatant ning lisati 10ml PBS-BSA lahust, suspendeeriti ning vastavalt loetud rakkude arvule võeti kolme 15ml katsutisse kindel kogus rakususpensiooni, nii et igasse katsutisse jääks 10 miljonit rakku.

Rakkude alapopulatsioonidesse sorteerimine viidi läbi kolme eraldiseisva katsena. Katse alguses märgistati kolm 5ml-st tuubi vastavalt alapopulatsioonidele: nr. 1 monotsüüdid ja B-rakud; nr. 2 Tc rakud ja NK rakud; nr. 3 Th rakud ja Treg rakud. Tuubidesse lisati kindel kogus PBS-BSA lahust, nii et antikehade ning rakususpensiooni (võeti 50µl) kogumahuks jääks 100µl. Tuubi nr. 1 lisati 2µl CD3-PerCP/Cy5.5 (Biolegend, Rootsi; kataloogi nr. 300328) ja CD14-APC/Cy7 (BioLegend, Rootsi; kataloogi nr. 325620) ning 5µl CD19-APC (BioLegend, Rootsi; kataloogi nr. 302212) antikeha, mis vastavalt märgistavad T-rakke, monotsüüte ning B-rakke. Tuubi nr. 2 lisati 2µl CD3-PerCP/Cy5.5 (Biolegend, Rootsi; kataloogi nr. 300328), 5µl CD8-PE (BioLegend,

Rootsi; kataloogi nr. 344706) ning 10µl CD16-FITC (BD Biosciences, USA; kataloogi nr. 335035) ja CD56-FITC (BD Biosciences, USA; kataloogi nr. 345811) antikeha, mis vastavalt märgistavad T-, Tc ning NK rakke. Tuubi nr. 3 lisati 2µl CD3-PerCP/Cy5.5 (Biolegend, Rootsi; kataloogi nr. 300328), 10µl CD4-FITC (BioLegend, Rootsi; kataloogi nr. 357406) ning 20µl CD25-PE (BioLegend, Rootsi; kataloogi nr. 302606) antikeha, mis vastavalt märgistavad T-, Th ning Treg rakke. Seejärel lisati tuubidesse 50µl raku suspensiooni ning 0,1µl DNAasI lahust ning inkubeeriti 20 minutit pimedas +4°C juures. Pärast inkubatsiooni lisati igasse tuubi 80µl PBS-BSA segu, segati ning tsentrifugeeriti 400 x G, +4°C juures 5 minutit. Supernatant eemaldati ning igasse tuubi lisati 180µl PBS-BSA puhvrit, suspendeeriti ning tsentrifugeeriti 400 x G, +4°C juures 5 minutit. Tsentrifugeerimise lõppedes eemaldati supernatant ning igasse tuubi lisati 500µl PBS-BSA puhvrit ning segati.

Rakkude sorteerimiseks pandi kuude 15ml katsutitesse 14ml PBS-BSA segu ning katsuteid hoiti öleöö +4°C juures. Enne sorteerimist eemaldati rakuagregaadid filtreerimise (40µm filter, BD Falcon, USA) teel, surnud rakkude märgistamiseks lisati igasse tuubi 25µl DAPI (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Saksamaa) värvi ning rakkude parema säilivuse tagamiseks asendati katsutites olev PBS-BSA segu 4ml FBS-RPMI seguga. Rakkude sorteerimine teostati koostöös Tehnoloogiainstituudi spetsialistiga ning viidi läbi vastavalt sealsele protokollile. Sorteerimise järgselt loksutati katsutit ning tsentrifugeeriti 300 x G, +4°C juures 10 minutit. Vastavalt sorteeritud rakkude arvule eemaldati suurem osa supernatandist, jättes katsutisse kindla koguse lahust. Rakud viidi Eppendorfi tuubidesse arvestusega kuni 500,000 raku 500µl lahuse kohta. Eppendorfid tsentrifugeeriti 400 x G, +4°C juures 5 minutit. Supernatant eemaldati ning rakud suspendeeriti 350µl-s RNeasy Micro Kit'i RLT lüüsi puhvris (Qiagen, Holland). Järgnevalt kas jätkati RNA eraldamisega või säilitati sorteeritud rakud lüüsi puhvris -80°C juures.

### **8.3 RNA eraldamine ning pöördtranskribeerimine**

Sorteeritud rakkude alapopulatsioonidest ja PBMC segust ning Tempus™ vere RNA tuubist (Life Technologies, Carlsbad, CA) eraldati sorteeritud rakkude RNA ja kogu valgete vererakkude RNA, kasutades RNeasy Micro Kit'i ja vastavat protokollit (Qiagen, Holland) ning täisvere totaalne RNA kasutades Tempus™ Spin RNA Isolation Reagent Kit'i ja vastavat protokollit (Applied Biosystems, UK).

RNA pöördtranskribeerimiseks kasutati järgnevat protokollit: 11,5µl RNA; 0,5µl dNTP (A,T,G,C – 20mM) (Solis Biodyne, Tartu, Eesti); 1µl 100µM OligoT8 (Metabion, Saksamaa); 4µl 5x reaktsioonipuhver (Invitrogen, USA); 1µl 0,1M DTT (Invitrogen, USA), 40U/µl Ribolock RNAas inhibiitor (Thermo Scientific, USA) ja 200U/µl Superscript III pöördtranskriptaas (Invitrogen, USA).

#### **8.4 Proovide amplifitseerimine**

Uuritavate geenide ning nende transkriptide ekspressiooni määramiseks kasutati reaalaaja PCR meetodit ning SYBR<sup>®</sup> Green Reaalaaja PCR-i (Life Technologies, USA). Praimerite järjestuste aluseks võeti kirjanduse andmed või kujundati praimerid ise, kasutades Tartu Ülikooli teadlaste poolt välja töötatud Primer3 programmi (<http://primer3.ut.ee>). Tabelis 1 on esitatud praimerjärjestused. Transkriptvariantide tuvastamiseks kujundati üks kahest praimerist alternatiivse splaissingu teel tekkivale ekson/ekson piirile.

**Tabel 1.** Töös kasutatud praimerite järjestused koos kirjanduse viidetega. Ülalpool punast joont on toodud töös kasutatud praimerid, joonest alla jäävad eksperimentaalselt katsetatud praimerid, mida madala või määramatu ekspressiooni tõttu edasisse töösse ei valitud. Iga praimerid nimetuses on välja toodud praimerid paiknemine geeni eksonis (nt. E2 – eksonis 2; E2/3 – eksonite 2 ja 3 piiril).

Praimer	Järjestus (5'-3')	Amplikoni pikkus	Viide
CD28_F (E2) CD28_R (E2/3)	ATGAATCAGTGACATTCTACCTCC AGGTGTTTCCCTTTCACATGG	145 bp	Pruul, 2013
CD28a_F (E2/4) CD28a_R (E4)	GTGAAAGGTGAGGAGTAAGAGGA CTGGTAATGCTTGCGGGTG	94 bp	Pahla, 2014
CD86_F (E5) CD86_R (E6)	CCCAGACCACATTCCTTGGA CTCTTCCCTCTCCATTGTGTTG	148 bp	Pahla, 2014
CTLA4F_F (E2/3) CTLA4F_R (E3)	ACCCAGATTTATGTAATTGATCCAGAA CCGAACTAAGTCTGCAAGGA	79 bp	Chen, 2013
CTLA4S_F (E2) CTLA4S_R (E2/4)	CATCTGCAAGGTGGAGCTCAT GGCTTCTTTTCTTTAGCAATTACATAAATC	93 bp	Toussiro, 2009
CD80_F (E2) CD80_R (E2)	TTTGACCCTAAGCATCTGAAGC ACCAGCCAGCACCAAGAG	104 bp	Shimada, 2012
s2CD80_F (E3/6) s2CD80_R (E6)	TTATCAGTCAAAGGCTTTGCC ATACAGGGCGTACACTTTCC	83 bp	Pahla, 2014
$\beta$ -ACT_F (E6/7) $\beta$ -ACT_R (E7)	AAGATCAAGATCATTGCTCCT ACTCGTCATACTCCTGCT	118 bp	Pruul, 2013
GAPDH_F (E3/4) GAPDH_R (E4/5)	CAACTACATGGTTTACATGTTCCAATATG GGGATCTCGCTCCTGGAAG	127 bp	Jingying, 2012
CD28_F (E3/4) CD28_R (E4)	ATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAG ATAGGGCTGGTAATGCTTGC	105 bp	Tsutsumi, 2006
CD86TM_F (E5/7) CD86TM_R (E7)	GCCTCGCAACTCTTATAAATGTG TCACTTTTGTGCGCATGAAGAT	106 bp	Pahla, 2014
CTLA4S_F (E2/4) CTLA4S_R (E4)	GGAACCCAGATTTATGTAATTGCTA TTTCACATTCTGGCTCTGGTTGG	91 bp	Pahla, 2014
CD80_F (E5/6) CD80_R (E6)	GCCTGACCTACTGCTTTGC TACAGGGCGTACACTTTCC	80 bp	Pahla, 2014
s1CD80_F (E4) s1CD80_R (E4/6)	CCAACCACAGTTCATGTGT CATCTGGGGCAAAGCTTGT	87 bp	Pahla, 2014
s2CD80_F (E3) s2CD80_R (E6)	GGGAACACCTGGCTGAAG CCTTCTCTCTGCACTTGG	64 bp	Pahla, 2014
HPRT_F (E6) HPRT_R (E7)	GGCAGTATAATCCAAAGATGGTCAA GTCTGGCTTATATCCAACACTTCGT	80 bp	Specht, 2001
$\beta$ -ACT_F (E4) $\beta$ -ACT_R (E4)	GCGCGGCTACAGCTTCA TCTCCTTAATGTCACGCACGAT	59 bp	Tao, 2007

Üks qPCR reaktsioon sisaldas 11,5µl RNA'd (koguses 55-665.8 ng); 1µl sobivat praimeritepaari (mõlemad 5µM); 5,6µl 2x SYBR<sup>®</sup> Green segu ning Rnaasivaba vett 10µl lõppmahuni. Proove amplifitseeriti kolmes korduses 384-augulisel PCR plaadil (BIOplastics, Holland). Geeniekspressiooni kalibreerimiseks kasutati *Gapdh* koduhoidjageeni. Transkriptide relatiivne ekspressioon määrati võrdleva Ct meetodiga ( $2^{-ddct}$  meetod) (Livak ja Schmittgen, 2001).

Reaktsioonid viidi läbi programmeeritavas termotsükleris (Abi 7900HT Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems, USA) kasutades järnevat programmi:

Soojendus	50°C	2 minutit	
Algne denaturatsioon	95°C	10 minutit	
Denaturatsioon	95°C	15 sekundit	} 40 tsüklit
Praimerite seondumine, ekstensioon	60°C	1 minut	
Dissotsiatsioon	95°C	15 sekundit	
	60°C	15 sekundit	
	95°C	15 sekundit	

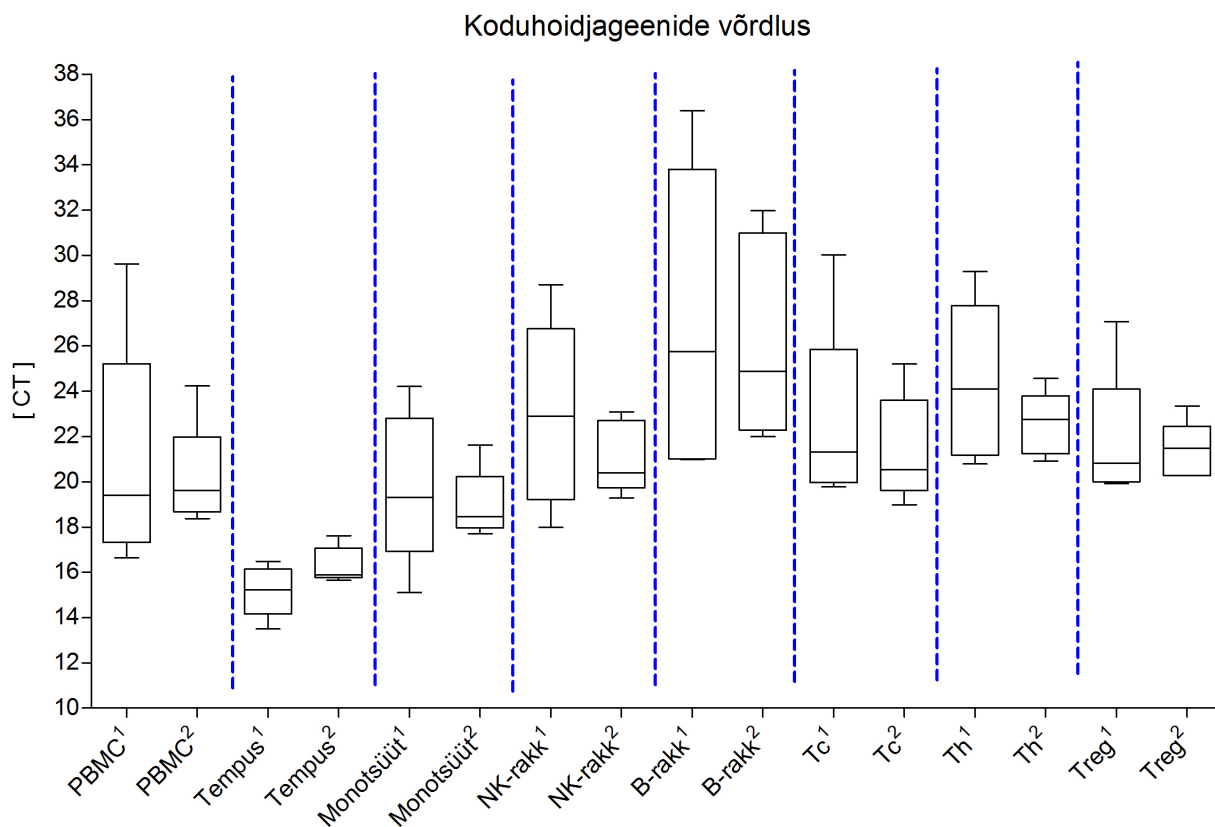
## 8.5 Statistika

Statistilise analüüsi ja jooniste tegemiseks kasutati programmi GraphPad Prism 5 (Graphpad, La Jolla, CA). Statistilise olulisuse määramiseks kasutati mitteparameetrilist Mann-Whitney *U*-testi (Wilcoxon rank-sum test), kuna geeniekspressioonid ei olnud normaaljaotuvusega ka peale log-transformatsiooni. Statistiliselt oluliseks loeti *p*-väärtus  $\leq 0,05$ .

## TULEMUSED

### 9. Koduhoidjageenide ekspressiooni võrdlus ja valik

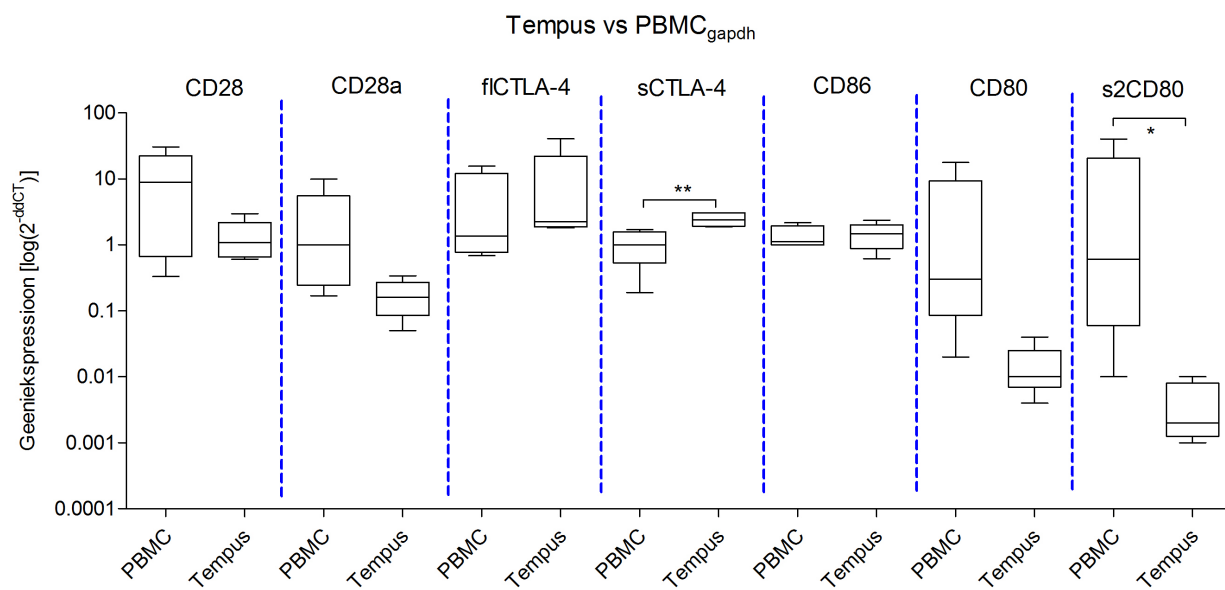
Eesmärgil leida vererakkude edasisteks uuringuteks parim referentsgeen, uuriti qPCR-i abil kolme levinuma koduhoidjageeni ekspressiooni:  $\beta$ -aktiin, *Gapdh* ning *HPRT1*. *HPRT1* geen ekspresseerus, võrreldes  $\beta$ -aktiin'i ning *Gapdh* geeniga kõigis uuritud valgetes vererakkudes väga madalal tasemel, mistõttu seda edasises analüüsis ei kasutatud. Võrreldes rakkude alapopulatsioone ei leitud statistiliselt olulist erinevust  $\beta$ -aktiini ja *Gapdh* ekspressioonis. Katsetulemuste analüüsil leiti, et kõikide katsealuste  $\beta$ -aktiin'i ekspressioon PBMC's, Tempus™ RNA's ning sorteeritud rakkude alapopulatsioonides on hajuvam kui *Gapdh* ekspressioon, millest tulenevalt jätkati edasisi katseid *Gapdh* koduhoidjageeniga (joonis 13).



**Joonis 13.**  $\beta$ -aktiin ja *Gapdh* koduhoidjageenide võrdlus. Y-skaalal on esitatud kolme paralleelse qPCR reaktsiooni tsüklite künnisväärtuse keskmine. Ülaindeks 1 tähitab  $\beta$ -aktiin'i ekspressiooni ning ülaindeks 2 *Gapdh* ekspressiooni. Andmed esitatud karp-vurrud (*box-whiskers*) diagrammina (0/25/75/100), kus välja toodud katsetulemuste mediaan.

## 10. Geeniekspressiooni võrdlus PBMC segust ja Tempus™ tuubist eraldatud RNA's

Pruul jt. töös, kus uuriti *CD28*, *CD80* ja *CD86* geenide ekspressiooni, kasutati kontrollisikute ja patsientide RNA eraldamiseks Tempus™ tuube. Kohe kui veri kanti tuubi, toimus rakkude lüüs ning RNAasid inaktiveerusid stabiliseeriva reagenti toimetel. Käesolevas töös võrreldi uuritavate geenide ekspressiooni Ficoll-Paque™ PLUS gradiendi abil eraldatud PBMC segus kui ka Tempus™ tuubi abil eraldatud rakkudes (Joonis 14). Geeniekspressiooni määramisel PBMC segus ja Tempus RNA tuubi meetodil selgus, et *CD28*, *CD28a*, *CD80*, *s2CD80* ja *sCTLA-4* ekspressiooni hajuvus on suurem PBMC's kuid, *fICTLA-4* ja *CD86* ekspressiooni hajuvus on sarnane. Enamasti on nii, et Tempus™ tuubist eraldatud RNA annab madalamaid ekspressiooniväärtusi kui Ficoll-gradiendil eraldatud PBMC-de RNA. Statistilise analüüsi tulemused näitasid, et kahe RNA eraldamismeetodi vahel on oluline erinevus *sCTLA-4* ja *s2CD80* ekspressiooni osas. Nimelt leiti, et *sCTLA-4* geeni ekspressioon on kõrgem Tempus™ RNA's ning *s2CD80* ekspressioon on madalam Tempus™ RNA's võrreldes PMBC'ga.

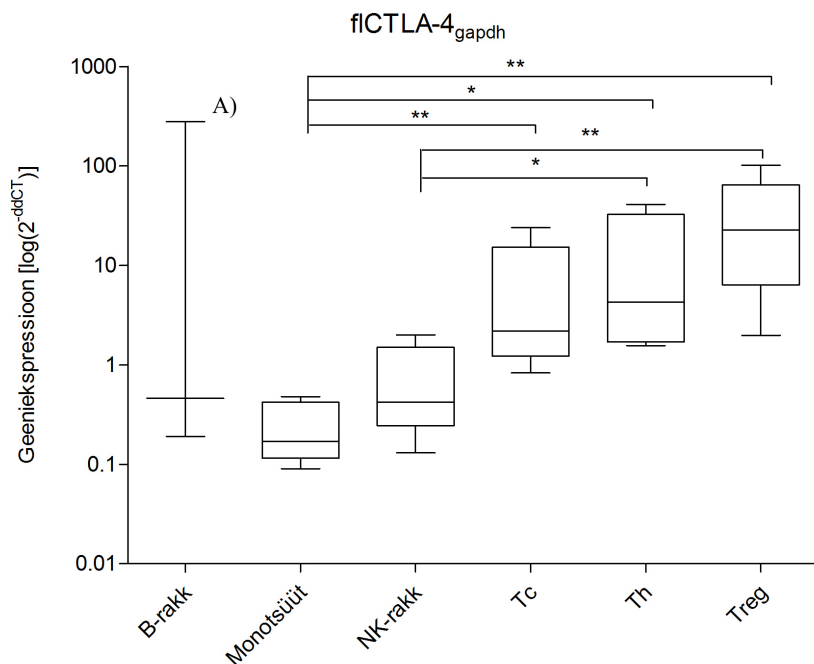


**Joonis 14.** Töös uuritud geenide ekspressiooni võrdlus kõikides mononukleaarsetes vererakkudes (PBMC) ja Tempus™ RNA tuubis. Joonisel toodud geeniekspressioon on standardiseeritult *Gapdh*'ga. Joonise Y-skaala on esitatud  $\log_{10}$  väärtuses ning peegeldab geeniekspressiooni. Statistiliselt olulised erinevused leiti *sCTLA-4* geenis ( $p$ -väärtus 0,0159) ja *s2CD80* geenis ( $p$ -väärtus 0,0421). \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ . Andmed esitatud karp-vurrud (*box-whiskers*) diagrammina (0/25/75/100), kus välja toodud katsetulemuste mediaan.

## 11. Geeniekspressioon alapopulatsioonides

Käesolevas töös määrati *CTLA-4*, *CD28*, *CD80* geenide ja nende splaissvariantide ning *CD86* ekspressioon PBMC segus ja sorteeritud rakkude alapopulatsioonides. Analüüsiti viit katsealust (K1-K5). Joonistel 15-21 on esitatud uuritud geenide ekspressioon (ddCT) monotsüütides (Mo), NK-rakkudes (NK), B-rakkudes (B), T-tsütotoksilistes rakkudes (Tc), T-abistaja rakkudes (Th) ning T-regulatoorsetes rakkudes (Treg).

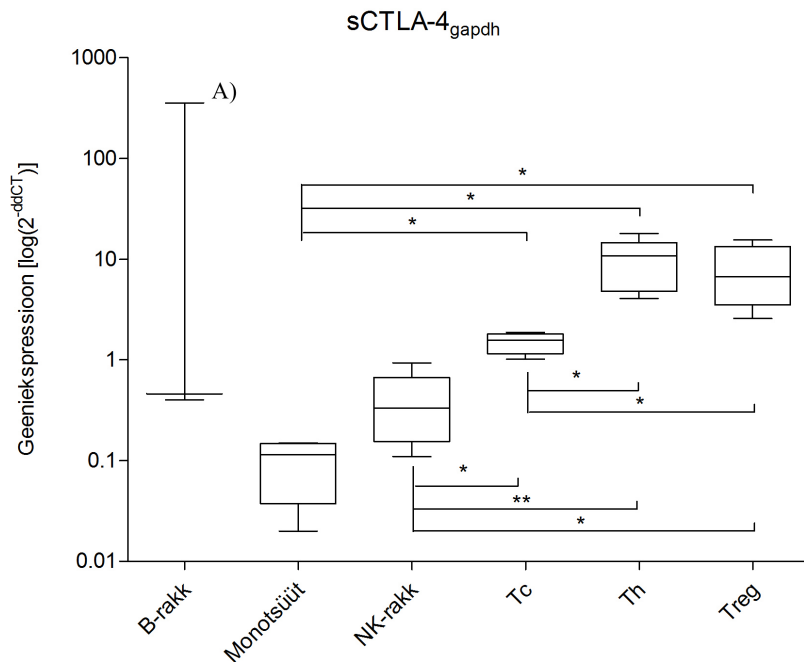
Täispika *CTLA-4* (*fICTLA-4*) geeni ekspressioon on statistiliselt oluliselt kõrgemal tasemel T-rakkude populatsioonides võrreldes monotsüütide ja NK-rakkudega. Jooniselt 15 on näha, et *fICTLA-4* geeni ekspressiooni mediaan on kõige kõrgem Treg rakkudes ja madalam Tc rakkudes, kuid see tendents ei osutunud statistiliselt oluliseks. Uurides *fICTLA-4* geeni avaldumist B-rakkudes selgus, et seda ei õnnestunud määrata katsealustel K1 ja K2 (joonis 15, A). Ülejäänud kolmel isikul on *fICTLA-4* ekspressioon B-rakkudes märkimisväärselt varieeruv. Katsealusel K5 on see kõige kõrgem ja ületab isegi T-rakkude vastava ekspressiooni.



**Joonis 15.** Viie katsealuse *fICTLA4* ekspressioon perifeerse vere rakupopulatsioonides. Joonisel toodud geeniekspressioon on standardiseeritud *Gapdh*'ga. Joonise Y-skaala on esitatud  $\log_{10}$  väärtuses ning peegeldab geeniekspressiooni. Statistilise olulisuse määramiseks kasutati Mann-

Whitney *U*-testi. Statistiliselt olulised erinevused leiti NK ja Th vahel ( $p$ -väärtus 0,0317); NK ja Treg vahel ( $p = 0,0159$ ); Mo ja Tc vahel ( $p = 0,0079$ ); Mo ja Th vahel ( $p = 0,0159$ ) ning Mo ja Treg vahel ( $p = 0,0079$ ). \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ . Katsealustes 1 ja 2 ei õnnestunud tuvastada *fICTLA-4* ekspressiooni B-rakkudes. Andmed esitatud karp-vurrud (*box-whiskers*) diagrammina (0/25/75/100), kus välja toodud katsetulemuste mediaan.

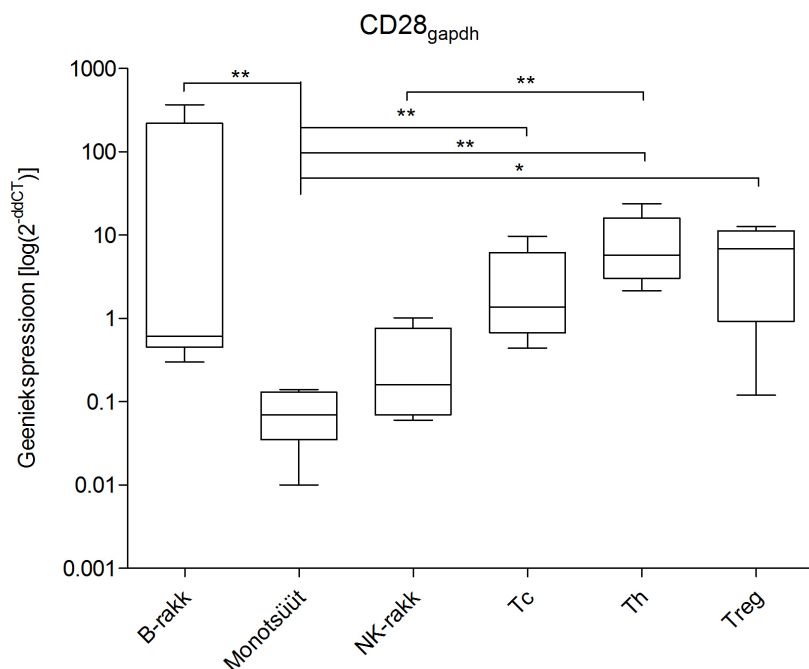
Joonisel 16 on esitatud *sCTLA-4* geeniekspressioon standardiseeritult *Gapdh*'ga. Kõige kõrgem *sCTLA-4* ekspressioon leiti T-rakkude alapopulatsioonides, kusjuures see oli väiksem NK-rakkudes ning monotsüütides. Selle geeni avaldumist katsealuste K1 ja K3 B-rakkudes ei õnnestunud määrata (joonis 16, A). Kõige kõrgem *sCTLA-4* ekspressioon tuvastati katsealuse K5 B-rakkudes. *fICTLA-4* geeni ja *sCTLA-4* geeni ekspressioon oli T-rakkude alapopulatsioonides erinev. Nimetatud splaissvariandi ekspressioon on statistiliselt oluliselt madalam Tc rakkudes, kui Treg ja Th rakkudes. Selline tulemus viitab *sCTLA-4* ja *fICTLA-4* erinevale regulatsioonile T-rakkude alapopulatsioonides.



**Joonis 16.** Viie katsealuse *sCTLA-4* ekspressioon perifeerse vere rakupopulatsioonides. Joonisel toodud geeniekspressioon standardiseeritult *Gapdh*'ga. Joonise Y-skaala on esitatud  $\log_{10}$  väärtuses ning peegeldab geeniekspressiooni. Statistilise olulisuse määramiseks kasutati Mann-Whitney *U*-testi. Statistiliselt olulised erinevused leiti Mo ja Tc vahel ( $p = 0,0286$ ); Mo ja Th vahel ( $p = 0,0159$ ); Mo ja Treg vahel ( $p = 0,0286$ ); NK ja Tc vahel, ( $p = 0,0159$ ); NK ja Th vahel ( $p = 0,0079$ ); NK ja Treg vahel ( $p = 0,0159$ ); Tc ja Th vahel ( $p = 0,0159$ ) ning Tc ja Treg vahel ( $p = 0,0286$ ). \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ . Katsealustes 1 ja 3 ei õnnestunud tuvastada *sCTLA-4*

ekspressiooni B-rakkudes. Andmed esitatud karp-vurrud (*box-whiskers*) diagrammina (0/25/75/100), kus välja toodud katsetulemuste mediaan.

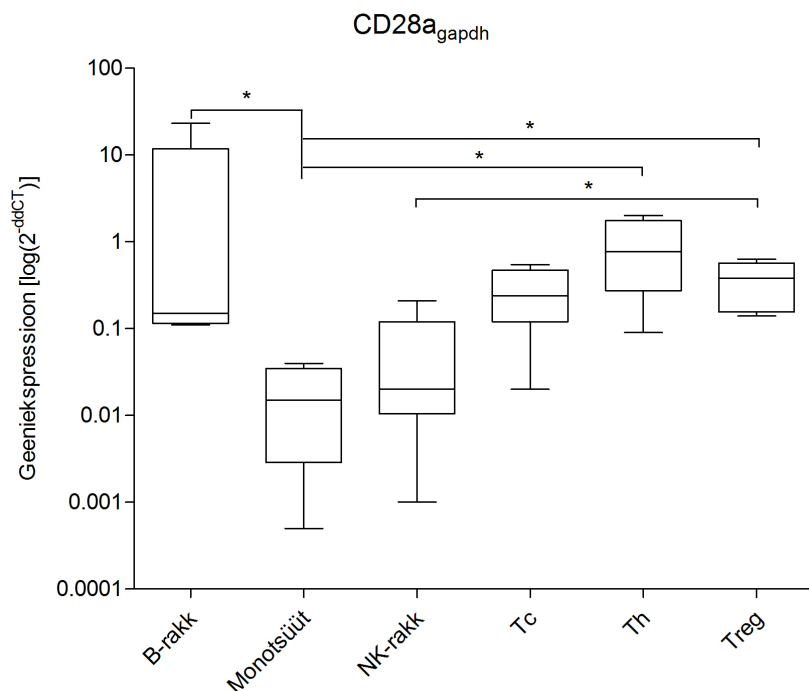
Joonisel 17 on esitatud *CD28* geeniekspressioon standardiseeritult *Gapdh*'ga. Leiti, et *CD28* ekspressioon on T-rakkude populatsioonides statistiliselt oluliselt kõrgem, kui NK-rakkudes või monotsüütides. Väga kõrge *CD28* ekspressioon tuvastati ka B-rakkudes.



**Joonis 17.** *CD28* ekspressioon perifeerse vere rakupopulatsioonides. Joonisel toodud geeniekspressioon standardiseeritult *Gapdh*'ga. Joonise Y-skaala on esitatud log<sub>10</sub> väärtuses ning peegeldab geeniekspressiooni. Statistilise olulisuse määramiseks kasutati Mann-Whitney *U*-testi. Statistiliselt olulised erinevused leiti Mo ja B vahel ( $p = 0,0079$ ); Mo ja Treg vahel ( $p = 0,0278$ ); Mo ja Th vahel ( $p = 0,0079$ ); Mo ja Tc vahel ( $p = 0,0079$ ) ning NK ja Th vahel ( $p = 0,0079$ ). \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ . Andmed esitatud karp-vurrud (*box-whiskers*) diagrammina (0/25/75/100), kus välja toodud katsetulemuste mediaan.

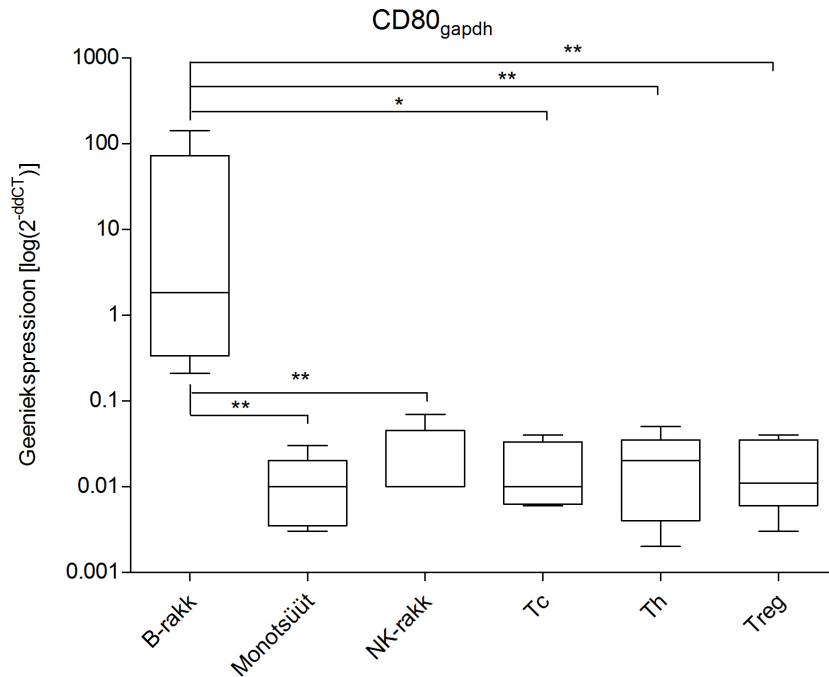
Joonisel 18 on esitatud splaissvariandi *CD28a* geeniekspressioon standardiseeritult *Gapdh*'ga. Sarnaselt *CD28*'ga on *CD28a* ekspressioon T-rakkude alapopulatsioonides kõrgem kui NK-rakkudes ning monotsüütides, samas kui selle geeni avaldumine võrreldes *CD28*'ga on T-rakkudes, NK-rakkudes ning monotsüütides madalam. Katsealuse K5 B-rakkudes leiti ligikaudu 20x tugevam ekspressioon, kui katsealuste K1-K4 rakkudes. T-rakkude populatsioonides esines

kõige kõrgem *CD28a* ekspressioon katsealustel K2 ja K4. NK-rakkudes leiti kõrgeim ekspressioon K2'l.



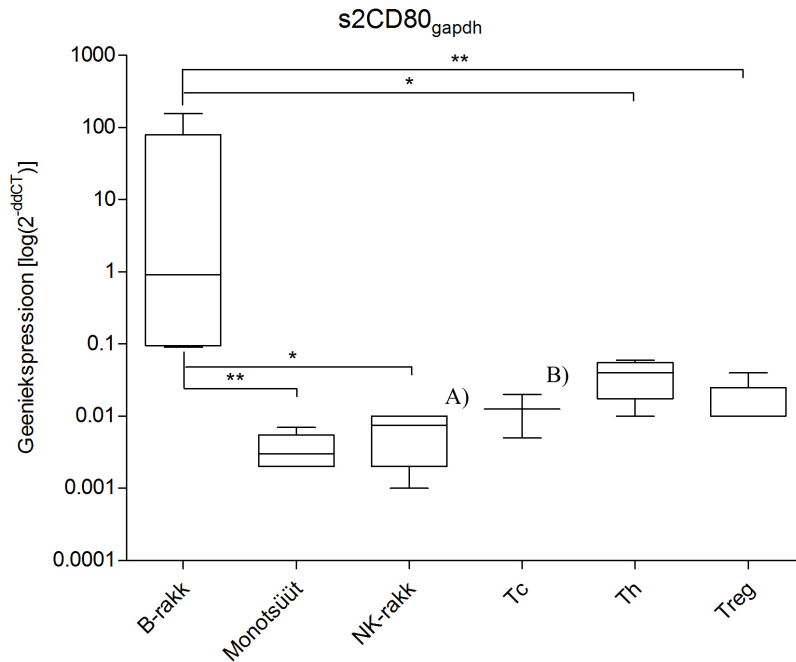
**Joonis 18.** Viie katsealuse *CD28a* ekspressioon perifeerse vere rakupopulatsioonides. Joonisel toodud geeniekspressioon standardiseeritult *Gapdh*'ga. Joonise Y-skaala on esitatud  $\log_{10}$  väärtuses ning peegeldab geeniekspressiooni. Statistilise olulisuse määramiseks kasutati Mann-Whitney *U*-testi. Statistiliselt olulised erinevused leiti Mo ja B vahel ( $p = 0,0159$ ); Mo ja Th vahel ( $p = 0,0159$ ); Mo ja Treg vahel ( $p = 0,0159$ ) ning NK ja Treg vahel ( $p = 0,0362$ ). \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ . Andmed esitatud karp-vurrud (*box-whiskers*) diagrammina (0/25/75/100), kus välja toodud katsetulemuste mediaan.

Joonisel 19 on esitatud *CD80* geeniekspressioon standardiseeritult *Gapdh*'ga. Katsete tulemusena tuvatati suhteliselt madal *CD80* geeni ekspressioon monotsüütides, NK-rakkudes ning kõigis T-rakkude populatsioonides. B-rakkudes oli nimetatud geeni ekspressioon statistiliselt oluliselt kõrgem. Seejuures ekspresseerivad katsealuse K5 B-rakud *CD80* geeni mitukümmend korda enam kui katsealuste K1-K4 B-rakud.



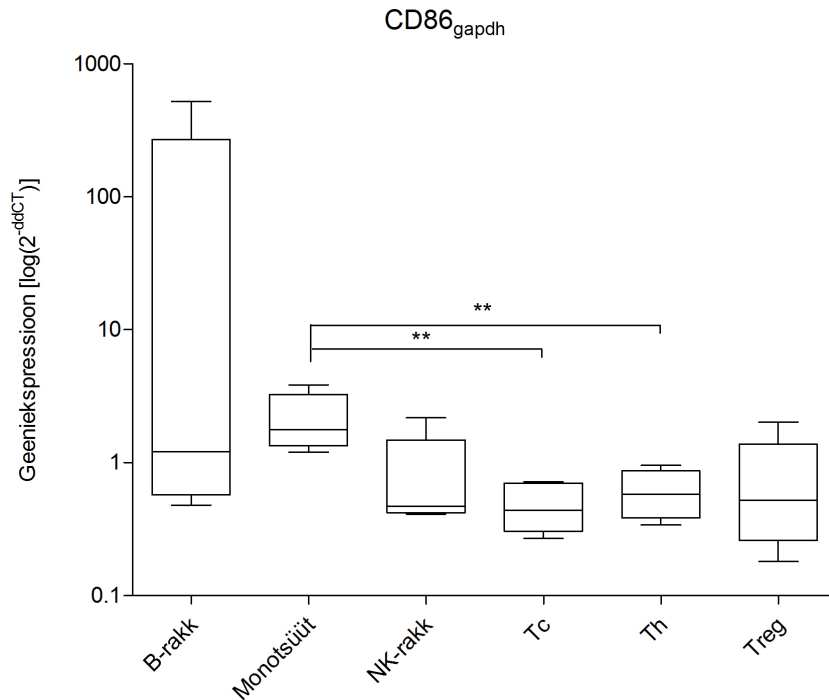
**Joonis 19.** Viie katsealuse *CD80* ekspressioon perifeerse vere rakupopulatsioonides. Joonisel toodud geeniekspressioon standardiseeritult *Gapdh*'ga. Joonise Y-skaala on esitatud  $\log_{10}$  väärtuses ning peegeldab geeniekspressiooni. Statistilise olulisuse määramiseks kasutati Mann-Whitney *U*-testi. Statistiliselt olulised erinevused leiti B ja Mo vahel ( $p = 0,0079$ ); B ja NK vahel ( $p = 0,0079$ ); B ja Treg vahel ( $p = 0,0079$ ); B ja Th vahel ( $p = 0,0079$ ) ning B ja Tc vahel ( $p = 0,0159$ ). \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ . Andmed esitatud karp-vurrud (*box-whiskers*) diagrammina (0/25/75/100), kus välja toodud katsetulemuste mediaan.

Joonisel 20 on esitatud *s2CD80* geeniekspressioon standardiseeritult *Gapdh*'ga. Leiti, et sarnaselt *CD80*'ga on *s2CD80* geeni ekspressioon monotsüütides, NK-rakkudes ning T-rakkude populatsioonides võrreldes B-rakkudega statistiliselt oluline madalam. Samuti tuvastati selle geeni kõrgeim ekspressioon tase katsealuse K5 B-rakkudes. Uurides *s2CD80* geeni avaldumist NK rakkudes ja Tc rakkudes selgus, et seda ei õnnestunud määrata katsealusel K5 ja katsealustel K1, K4 ning K5 (joonis 20, A; B).



**Joonis 20.** Viie katsealuse *s2CD80* ekspressioon perifeerse vere rakupopulatsioonides. Joonisel toodud geeniekspressioon standardiseeritult *Gapdh*'ga. Joonise Y-skaala on esitatud  $\log_{10}$  väärtuses ning peegeldab geeniekspressiooni. Statistilise olulisuse määramiseks kasutati Mann-Whitney *U*-testi. Statistiliselt olulised erinevused leiti B ja Mo vahel ( $p = 0,0079$ ); B ja NK vahel ( $p = 0,0159$ ); B ja Th vahel ( $p = 0,0159$ ) ning B ja Treg vahel ( $p = 0,0079$ ). \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ . *s2CD80* ekspressiooni ei õnnestunud tuvastada katsealuse K5 NK rakkudes ning katsealuste K1, K4 ja K5 Tc rakkudes. Andmed esitatud karp-vurrud (*box-whiskers*) diagrammina (0/25/75/100), kus välja toodud katsetulemuste mediaan.

Joonisel 21 on esitatud *CD86* geeniekspressioon standardiseeritult *Gapdh*'ga. *CD86* geen avaldub NK-rakkudes ning T-rakkude populatsioonides väga madalal tasemel. Monotsüütides on *CD86* geeni ekspressioon statistiliselt oluliselt kõrgem kui Tc ja Th rakkudes. Leiti, et *CD86* geeni ekspressioon B-rakkudes on väga varieeruv – olles katsealusel K5 sadu kordi kõrgem, kui katsealusel K3.



**Joonis 21.** Viie katsealuse  $CD86$  ekspressioon perifeerse vere rakupopulatsioonides. Joonisel toodud geeniekspressioon standardiseeritult  $Gapdh$ 'ga. Joonise Y-skaala on esitatud  $\log_{10}$  väärtuses ning peegeldab geeniekspressiooni. Statistilise olulisuse määramiseks kasutati Mann-Whitney  $U$ -testi. Statistiliselt olulised erinevused leiti Mo ja Tc vahel ( $p = 0,0079$ ) ning Mo ja Th vahel ( $p = 0,0079$ ). \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ . Andmed esitatud karp-vurrud (*box-whiskers*) diagrammina (0/25/75/100), kus välja toodud katsetulemuste mediaan.

## TULEMUSED JA ARUTELU

Immuunsünapsi molekulidel on oluline mõju immuunsüsteemi reguleerimises, seda nii aktivatsiooni kui ka supressiooni korral. Sellest tulenevalt on immunoloogilistes uuringutes just *CTLA-4*, *CD28*, *CD80* ning *CD86* ekspressiooni ning funktsioonide analüüsimine tähtsal kohal. Selleks, et uurida nimetatud molekulide ekspressiooni perifeersetes mononukleaarsetes vererakkudes, analüüsiti käesolevas töös geenide avaldumist viie katsealuse vereproovist eraldatud lümfotsüütides. Nende geenide ekspressioon määrati perifeersete mononukleaarsete vererakkude segus (PBMC), Tempus™ RNA tuubis kui ka läbivoolu tsütofluorimeetria abil sorteeritud lümfotsüütide alapopulatsioonides.

Geeniekspressiooni uurimisel rakkudes qPCR-i meetodi abil on äärmiselt tähtis õige koduhoidjageeni valik. Koduhoidjageenid on geenid, mis on vajalikud raku esmaste funktsioonide tagamiseks, mistõttu eeldatakse nende ühtlast ekspressiooni kõikides rakkudes ning kõikidel tingimustel (Eisenberg ja Levanon, 2013). Tegelikult võib nende geenide ekspressioon erinevate rakkude, kudede ning tingimuste puhul varieeruda (Silver jt., 2006). Samuti on kontrollgeenide kasutamisel probleemiks nende pseudogeeniid (Sun jt., 2012). Seega koduhoidjageenide õige valik sellistes töödes, kus uuritakse geeniekspressiooni, on ülimalt oluline (Silver jt., 2006). Sun jt. tuvastasid koduhoidjageene käsitlevas töös 64  $\beta$ -aktiin-i pseudogeeni, 67 *Gapdh* pseudogeeni ning 3 *HPRT1* pseudogeeni, mis võivad mõjutada koduhoidjageeni ekspressiooni taseme hindamist (Sun jt., 2012). Silver jt. uurisid 6 koduhoidjageeni, sealhulgas ka  $\beta$ -aktiin-i ning *Gapdh* ekspressiooni perifeersetes retikulotsüütides. Katsete tulemused näitasid, et *Gapdh-1* oli võrreldavatest geenidest kõige stabiilsem ekspressioon (Silver jt., 2006). Käesolevas töös kaasati uuringusse algselt 3 koduhoidjageeni:  $\beta$ -aktiin, *Gapdh* ning *HPRT1*, millest viimane välistati edasistest katsetest madala ekspressiooni tõttu. *Gapdh* tulemused näitasid väiksemat hajuvust, võrreldes  $\beta$ -aktiin-i geeniga, millest tulenevalt jätkati katseid *Gapdh*'ga.

Varasemates töödes on kasutatud mitmeid meetodeid RNA puhastamiseks vererakkudest, kaasa arvatud Ficoll'i abil PMBC eraldamise meetodit ning Tempus™ täisvere RNA tuubi meetodit

(Joehanes jt., 2011; Menke jt., 2012). On teada, et PBMC'de eraldamisele kulub ligikaudu 2 tundi, mille käigus RNA molekulid võivad kahjustuda, mis kajastub geeniekspressiooni varieeruvuses ning on selle meetodi puuduseks (Rainen jt., 2002; Thach jt., 2003). Täisvere lisamisel Tempus™ tuubi stabiliseeruvad RNA molekulid koheselt, mis on selle meetodi eeliseks (Shou jt., 2005). Antud magistritöös uuriti geeniekspressiooni, kasutades mõlemat meetodit. Statistiliselt oluline erinevus kahe meetodi vahel tuvastati *sCTLA-4* ning *s2CD80* ekspressiooni puhul. Selgus, et Ficoll'i abil isoleeritud PBMC'de puhul oli geeniekspressioon kõrgem ja varieeruvam, kuid vähene katsealuste arv ei võimalda seda statistiliselt tõeseks pidada. Seetõttu ei saanud me eelistada kumbagi meetodit. Geeniekspressiooni õigeks määramiseks vererakkudes tuleb valida sobiv meetod vastavalt katsete olemusest. Näiteks *in vitro* uuringuteks soovitatakse Tempus™ RNA tuubi kasutus vältida (Rollins jt., 2010). Samuti ei võimalda Tempus™ RNA tuub määrata mingile rakutüübile spetsiifilist geeniekspressiooni.

*fiCTLA-4* ning *sCTLA-4* geenide puhul tuvastati mõlema kõrge ekspressioon T-rakkude populatsioonides (Tc, Th ja Treg), võrreldes monotsüütidega ning NK-rakkudega. Selgus, et *fiCTLA-4* ekspressioon on kõige kõrgem Treg rakkudes ning kõige madalam Tc rakkudes. *fiCTLA-4* kõrget ekspressiooni taset T-rakkudes on näidanud mitmed eelnevad tööd (Jago jt., 2004; Lindsten jt., 1993; Brunet jt., 1987). Treg rakkudes paikneb *fiCTLA-4* valk membraanilähedastes vesiikulites, mille transport raku pinnale on pidev ning aktiivne protsess. Võrdlusena on teada, et Tkonv rakkudes paikneb *fiCTLA-4* valk perinukleaarsetes Golgi vesiikulites, mille transport raku pinnale vajab TCR signaali (Tai jt., 2012). Antud töös ei tuvastatud Treg ja Tkonv rakkudes *fiCTLA-4* ekspressioonis statistiliselt olulist erinevust, ent esines geeni kõrgem ekspressioon Treg rakkudes, mis vastab Tai jt. töös leitud, et *fiCTLA-4* ekspresseerub Treg rakkudes (Zheng 2006; Schmidt 2009; Wing 2008; Miller jt., 2009; Chan jt., 2014), aga ka Tc ja Th rakkudes (Chan jt., 2014). *sCTLA-4* geeni ekspressioon Th ja Treg rakkudes leiti statistiliselt oluliselt kõrgem, kui Tc rakkudes. *sCTLA-4* geeni ekspressiooni on leitud puhkavates Th kui ka Tc rakkudes (Oaks jt., 2000), kusjuures see on kõige kõrgem Treg rakkudes (Ward jt., 2013). Visuaalsel hinnangul on *fiCTLA-4* geeni ekspressioon T-rakkude populatsioonides hajuvam, kui *sCLTA-4* geeni ekspressioon. Nimetatud erinevused näitavad splassivariandi erinevat regulatsiooni võrreldes täispika variandiga.

*CD28* ja *CD28a* ekspressiooni analüüsidest leiti, et need geenid ekspresseeruvad T-rakkude populatsioonides kõrgemal tasemel võrrelduna monotsüütidega ning NK-rakkudega. *CD28* geeni ekspressiooni T-rakkudes on põhjalikult uuritud (Magistrelli jt., 1999; Vallejo jt., 1999; Ma jt., 2004; Sansom ja Walker, 2006). Lisaks leidsid Magistrelli jt., et *CD28* geeni ekspressioon puhkavates ja aktiivsetes T-rakkudes ei erine. Aktivatsiooniks vajaliku geenina ekspresseerub *CD28* praktiliselt kõikides Th rakkudes ning ~50% Tc rakkudes (Berg ja Zavazava, 2008). Samas *CD28a* ekspresseerub kõrgemal tasemel puhkavates ja madalamal tasemel aktiivsetes T-rakkudes. Samuti on kirjeldatud *CD28a* geeni ekspressiooni T-rakkudes (Magistrelli jt., 1999). Käesolevas töös leiti kõikides katsealustes kõrgem *CD28* geeni ekspressioon võrreldes *CD28a* geeniga, millest järeldub Magistrelli jt. tööle toetudes, et katsealuste organismis leidis rohkem aktiivseid T-rakke. *CD28* geeni ekspressioon on tuvastatud loote perifeerse vere NK-rakkudes (Sanchez jt., 1993), ent mitte täiskasvanud inimese vere NK-rakkudes. Geeni ekspressioon on tuvastatud akuutse lümfoomi patsiendilt eraldatud NK-rakkude liinis (Lanier jt., 1995; Azuma jt., 1992). Seega on *CD28* valgul signaalretseptorina potentsiaalset rolli NK-rakkude pinnal. Käesolevas töös uuriti *CD28* geeni ekspressiooni tervetes isikutes ja leiti sarnaselt varasemale, et *CD28* geeni mõlemad splaissvariandid ekspresseeruvad NK-rakkudes väga madalal tasemel.

Analüüsidest *CD80* ja *s2CD80* geenide ekspressiooni monotsüütides, NK-rakkudes ning T-rakkude populatsioonides on näha, et nende geenide ekspressioon on madal. Kuigi *CD86* geeni ekspressioon nimetatud rakkudes leiti kõrgem kui *CD80* geeni ekspressioon. Varasemates uuringutes on leitud, et *CD86* ekspressioon monotsüütides on oluliselt ulatuslikum ning kiirema kineetikaga kui *CD80* ekspressioon (Azuma jt., 1992). Käesoleva töö kirjanduse osas toodi välja, et *CD80* molekul ei ekspresseeru inaktiivsetes monotsüütides (Hathcock jt., 1994) kuid *CD86* geen ekspresseerub nimetatud rakkudes (Boussiotis jt., 1993). Käesolevas töös tuvastati väga madal *CD80* ekspressioon ning keskmine *CD86* ekspressioon monotsüütides, millest järeldub, et katsealuste vererakkude hulgas leidis inaktiivseid monotsüüte rohkem kui aktiivseid. Paine jt. näitasid, et Th kui ka Tc rakud ekspresseerivad *CD86*, aga mitte *CD80* molekuli IL-2 juuresolekul *in vitro*, kui ka IL-2 teraapia ajal *in vivo* (Paine jt., 2012). Põletiku koldes võib *CD86* molekulil olla aktiveeritud T-raku pinnal regulatoorne funktsioon, sest ta võib seostuda *fiCTLA-4* molekuliga, mis ekspresseerub samuti aktiveeritud T-raku pinnal (McCoy ja Le Gros, 1999). Seega on tõenäoline, et IL-2 vahendatud *CD86* ekspressioon T-rakkudes kontrollib IL-2

vahendatud autoimmuunsust kui ka põletiku teket ning takistab koe kahjustust (Paine jt., 2012). Selliseid töid, kus oleks uuritud *CD80* ja *CD86* geenide ekspressiooni NK-rakkudes ning Treg'des ei õnnestunud kirjandusest leida, mis tõttu vajab nimetatud geenide ekspressioon antud raku alapopulatsioonides edasist uurimist.

Käesolevas töös eraldatud vererakkude alapopulatsioonide osas esines uuritavate geenide kõige hajuvam ekspressiooni muster B-rakkudes. Tänapäevaks on tõendeid, mis viitavad *flCTLA-4* ekspressioonile B-rakkudes. Quandt jt. uurisid *flCTLA-4* ekspressiooni hiire põrnast eraldatud B-rakkudes ning leidsid, et kui B-rakke kasvatada koos aktiveeritud T-rakkudega, ekspresseerivad nad *flCTLA-4* molekuli (Quandt jt., 2007). See tulemus langeb kokku eelnevate töödega, mille käigus uuriti *flCTLA-4* ekspressiooni inimese B-rakkudes (Kuiper jt., 1995). Intratsellulaarne *flCTLA-4* on tuvastatav 15-20% B-rakkudes 48-72h pärast stimulatsiooni ning see molekul ekspresseerub 15% B-rakkude pinnal (Quandt jt., 2007). Järgnevalt tekkis küsimus, kas B-rakk ekspresseerib *flCTLA-4* molekuli või eemaldab molekuli T-raku pinnalt. Mitmed tööd on näidanud, et pinnamarkerite transendotsütoos T-rakkude ning APC'de vahel toimub ühes suunas, välistades B-rakkude võime eemaldada *flCTLA-4* molekule T-rakkude pinnalt (Sprenst, 2005 ja Sabzevari jt., 2001). Sellest tulenevalt arvatakse, et *flCTLA-4* ja *CD80/86* molekulide seostumine on üheks signaaliks, mis algatab *flCTLA-4* ekspressiooni B-rakkudes (Quandt jt., 2007). *flCTLA-4* puudulikud B-rakud toodavad rohkem antikehasid võrreldes *flCTLA-4* ekspresseerivate B-rakkudega, millest järeldub, et *flCTLA-4* ekspresseerumine B-rakkude pinnal pidurdab raku efektorfunktsioone (Maszyna jt., 2003; Brunner jt., 1999; Chen jt., 1998).

Njau jt. leidsid, et *CD28* ekspresseerub antikehi sekreteerivatel B-rakkudel ehk plasmarakkudel. Töös leiti, et *CD28<sup>-/-</sup>* plasmarakkudel on võrreldes metsiktüüpi rakkudega pikem elumus, mis näitab *CD28* molekuli plasmarakkudes ekspresseerumise negatiivset mõju (Njau jt., 2011). Viiteid *CD28a* ekspressiooni kohta B-rakkudes ei õnnestunud kirjandusest leida. Kuivõrd Magistrelli jt. töös näidati, et *CD28* ja *CD28a* võivad puhkavates T-rakkudes ekspresseeruda võrdselt (Magistrelli jt., 1999), siis võib püstitada edasist uurimist vajava hüpoteesi, et *CD28a* ekspresseerub ka plasmarakkudes ning tal on *CD28*'ga sarnane funktsioon.

Käesoleva töö käigus leiti, et *CD80* ja *CD86* ekspressioon on katsealuste B-rakkudes varieeruv. Toetudes Pelletier jt. tehtud tööle, mille kohaselt *CD80* ja *CD86* ekspresseeruvad plasmarakkudes

(Pelletier jt., 2010) ning toetudes Njau jt. tööle, mille kohaselt on tuvastatud CD28 ekspressioon plasmarakkudes (Njau jt., 2011) võib eeldada, et katsealustel on plasmarakkude hulk veres varieeruv.

Antud magistritöös leiti kõikide geenide väga kõrge ekspressioon viienda katsealuse B-rakkudes. Erinevus teiste katsealustega tuleneb *Gapdh* geeni madalast ekspressioonist viienda katsealuse B-rakkudes, sest kolme paralleeli keskmine Ct väärtus oli 30,01. Teistes viienda katsealuse rakkude alapopulatsioonides jäi *Gapdh* ekspressioon vahemikku 17,72 – 21,56. Sellest tulenevalt püstitati edasist uurimist vajavad hüpoteesid:

- a) CTLA-4 ekspressioon viienda katsealuse B-rakkudes on tingitud CTLA-4 ja CD80/86 molekulide seostumisest;
- b) Viienda katsealuse B-rakkude hulgas on teiste katsealustega võrreldes rohkem CD28, CD80 ja CD86 molekule ekspresseerivaid plasmarakke;
- c) Viienda katsealuse B-rakkudes on glükoosi metabolism madalam;
- d) Viienda katsealuse B-rakkudes oli tuvastatav oluliselt kõrgem geenide ekspressiooni tase.

Lähtuvalt käesoleva töö tulemustest järeldub, et immuunsünapsi geenide ekspressiooni määramine valgetes vererakkudes vajab edasist uurimist. Immuunsünapsi molekulide ekspressiooni uurimine tervete isikute perifeersetes mononukleaarsetes rakkudes on vajalik selleks, et analüüsida autoimmuunse tüüp 1 diabeedi patsientide vereproovide piisava täpsusega. Eriti oluline on leida usaldatavaid tulemusi andev metodoloogiline lähenemine.

## KOKKUVÕTE JA JÄRELDUSED

Käesolevas töös uuriti nelja olulise immuunsünapsi molekuli (CTLA-4, CD28, CD80 ning CD86) ekspressiooni määravate geenide taset tervete isikute perifeersetes mononukleaarsetes vererakkudes. Uuringusse kaasati ka sCTLA-4, CD28a ning s2CD80 valke määravate geenide splaissvariandid. T-rakkude retseptorid CTLA-4 ja CD28 seostuvad antigeeni esitlevate rakkude pinnal olevate CD80 ning CD86 ligandidega ning edastavad vastavalt supresseerivaid või aktiveerivaid signaale, mis reguleerivad immuunsüsteemi käitumist. Geeniekspressiooni uuriti ja võrreldi kõikide perifeersete mononukleaarsete vererakkude (PBMC) ning Tempus™ vere RNA tuubi vahel. Selleks, et analüüsida rakuspetsiifilist geeniekspressiooni eraldati kõikide valgete vererakkude segust 6 alapopulatsiooni: B-rakud, monotsüüdid, NK-rakud, tsütotoksilised T-rakud, abistaja T-rakud ning regulatoorsed T-rakud. Geeniekspressiooni uurimiseks viidi läbi reaal-aja PCR, kusjuures uuritud geenide ekspressiooni taset võrreldi *Gapdh* koduhoidjageeniga ning katsetulemused esitati kasutades  $2^{-ddCT}$  meetodit.

Saadud tulemused võib kokku võtta järgmiselt:

1. Analüüsides kolme koduhoidjageeni ( $\beta$ -aktiin, *Gapdh*, *HPRT1*) välistati madala ekspressiooni tõttu katsetest *HPRT1* geen.  $\beta$ -aktiini geeni ning *Gapdh* võrdlusel ei leitud statistiliselt olulist erinevust, ent edasised katsed teostati siiski *Gapdh* geeniga ekspressiooni väiksema hajuvuse tõttu.
2. Hoolimata PBMC ning Tempus™ vere RNA tuubi meetodite puudustest leiti, et nende vahel on geeniekspressiooni uurimise seisukohalt kõigest kaks statistiliselt olulist erinevust. Sellest tulenevalt ei tehtud eelistust ühe meetodi kasuks.
3. Perifeerse vere preparaatidest eraldatud vererakkude alapopulatsioonide võrdlusel leiti mitmed statistiliselt olulised erinevused *fICTLA-4*, *sCTLA-4*, *CD28*, *CD28a*, *CD80*, *s2CD80* ning *CD86* geenide ekspressiooni tasemetes. T-rakkude alapopulatsioonides tuvastati kõrge *fICTLA-4*, *sCTLA-4*, *CD28* ja *CD28a* ning madal *CD80*, *s2CD80* ja *CD86* ekspressioon. B-rakkudes leiti kõrge *CD80*, *s2CD80* ja *CD86* ekspressioon. Monotsüütides esines madal *CD80* ja *s2CD80* ning kõrge *CD86* ekspressioon, mis viitab *CD80* ja *CD86* erinevale regulatsioonile antigeene presenteerivates rakkudes.
4. Meie poolt väljatöötatud metoodika on edaspidi kasutatav diabeedihaigete uurimises.

## Expression and function analysis of 4 immunological synapse molecules (CTLA-4, CD28, CD80 and CD86)

### SUMMARY

In recent work expression and function of four immunological synapse molecules (CTLA-4, CD28, CD80 and CD86) were analysed in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) isolated from healthy individuals. sCTLA-4, CD28a and s2CD80 splice variants were also involved in the experiments. T-cell receptors CTLA-4 and CD28 interact with CD80 and CD86 ligands on antigen presenting cells and deliver suppressive and activating signals to the immune system, respectively. Expression of the mentioned genes was analysed and compared between peripheral blood monocytes (PBMC's) and whole blood Tempus™ blood RNA tubes. To determine cell specific expression we separated B-cells, monocytes, NK-cells, cytotoxic T-cells, helper T-cells and regulatory T-cells from total PBMC's. Expression was analysed using RT-PCR method, compared to *Gapdh* housekeeping gene expression and summarized using  $2^{-ddCT}$  method.

Based on the results obtained in the current study, the following conclusions were made:

1. Three housekeeping genes were analysed (*β-actin*, *Gapdh*, *HPRT1*) and the latter was excluded from further experiments due to low expression. Comparing *β-actin* and *Gapdh* expression no statistical significance was observed, however *Gapdh* gene was used due to smaller dispersion in expression.
2. Despite the shortage of PBMC and Tempus™ methods only two statistical significances were observed. As a result we did not favour between the two methods.
3. Comparing gene expression between the divided populations many statistically significant observations were made in *fCTLA-4*, *sCTLA-4*, *CD28*, *CD28a*, *CD80*, *s2CD80* and *CD86* genes. We found that *fCTLA-4*, *sCTLA-4*, *CD28* and *CD28a* expression was higher than *CD80*, *s2CD80* and *CD86* expression in T-cell subpopulations. In B-cells we found high expression of *CD80*, *s2CD80* and *CD86* genes. And in monocytes we detected low *CD80* and *s2CD80* expression compared to high *CD86* expression, which suggests that *CD80* and *CD86* genes are differentially regulated in antigen presenting cells.
4. Developed methods have a potential use in upcoming diabetic researches.

## TÄNUAVALDUSED

Esmalt tänan oma juhendajat Kalle Kisandit, kellega koos asusime antud tööd planeerima ning teostama. Mõneti pikale veninud koosolekutelt sain alati eelkõige vajalikke nõuandeid edasiseks tööks, aga ka huvitavaid teadusvaldkondlikke teadmisi.

Sügava tänuavalduse saab ka Katrin Pruul, kelle eksperimentaalsete katsete õpetused ning turgutavad kommentaarid olid hädavajalikud.

Samuti tänan oma kaasjuhendajat Sulev Ingerpuud, kelle täpseid kommentaare ja nõuandeid pean meeles iga järgneva teadustöö kirjutamisel.

Olulise tänu võlgnen Maarja Grünbachile, kelle kiitvad sõnad ja motiveerivad mõtteterad aitasid tööd viimistleda ka kõige viimastel hetkedel.

## KASUTATUD KIRJANDUS

- Anjos, S., Nguyen, A., Ounissi-Benkalha, H., Tessier, M.C. and Polychronakos, C. (2002). A common autoimmunity predisposing signal peptide variant of the cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 results in inefficient glycosylation of the susceptibility allele. *J. Biol. Chem.* 277:46478–46486.
- Appleman, L.J. and Boussiotis, V.A. (2003). T cell anergy and costimulation. *Immunol. Rev.* 192:161–180.
- Aruffo, A. and Seed, B. (1987). Molecular cloning of a CD28 cDNA by a high-efficiency COS cell expression system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84:8573- 8577.
- Azuma, M., Cayabyab, M., Buck, D., Phillips, J.H. and Lanier, L.L. (1992). Involvement of CD28 in major histocompatibility complex-unrestricted cytotoxicity mediated by a human NK leukemia cell line. *J. Immunol.* 149:1115–1123.
- Azuma, M., Ito, D., Yagita, H., Okumura, K., Phillips, J.H., Lanier, L.L. and Somoza, C. (1993). B70 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD28. *Nature* 366:76–79.
- Bachmann, M.F., Köhler, G., Ecabert, B., Mak, T.W. and Kopf, M. (1999). Cutting edge: lymphoproliferative disease in the absence of CTLA-4 is not T cell autonomous. *J. Immunol.* 163:1128–1131.
- Bachmann, M.F., Gallimore, A., Jones, E., Ecabert, B., Acha-Orbea, H. and Kopf, M. (2001). Normal pathogen-specific immune responses mounted by CTLA-4-deficient T cells: a paradigm reconsidered. *Eur. J. Immunol.* 31:450–458.
- Berg, M. and Zavazava, N. (2008). Regulation of CD28 expression on CD8<sup>+</sup> T cells by CTLA-4. *J. Leukoc. Biol.* 83:853-863.
- Boise, L.H., González-García, M., Postema, C.E., Ding, L., Lindsten, T., Turka, L.A., Mao, X., Nuñez, G. and Thompson, C.B. (1993). Bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 74:597–608.
- Boussiotis, V.A., Freeman, G.J., Gribben, J.G., Daley, J., Gray, G.S. and Nadler, L.M. (1993). Activated human B lymphocytes express three CTLA-4 counterreceptors that costimulate T-cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:11059–11063.
- Bromley, S. K., Burack, W. R., Johnson, K. G., Somersalo, K., Sims, T.N., Sumen, C., Davis, M.M., Shaw, A.S., Allen, P.M. and Dustin, M.L. (2001). The immunological synapse. *Annu. rev. Immunol.* 19:375-396.

- Brunet, J.F., Denizot, F., Luciani, M.F., Roux-Dosseto, M., Suzan, M., Mattei, M.G. and Golstein, P. (1987) A new member of the immunoglobulin superfamily—CTLA-4. *Nature* 328:267–270.
- Brunner, M.C., Chambers, C.A., Chan, F.K., Hanke, J., Winoto, A. and Allison, J.P. (1999). CTLA-4-mediated inhibition of early events of T cell proliferation. *J. Immunol.* 162: 5813–5820.
- Butty, V., Roy, M., Sabeti, P., Besse, W., Benoist, C. and Mathis, D. (2007). Signatures of strong population differentiation shape extended haplotypes across the human CD28, CTLA4, and ICOS costimulatory genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104: 570-575.
- Calvo, C.R. Amsen, D. and Kruisbeek, A.M. (1997). Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) interferes with extracellular signal-regulated kinase (ERK) and Jun NH2-terminal kinase (JNK) activation, but does not affect phosphorylation of T cell receptor zeta and ZAP70. *J. Exp. Med.* 186:1645–1653.
- Cantley, L.C. (2002). The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 31;296(5573):1655-1657.
- Cederbom, L. Hall, H. and Ivars, F. (2000). CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. *Eur. J. Immunol.* 30:1538–1543.
- Chan, D.V., Gibson, H.M., Aufiero, B.M., Wilson, A.J., Hafner, M.S., Mi, Q.S. and Wong, H.K. (2014). Differential CTLA-4 expression in human CD4+ versus CD8+ T cells is associated with increased NFAT1 and inhibition of CD4+ proliferation. *Genes Immun.* 15:25-32.
- Chen, W., Jin, W. and Wahl, S.M. (1998). Engagement of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) induces transforming growth factor  $\beta$ (TGF- $\beta$ ) production by murine CD4+ T cells. *J. Exp. Med.* 188: 1849–1857.
- Chen, Z., Stockton, J., Mathis, D. and Benoist, C. (2006). Modeling CTLA4-linked autoimmunity with RNA interference in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103:16400 –16405.
- Collins, A.V., Brodie, D.W, Gilbert, R.J., Iaboni, A., Manso-Sancho, R., Walse, B., Stuart, D.I., van der Merwe, P.A. and Davis, S.J. (2002). The interaction properties of costimulatory molecules revisited. *Immunity* 17: 201–210.
- Corse, E. and Allison, J.P. (2012). Cutting edge: CTLA-4 on effector T cells inhibits in trans. *J. Immunol.* 189:1123–1127.
- Dariavach, P., Mattei, M.G., Golstein, P. and Lefranc, M.P. (1988). Human Ig superfamily CTLA-4 gene: chromosomal localization and identity of protein sequence between murine and human CTLA-4 cytoplasmic domains. *Eur. J. Immunol.* 18:1901–1905.
- Deichmann, K., Heinzmann, A., Bruggenolte, E., Forster, J. and Kuehr, J. (1996). An Mse I RFLP in the human CTLA4 promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 225:817–818.

- Donner, H., Rau, H., Walfish, P.G., Braun, J., Siegmund, T., Finke, R., Herwig, J., Usadel, K.H. and Badenhop K. (1997). CTLA4 alanine-17 confers genetic susceptibility to Graves' disease and to type 1 diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82:143–146.
- Eck, S.C., Chang, D., Wells, A.D. and Turka, L.A. (1997). Differential downregulation of CD28 by B7-1 and B7-2 engagement. *Transplantation* 64:1497.
- Eisenberg, E. and Levanon, E.Y. (2013). Human housekeeping genes, revisited. *Trends Genet.* 29:10.
- Egen, J.G. and Allison, J.P. (2002). Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 accumulation in the immunological synapse is regulated by TCR signal strength. *Immunity* 16: 23-35.
- Egen, J.G., Kuhns, M.S. and Allison, J.P. (2002). CTLA-4: new insights into its biological function and use in tumor immunotherapy. *Nat. Immunol.* 3:611-618.
- Feske, S., Giltzane, J., Dolmetsch, R., Staudt, L. M. and Rao, A. (2001). Gene regulation mediated by calcium signals in T lymphocytes. *Nat. Immunol.* 2: 316-324.
- Fife, B.T., Griffin, M.D., Abbas, A.K., Locksley, R.M. and Bluestone, J.A. (2006). Inhibition of T cell activation and autoimmune diabetes using a B cell surface-linked CTLA-4 agonist. *J. Clin. Invest.* 116:2252–2261.
- Flo, J., Tisminetzky, S. and Baralle, F. (2000). Modulation of the immune response to DNA vaccine by co-delivery of co-stimulatory molecules. *Immunology* 100:259.
- Freeman, G.J., Freedman, A.S., Segil, J.M., Lee, G., Whitman, J.F. and Nadler, L.M. (1989). B7, a new member of the Ig superfamily with unique expression on activated and neoplastic B cells. *J. Immunol.* 143:2714–2722.
- Freeman, G.J., Gray, G.S., Gimmi, C.D., Lombard, D.B., Zhou, L.J., White, M., Fingerhuth, J.D., Gribben, J.G. and Nadler, L.M. (1991). Structure, expression, and T cell costimulatory activity of the murine homologue of the human B lymphocyte activation antigen B7. *J. Exp. Med.* 174:625–631.
- Freeman, G.J., Gribben, J.G., Boussiotis, V.A., Ng, J.W., Restivo, V.A. Jr., Lombard, L.A., Gray, G.S. and Nadler, L.M. (1993). Cloning of B7-2: a CTLA-4 counter-receptor that costimulates human T cell proliferation. *Science* 262:909–911.
- Freeman, G.J., Borriello, F., Hodes, R.J., Reiser, H., Gribben, J.G., Ng, J.W., Kim, J., Goldberg, J.M., Hathcock, K., Laszlo, G., Lombard, L.A., Wang, S., Gray, G.S., Nadler, L.M. and Sharpe, A.H. (1993(2)). Murine B7-2, an alternative CTLA4 counter-receptor that costimulates T cell proliferation and interleukin 2 production. *J. Exp. Med.* 178:2185–2192.

Freeman, G.J., Boussiotis, V.A., Anumanthan, A., Bernstein, G.M., Ke, X.Y., Rennert, P.D., Gray, G.S., Gribben, J.G. and Nadler, L.M. (1995). B7-1 and B7-2 do not deliver identical co-stimulatory signals, since B7-2 but not B7-1 preferentially co-stimulates the initial production of IL-4. *Immunity* 2:523.

Galea-Lauri, J., Darling, D., Gan, S.U., Krivochtchapov, L., Kuiper, M., Gäken, J., Souberbielle, B. and Farzaneh, F. (1999). Expression of a variant of CD28 on a subpopulation of human NK cells: implications for B7-mediated stimulation of NK cells. *J. Immunol.* 163:62-70.

Gerold, K.D., Zheng, P., Rainbow, D.B., Zerneck, A., Wicker, L.S. and Kissler, S. (2011). The soluble CTLA-4 splice variant protects from type 1 diabetes and potentiates regulatory T-cell function. *Diabetes* 60:1955-1963.

Gett, A.V. and Hodgkin, P.D. (2000). A cellular calculus for signal integration by T cells. *Nat. Immunol.* 1:239-244.

Grakoui, A. (1999). The Immunological Synapse: A Molecular Machine Controlling T Cell Activation. *Science* 285:221-227.

Greene, J.L., Leytze, G.M., Emswiler, J., Peach, R., Bajorath, J., Cosand, W. and Linsley, P.S. (1996). Covalent dimerization of CD28/CTLA-1 and oligomerization of CD80/CD86 regulate T cell costimulatory interactions. *J. Biol. Chem.* 271:26762-26771.

Greenfield, E.A., Nguyen, K.A. and Kuchroo, V.K. (1998). CD28/ B7 co-stimulation: a review. *Crit. Rev. Immunol.* 18:389.

Griffin, M.D., Hong, D.K., Holman, P.O., Lee, K.M., Whitters, M.J., O'Herrin, S.M., Fallarino, F., Collins, M., Segal, D.M., Gajewski, T.F., Kranz, D.M. and Bluestone, J.A. (2000). Blockade of T cell activation using a surface-linked single-chain antibody to CTLA-4 (CD152). *J. Immunol.* 164:4433-4442.

Guo, F., Iclozan, C., Suh, W.-K., Anasetti, C. and Yu, X.-Z. (2008). CD28 controls differentiation of regulatory T cells from naive CD4 T cells. *J. Immunol.* 181: 2285-2291.

Haile, S.T., Dalal, S.P., Clements, V., Tamada, K. and Ostrand-Rosenberg, S. (2013). Soluble CD80 Restores T Cell Activation and Overcomes Tumor Cell Programmed Death Ligand-1-mediated Immune Suppression. *J. Immunol.* 191:2829-2836.

Hanawa, H., Ma, Y., Mikolajczak, S.A., Charles, M.L., Yoshida, T., Yoshida, R., Strathdee, G.A., Litchfield, D.W. and Ochi, A. (2002). A novel costimulatory signaling in human T lymphocytes by a splice variant of CD28. *Blood* 99:6.

Harper, K., Balzano, C., Rouvier, E., Mattei, M.G., Luciani, M.F. and Golstein, P. (1991). CTLA-4 and CD28 activated lymphocyte molecules are closely related in both mouse and human as to sequence, message expression, gene structure, and chromosomal location. *J. Immunol.* 147:1037-1044.

- Harty, J. T., Tvinnereim, A. R. and White, D. W. (2000). CD8<sup>+</sup> T cell effector mechanisms in resistance to infection. *Annu. Rev. Immunol.* 18: 275-308.
- Hathcock, K.S., Laszlo, G., Pucillo, C., Linsley, P. and Hodes, R.J. (1994). Comparative analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands: expression and function. *J. Exp. Med.* 180: 631-640.
- Heinzmann, A., Plesnar, C., Kuehr, J., Forster, J. and Deichmann, K.A. (2000). Common polymorphisms in the CTLA-4 and CD28 genes at 2q33 are not associated with asthma or atopy. *Eur. J. Immunogenet.* 27: 57.
- Homann, D., Dummer, W., Wolfe, T., Rodrigo, E., Theofilopoulos, A.N., Oldstone, M.B. and von Herrath, M.G. (2006). Lack of intrinsic CTLA-4 expression has minimal effect on regulation of antiviral T-cell immunity. *J. Virol.* 80:270-280.
- Hu, H., Rudd, C.E. and Schneider, H. (2001). Src kinases Fyn and Lck facilitate the accumulation of phosphorylated CTLA-4 and its association with PI-3 kinase in intracellular compartments of T-cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 288:573-578.
- Huang, D., Giscombe, R., Zhou, Y., Pirskanen, R. and Lefvert, A.K. (2000). Dinucleotide repeat expansion in the CTLA-4 gene leads to T cell hyper-reactivity via the CD28 pathway in myasthenia gravis. *J. Neuroimmunol.* 105:69-77.
- Huppa, J.B. and Davis, M.M. (2003). T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nat. Rev. Immunol.* 3:973-983.
- Iezzi, G., Karjalainen, K. and Lanzavecchia, A. (1998). The duration of antigenic stimulation determines the fate of naive and effector T cells. *Immunity* 8:89-95.
- Ihara, K., Ahmed, S., Nakao, F., Kinukawa, N., Kuromaru, R., Matsuura, N., Iwata, I., Nagafuchi, S., Kohno, H., Miyako, K. and Hara, T. (2001). Association studies of CTLA-4, CD28, and ICOS gene polymorphisms with type diabetes in the Japanese population. *Immunogenetics* 53: 447.
- Itoh, M., Takahashi, T., Sakaguchi, N., Kuniyasu, Y., Shimizu, J., Otsuka, F. and Sakaguchi, S. (1999). Thymus and autoimmunity: production of CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J. Immunol.* 162:5317-5326.
- Jago, C.B., Yates, J., Olsen Saraiva Câmara, N., Lechler, R.I. and Lombardi, G. (2004). Differential expression of CTLA-4 among T cell subsets. *Clin. Exp. Immunol.* 136:3, 463-71.
- Jeannin, P., Magistrelli, G., Aubry, J.P., Caron, G., Gauchat, J.F., Renno, T., Herbault, N., Goetsch, L., Blaecke, A., Dietrich, P.Y., Bonnefoy, J.Y. and Delneste, Y. (2000). Soluble CD86 is a costimulatory molecule for human T lymphocytes. *Immunity* 13: 303-312.

- Jellis, C.L., Wang, S.S., Rennert, P., Borriello, F., Sharpe, A.H., Green, N.R. and Gray, G.S. (1995). Genomic organization of the gene coding for the costimulatory human B-lymphocyte antigen B7-2 (CD86). *Immunogenetics* 42:85-9.
- Jenkins, M.K. and Schwartz, R.H. (1987). Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness in vitro and in vivo. *J. Exp. Med.* 165:302-319.
- Joehanes, R., Johnson, A.D., Barb, J.B., Raghavachari, N., Liu, P., Woodhouse, K.A., O'Donnell, C.J., Munson, P.J. and Levy, D. (2011). Gene expression analysis of whole blood, peripheral blood mononuclear cells, and lymphoblastoid cell lines from the Framingham Heart Study. *Physiol. Genomics* 44:59-75.
- Kakoulidou, M., Giscombe, R., Zhao, X., Lefvert, A.K and Wang, X. (2007). Human Soluble CD80 is Generated by Alternative Splicing, and Recombinant Soluble CD80 Binds to CD28 and CD152 Influencing T-cell Activation. *J. Immunol.* 66: 529-537.
- Kapsogeorgou, E.K., Moutsopoulos, H.M. and Manoussakis, M.N. (2008). A Novel B7-2 (CD86) Splice Variant with a Putative Negative Regulatory Role. *J. Immunol.* 180: 3815-3823.
- Kaufman, K.A., Bowen, J.A., Tsai, A.F., Bluestone, J.A., Hunt, J.S. and Ober, C. (1999). The CTLA-4 gene is expressed in placental fibroblasts. *Mol. Hum. Reprod.* 5:84-7
- Kavvoura, F.K. and Ioannidis, J.P. (2005). CTLA-4 gene polymorphisms and susceptibility to type 1 diabetes mellitus: a HuGE Review and meta-analysis. *Am. J. Epidemiol.* 162:3-16.
- Kristiansen, O.P., Larsen, Z.M. and Pociot, F. (2000). CTLA-4 in autoimmune diseases - a general susceptibility gene to autoimmunity? *Genes Immun.* 1:170-84.
- Kuchroo, V.K., Das, M.P., Brown, J.A., Ranger, A.M., Zamvil, S.S., Sobel, R.A., Weiner, H.L., Nabavi, N. and Glimcher, L.H. (1995). B7-1 and B7-2 co-stimulatory molecules activate differentially the T<sub>h</sub>1/T<sub>h</sub>2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy. *Cell* 80:707.
- Kuhn, J. R. and Poenie, M. (2002). Dynamic polarization of the microtubule cytoskeleton during CTL-mediated killing. *Immunity* 16:111-121.
- Kuklina, E. M. (2013). Molecular mechanisms of T-cell anergy. *Biochemistry (Mosc.)* 78:144-156.
- Lanier, L.L., O'Fallon, S., Somoza, C., Phillips, J.H., Linsley, P.S., Okumura, K., Ito, D. and Azuma, M. (1995). CD80 (B7) and CD86 (B70) provide similar costimulatory signals for T cell proliferation, cytokine production, and generation of CTL. *J. Immunol.* 154:97-105.

- Larsen, C.P., Pearson, T.C., Adams, A.B., Tso, P., Shirasugi, N., Strobert, E., Anderson, D., Cowan, S., Price, K., Naemura, J., Emswiler, J., Greene, J., Turk, L.A., Bajorath, J., Townsend, R., Hagerty, D., Linsley, P.S. and Peach, R.J. (2005). Rational development of LEA29Y (belatacept), a high-affinity variant of CTLA4-Ig with potent immunosuppressive properties. *Am. J. Transplant.* 5:443-453.
- Laurence, A., Tato, C.M., Davidson, T.S., Kanno, Y., Chen, Z., Yao, Z., Blank, R.B., Meylan, F., Siegel, R., Hennighausen, L., Shevach, E.M. and O'shea, J.J. (2007). Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity* 26:371–381.
- Lee, K.M., Chuang, E., Griffin, M., Khattri, R., Hong, D.K., Zhang, W., Straus, D., Samelson, L.E., Thompson, C.B. and Bluestone, J.A. (1998). Molecular basis of T cell inactivation by CTLA-4. *Science* 282: 2263–2266.
- Lee, H.M., Bautista, J.L., Scott-Browne, J., Mohan, J.F. and Hsieh, C.S. (2012). A broad range of self-reactivity drives thymic regulatory T cell selection to limit responses to self. *Immunity* 37:475–486.
- Lenschow, D.J., Walunas, T.L. and Bluestone, J.A. (1996). CD28/B7 system of T cell co-stimulation. *Annu. Rev. Immunol.* 14:233.
- Lindsten, T., Lee, K.P., Harris, E.S., Petryniak, B., Craighead, N., Reynolds, P.J., Lombard, D.B., Freeman, G.J., Nadler, L.M. and Gray, G.S. (1993). Characterization of CTLA-4 structure and expression on human T cells. *J. Immunol.* 151:3489-3499.
- Ling, V., Munroe, R.C., Murphy, E.A. and Gray, G.S. (1998). Embryonic stem cells and embryoid bodies express lymphocyte costimulatory molecules. *Exp. Cell Res.* 241:55–65.
- Linsley, P.S., Clark, E.A. and Ledbetter, J.A. (1990). T-cell antigen CD28 mediates adhesion with B cells by interacting with activation antigen B7/BB-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:5031–5035.
- Linsley, P. S., Brady, W., Grosmaire, L., Aruffo, A., Damle, N. K. and Ledbetter, J. A. (1991). Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation. *J. Exp. Med.* 173:721-730.
- Linsley, P. S., Greene, J. L., Tan, P., Bradshaw, J., Ledbetter, J. A., Anasetti, C. and Damle, N.K.. (1992). Coexpression and functional cooperation of CTLA-4 and CD28 on activated T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 176:1595-1604.
- Lipson, E.J. and Drake, C.G. (2011). Ipilimumab: An Anti-CTLA-4 Antibody for Metastatic Melanoma. *Clin. Cancer Res.* 17:6958.
- Liu, S.M., Sutherland, A.P.R., Zhang, Z., Rainbow, D.B., Quintana, F.J., Paterson, A.M., Sharpe, A.H., Oukka, M., Wicker, L.S. and Kuchroo, V.K. (2012). Overexpression of the CTLA-4 isoform lacking exons 2 and 3 causes autoimmunity. *J. Immunol.* 188:155–162.

- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* 25:402.
- Lucas, P.J., Negishi, I., Nakayama, K., Fields, L.E. and Loh, D.Y. (1995). Naive CD28-deficient T cells can initiate but not sustain an in vitro antigen-specific immune response. *J. Immunol.* 154: 5757-5768.
- Luhder, F., Hoglund, P., Allison, J.P., Benoist, C. and Mathis, D. (1998). Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) regulates the unfolding of autoimmune diabetes. *J. Exp. Med.* 187:427-432.
- Luhder, F., Chambers, C., Allison, J.P., Benoist, C. and Mathis, D. (2000). Pin-pointing when T cell costimulatory receptor CTLA-4 must be engaged to dampen diabetogenic T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97:12204-12209.
- Ma, B.Y., Mikolajczak, S.A., Yoshida, T., Yoshida, R., Kelvin, D.J. and Ochi, A. (2004). CD28 T cell costimulatory receptor function is negatively regulated by N-linked carbohydrates. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 317:60-67.
- Magistrelli, G., Jeannin, P., Elson, G., Gauchat, J.F., Nguyen, T.N., Bonnefoy, J.Y. and Delneste, Y. (1999) Identification of Three Alternatively Spliced Variants of Human CD28 mRNA. Centre d'Immunologie Pierre Fabre, Saint Julien en Genevois, France. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 259:34-37.
- Magistrelli, G., Caron, G., Gauchat, J.F., Jeannin, P., Bonnefoy, J.Y. and Delneste Y. (2001). Identification of an Alternatively Spliced Variant of Human CD86 mRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280:1211-1215.
- Marengere, L.E., Waterhouse, P., Duncan, G.S., Mittrücker, H.W., Feng, G.S. and Mak, T.W. (1996). Regulation of T cell receptor signaling by tyrosine phosphatase SYP association with CTLA-4. *Science* 272:1170-1173.
- Marron, M.P., Zeidler, A., Raffel, L.J., Eckenrode, S.E., Yang, J.J., Hopkins, D.I., Garchon, H.J., Jacob, C.O., Serrano-Rios, M., Martinez Larrad, M.T., Park, Y., Bach, J.F., Rotter, J.I., Yang, M.C. and She, J.X. (2000). Genetic and physical mapping of a type 1 diabetes susceptibility gene (IDDM12) to a 100-kb phagemid artificial chromosome clone containing D2S72-CTLA4-D2S105 on chromosome 2q33. *Diabetes* 49: 492.
- Maszyna, F., Hoff, H., Kunkel, D., Radbruch, A. and Brunner-Weinzierl, M.C. (2003). Diversity of clonal T cell proliferation is mediated by differential expression of CD152 (CTLA-4) on the cell surface of activated individual T lymphocytes. *J. Immunol.* 171: 3459-3466.
- Matsushita, M., Tsuchiya, N., Oka, T., Yamane, A. and Tokunaga, K. (2000). New polymorphisms of human CD80 and CD86: lack of association with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Genes Immun.* 1:428-434.

- Matulonis, U., Dosiou, C., Freeman, G., Lamont, C., Mauch, P., Nadler, L.M. and Grifn, J.D. (1996). B7-1 is superior to B7-2 co-stimulation in the induction and maintenance of T cell-mediated antileukemia immunity. Further evidence that B7-1 and B7-2 are functionally distinct. *J. Immunol.* 156:1126.
- McAdam, A.J., Gewurz, B.E., Farkash, E.A. and Sharpe, A.H. (2000). Either B7 co-stimulation or IL-2 can elicit generation of primary alloreactive CTL. *J. Immunol.* 165:3088.
- McCoy, K. D. and Le Gros, G. (1999). The role of CTLA-4 in the regulation of T cell immune responses. *Immunol. Cell Biol.* 77: 1–10.
- McGavern, D.B., Christen, U. and Oldstone, M.B.A. (2002). Molecular anatomy of antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cell engagement and synapse formation in vivo. *Nat. Immunol.* 3:918-925.
- Mena, E. and Rohowsky-Kochan, C. (1999). Expression of costimulatory molecules on peripheral blood mononuclear cells in multiple sclerosis. *Acta. Neurol. Scand.* 100:92–96.
- Menke, A., Rex-Haffner, M., Klengel, T., Binder, E.B. and Mehta, D. (2012). Peripheral blood gene expression: it all boils down to the RNA collection tubes. *BMC Research Notes* 5:1.
- Miller, J., Baker, C., Cook, K., Graf, B., Sanchez-Lockhart, M., Sharp, K., Wang, X., Yang, B. and Yoshida, T. (2009). Two pathways of costimulation through CD28. *Immunol. Res.* 45:159-172.
- Misra, N., Bayry, J., Lacroix-Desmazes, S., Kazatchkine, M.D. and Kaveri, S.V. (2004). Cutting edge: human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells. *J. Immunol.* 172:4676–4680.
- Mondino, A., Khoruts, A. and Jenkins, M.K. (1996). The anatomy of T-cell activation and tolerance. *Proc Natl Acad Sci.* 93:2245-2252.
- Moran, A.E., Holzapfel, K.L., Xing, Y., Cunningham, N.R., Maltzman, J.S., Punt, J. and Hogquist, K.A. (2011). T cell receptor signal strength in Treg and iNKT cell development demonstrated by a novel fluorescent reporter mouse. *J. Exp. Med.* 208:1279–1289.
- Moreland, L., Bate, G and Kirkpatrick, P. (2006). Abatacept. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 5:185-186.
- Nickoloff, B.J., Nestle, F.O., Zheng, X.G. and Turka, L.A. (1994). T lymphocytes in skin lesion of psoriasis and mycosis fungoides express B7-1: a ligand for CD28. *Blood* 83: 2580–2586.
- Nistico, L., Buzzetti, R., Pritchard, L.E., Van der Auwera, B., Giovannini, C., Bosi, E., Larrad, M.T., Rios, M.S., Chow, C.C., Cockram, C.S., Jacobs, K., Mijovic, C., Bain, S.C., Barnett, A.H., Vandewalle, C.L., Schuit, F., Gorus, F.K., Tosi, R., Pozzilli, P. and Todd, J.A. (1996). The CTLA-4 gene region of chromosome 2q33 is linked to, and associated with, type 1 diabetes. Belgian Diabetes Registry. *Hum. Mol. Genet.* 5:1075–80.

- Njau, M., Kim, J., Chappell, C. and Jacob, J. (2011). CD28: a novel negative regulator of plasma cell function and survival. *J. Immunol.* 186:45.16
- Oaks, M.K., Hallett, K.M., Penwell, R.T., Stauber, E.C., Warren, S.J. and Tector, A.J. (2000). A native soluble form of CTLA-4. *Cell Immunol.* 201:144–53.
- Oderup, C., Cederbom, L., Makowska, A., Cilio, C.M. and Ivars, F. (2006). Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T-cell-mediated suppression. *Immunology* 118:240–249.
- Okkenhaug, K., Wu, L., Garza, K.M., La Rose, J., Khoo, W., Odermatt, B., Mak, T.W., Ohashi, P.S. and Rottapel, R. (2001). A point mutation in CD28 distinguishes proliferative signals from survival signals. *Nat. Immunol.* 2:325–332.
- Onishi, Y., Fehervari, Z., Yamaguchi, T. and Sakaguchi, S. (2008). Foxp3<sup>+</sup> natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105:10113–10118.
- Paine, A., Kirchner, H., Immenschuh, S., Oelke, M., Blasczyk, R. and Eiz-Vesper, B. (2012). IL-2 Upregulates CD86 Expression on Human CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T Cells. *J. Immunol.* 188(4):1620-1629.
- Pelletier, N., McHeyzer-Williams, L.J., Wong, K.A., Urich, E., Fazilleau, N. and McHeyzer-Williams, M.G. (2010). Plasma cells negatively regulate the follicular helper T cell program. *Nat. Immunol.* 11(12): 1110–1118.
- Pentcheva-Hoang, T., Egen, J.G., Wojnoonski, K. and Allison, J.P. (2004). B7-1 and b7-2 selectively recruit ctla-4 and CD28 to the immunological synapse. *Immunity* 21:401–413.
- Perkins, D., Wang, Z., Donovan, C., He, H., Mark, D., Guan, G., Wang, Y., Walunas, T., Bluestone, J., Listman, J. and Finn, P.W. (1996). Regulation of CTLA-4 expression during T cell activation. *J. Immunol.* 156:11, 4154-4159.
- Pioli, C., Gatta, L., Ubaldi, V. and Doria, G. (2000). Inhibition of IgG1 and IgE production by stimulation of the B cell CTLA-4 receptor. *J. Immunol.* 165:10, 5530-6.
- Pistillo, M.P., Tazzari, P.L., Palmisano, G.L., Pierri, I., Bolognesi, A., Ferlito, F., Capanni, P., Polito, L., Ratta, M., Pileri, S., Piccioli, M., Basso, G., Rissotto, L., Conte, R., Gobbi, M., Stirpe, F. and Ferrara, G.B. (2003). CTLA-4 is not restricted to the lymphoid cell lineage and can function as a target molecule for apoptosis induction of leukemic cells. *Blood* 101:1, 202-209.
- Pruul, K., Kisand, K., Alnek, K., Metsküla, K., Heilman, K., Peet, A., Varik, K. and Uiibo, R. (2013). Expression of B7 and CD28 family genes in newly diagnosed type 1 diabetes. *Hum. Immunol.* 74:1251–1257.

- Quandt, D., Hoff, H., Rudolph, M., Fillatreau, S. and Brunner-Weinzierl, M.C. (2007). A New Role of CTLA-4 on B Cells in Thymus-Dependent Immune Responses In Vivo. *J. Immunol.* 179(11):7316-7324.
- Qureshi, O.S., Zheng, Y., Nakamura, K., Attridge, K., Manzotti, C., Schmidt, E.M., Baker, J., Jeffery, L.E., Kaur, S., Briggs, Z., Hou, T.Z., Futter, C.E., Anderson, G., Walker, L.S.K. and Sansom, D.M. (2011). Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science* 332:600–603.
- Rainen, L., Oelmueller, U., Jurgensen, S., Wyrich, R., Ballas, C., Schram, J., Herdman, C., Bankaitis-Davis, D., Nicholls, N., Trollinger, D. and Tryon, V. (2002). Stabilization of mRNA expression in whole blood samples. *Clin. Chem.* 48(11):1883–1890.
- Read, S., Malmström, V. and Powrie, F. (2000). Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J. Exp. Med.* 192:295–302.
- Reichardt, P., Dornbach, B. and Gunzer, M. (2010). APC, T Cells, and the Immune Synapse. *Curr. Top Microbiol. Immunol.* 340:229-49.
- Robert, C. and Ghiringhelli, F. (2009). What Is the Role of Cytotoxic T Lymphocyte-Associated Antigen 4 Blockade in Patients with Metastatic Melanoma? *The Oncologist* 14:848 – 861.
- Rollins, B., Martin, M.V., Morgan, L. and Vawter, M.P. (2010). Analysis Of Whole Genome Biomarker Expression In Blood And Brain. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 153B(4): 919–936.
- Romagnani, S. (2006). Immunological tolerance and autoimmunity. *Intern. Emerg. Med.* 1(3), 187-196.
- Rudd, C.E., Taylor, A. and Schneider, H. (2009). CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction. *Immunol. Rev.* 229: 12–26.
- Sabzevari, H., Kantor, J., Jaigirdar, A., Tagaya, Y., Naramura, M., Hodge, J., Bernon, J. and Schlom, J. (2001). Acquisition of CD80 (B7-1) by T cells. *J. Immunol.* 166: 2505-2513.
- Sakaguchi, S., Takahashi, T. and Nishizuka, Y. (1982). Study on cellular events in post-thymectomy autoimmune oophoritis in mice. II. Requirement of Lyt-1 cells in normal female mice for the prevention of oophoritis. *J. Exp. Med.* 156:1577–1586.
- Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T. and Ono, M. (2008). Regulatory T Cells and Immune Tolerance. *Cell* 133.
- Sanchez, M.J., Spits, H., Lanier, L.L. and Phillips, J.H. (1993). Human natural killer cells committed thymocytes and their relation to the T cell lineage. *J. Exp. Med.* 178:1857–66.

- Sansom, D.M. and Walker, L.S.K. (2006). The role of CD28 and cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) in regulatory T-cell biology. *Immunol. Rev.* 212:131–148.
- Santra, S., Barouch, D.H., Jackson, S.S., Kuroda, M., Schmitz, J.E., Lifton, M.A., Sharpe, A.H. and Letvin, N.L. (2000). Functional equivalency of B7-1 and B7-2 for co-stimulating plasmid DNA vaccine-elicited CTL responses. *J. Immunol.* 165:6791.
- Santra, S., Barouch, D.H., Sharpe, A.H. and Letvin, N.L. (2000). B7 co-stimulatory requirements differ for induction of immune responses by DNA, protein and recombinant pox virus vaccination. *Eur. J. Immunol.* 30:2650.
- Schmidt, E.M., Wang, C.J., Ryan, G.A., Clough, L.E., Qureshi, O.S., Goodall, M., Abbas, A.K., Sharpe, A.H., Sansom, D.M. and Walker, L.S.K. (2009). Ctla-4 controls regulatory T cell peripheral homeostasis and is required for suppression of pancreatic islet autoimmunity. *J. Immunol.* 182:1, 274-82.
- Schneider, H. and Rudd, C.E. (2000). Tyrosine phosphatase SHP-2 binding to CTLA-4: absence of direct YVKM/YFIP motif recognition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 269:279–283.
- Schneider, H., Smith, X., Liu, H., Bismuth, G. and Rudd, C.E. (2008). CTLA-4 disrupts ZAP70 microcluster formation with reduced T cell/APC dwell times and calcium mobilization. *Eur. J. Immunol.* 38:40–47.
- Schweitzer, A.N., Borriello, F., Wong, R.C., Abbas, A.K. and Sharpe, A.H. (1997). Role of co-stimulators in T cell differentiation: studies using antigen-presenting cells lacking expression of CD80 or CD86. *J. Immunol.* 158:2713.
- Selvakumar, A., Mohanraj, B.K., Eddy, R.L., Shows, T.B., White, P.C. and Dupont, B. (1992). Genomic organization and chromosomal location of the human gene encoding the B-lymphocyte activation antigen B7. *Immunogenetics* 36(3):175-181.
- Shieh, S.J., Chou, F.C., Yu, P.N., Lin, W.C., Chang, D.M., Roffler, S.R. and Sytwu, H.K. (2009). Transgenic Expression of Single-Chain Anti-CTLA-4 Fv on  $\beta$  Cells Protects Nonobese Diabetic Mice from Autoimmune Diabetes. *J. Immunol.* 183:2277-2285.
- Shou, J., Dotson, C., Qian, H.R., Tao, W., Lin, C., Lawrence, F., N'Cho, M., Kulkarni, N.H., Bull, C.M., Gelbert, L.M. and Onyia, J.E. (2005). Optimized blood cell profiling method for genomic biomarker discovery using high-density microarray. *Biomarkers*.10(4):310–320.
- Silver, N., Best, S., Jiang, J. and Thein, S.L. (2006). Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *BMC Mol. Biol.* 7:33.
- Sprenst, J.. (2005). Swapping molecules during cell-cell interactions. *Sci. STKE.* 273:8.

Stein, P.H., Fraser, J.D and Weiss, A. (1994). The cytoplasmic domain of CD28 is both necessary and sufficient for costimulation of interleukin-2 secretion and association with phosphatidylinositol 3<sup>0</sup>-kinase. *Mol. Cell. Biol.* 14:3392–3402.

Stinchcombe, J.C., Bossi, G., Booth, S. and Griffiths, G.M. (2001). The immunological synapse of CTL contains a secretory domain and membrane bridges. *Immunity* 15(5):751-761.

Stumpf, M., Zhou, X., Chikuma, S. and Bluestone, J.A. (2014). Tyrosine 201 of the cytoplasmic tail of CTLA-4 critically affects T regulatory cell suppressive function. *Eur. J. Immunol.* 44:1737–1746.

Sun, Y., Li, Y., Luo, D. and Liao, D.H. (2012). Pseudogenes as Weaknesses of ACTB (Actb) and GAPDH (Gapdh) Used as Reference Genes in Reverse Transcription and Polymerase Chain Reactions. *Plos One* 7:8.

Zheng, S.G., Wang, J.H., Stohl, W., Kim, K.S., Gray, J.D. and Horwitz, D.A. (2006). TGF-beta requires CTLA-4 early after T cell activation to induce FoxP3 and generate adaptive CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory cells. *J. Immunol.* 176(6):3321-3329.

Zhou, J., Cheung, A.K.L., Liu, H., Tan, Z., Tang, X., Kang, Y., Du, Y., Wang, H., Liu, L. and Chen, Z. (2013). Potentiating Functional Antigen-specific CD8<sup>+</sup> T Cell Immunity by a Novel PD1 Isoform-based Fusion DNA Vaccine. *Mol. Ther.* 21(7):1445–1455.

Tai, X., Van Laethem, F., Pobezinsky, L., Guintert, T., Sharrow, S.O., Adams, A., Granger, L., Kruhlak, M., Lindsten, T., Thompson, C.B., Feigenbaum, L. and Singer, A. (2012). Basis of CTLA-4 function in regulatory and conventional CD4<sup>+</sup> T cells. *Blood* 119:122.

Takahashi, T., Kuniyasu, Y., Toda, M., Sakaguchi, N., Itoh, M., Iwata, M., Shimizu, J. and Sakaguchi, S. (1998). Immunologic self-tolerance maintained by CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int. Immunol.* 10:1969–1980.

Takahashi, T., Tagami, T., Yamazaki, S., Uede, T., Shimizu, J., Sakaguchi, N., Mak, T.W. and Sakaguchi, S. (2000). Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J. Exp. Med.* 192:303–310.

Takasaki, Y., Ogaki, M., Abe, K., Takeuchi, K., Ando, S., Tokano, Y., Kobayashi, S., Sekigawa, I., Tsuda, H. and Hashimoto, H. (1998). Expression of costimulatory molecule CD80 on peripheral blood T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J. Rheumatol.* 25: 1085–1091.

Tang, Q., Henriksen, K.J., Boden, E.K., Tooley, A.J., Ye, J., Subudhi, S.K., Zheng, X.X., Strom, T.B. and Bluestone, J.A. (2003). Cutting Edge: CD28 Controls Peripheral Homeostasis of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Regulatory T Cells. *J. Immunol.* 171(7):3348-3352.

Teft, W.A., Kirchhof, M.G. and Madrenas, J. (2006). A molecular perspective of CTLA-4 function. *Annu. Rev. Immunol.* 24:65-97.

Thach, D.C., Lin, B., Walter, E., Kruzelock, R., Rowley, R.K., Tibbetts, C. and Stenger, D.A. (2003). Assessment of two methods for handling blood in collection tubes with RNA stabilizing agent for surveillance of gene expression profiles with high density microarrays. *J. Immunol. Methods* 283(1-2):269-279.

Thompson, C., Lindsten, T., Ledbetter, J.A., Kunkel, S.L., Young, H.A., Emerson, S.G., Leiden, J.M. and June, C.H. (1993). CD28 activation pathway regulates the production of multiple T cell-derived Lymphokines/cytokines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:1333-1337.

Turpeinen, H., Laine, A.P., Nejentsev, S., Sjöroos, M. and Ilonen, J. (2002). CD86 Gene polymorphisms: no association with Type I diabetes among Finnish subjects. *Diabetologia* 45:1041-1042.

Ueda, H., Howson, J. M. M., Esposito, L., Heward, J., Chamberlain, G., Rainbow, D. B., Hunter, K.M., Smith, A.N., Di Genova, G., Herr, M.H., Dahlman, I., Payne, F., Smyth, D., Lowe, C., Twells, R.C., Howlett, S., Healy, B., Nutland, S., Rance, H.E., Everett, V., Smink, L.J., Lam, A.C., Cordell, H.J., Walker, N.M., Bordin, C., Hulme, J., Motzo, C., Cucca, F., Hess, J.F., Metzker, M.L., Rogers, J., Gregory, S., Allahabadia, A., Nithiyanthan, R., Tuomilehto-Wolf, E., Tuomilehto, J., Bingley, P., Gillespie, K.M., Undlien, D.E., Rønningen, K.S., Guja, C., Ionescu-Tîrgoviște, C., Savage, D.A., Maxwell, A.P., Carson, D.J., Patterson, C.C., Franklyn, J.A., Clayton, D.G., Peterson, L.B., Wicker, L.S., Todd, J.A. and Gough, S.C. (2003). Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature* 423(6939):506-511.

Vallejo, A. N., Nestel, A.R., Schirmer, M., Weyand, C.M. and Goronzy, J.J. (1998). Aging-related deficiency of CD28 expression in CD4.T cells is associated with the loss of gene-specific nuclear factor binding activity. *J. Biol. Chem.* 273:8119.

Vallejo, A.N., Brandes, J.C., Weyand, C.M. and Goronzy, J.J. (1999). Modulation of CD28 Expression: Distinct Regulatory Pathways During Activation and Replicative Senescence. *J. Immunol.* 162: 6572-6579.

Vallejo, A. N. (2005). CD28 extinction in human T cells: altered functions and the program of T-cell senescence. *Immunol rev.* 205(1):158-169.

Van der Merwe, P.A., Bodian, D.L.S., Daenke, P., Linsely, P.S. and Davis, S.J. (1997). CD80 binds both CD28 and CTLA-4 with a low affinity and very fast kinetics. *J. Exp. Med.* 185:393.

Vasu, C., Wang, A., Gorla, S.R., Kaithamana, S., Prabhakar, B.S. and Holterman, M.J. (2003). CD80 and CD86 C domains play an important role in receptor binding and co-stimulatory properties. *Int. Immunol.* 15(2):167±175.

- Vijayakrishnan, L., Slavik, J.M., Illés, Z., Greenwald, R.J., Rainbow, D., Greve, B., Peterson, L.B., Hafler, D.A., Freeman, G.J. and Sharpe, A.H. (2004). An autoimmune disease-associated CTLA-4 splice variant lacking the B7 binding domain signals negatively in T cells. *Immunity* 20:5, 563-575.
- Walker, L.S. and Sansom, D.M. (2011). The emerging role of CTLA4 as a cell-extrinsic regulator of T cell responses. *Nat. Rev. Immunol.* 11:852–863.
- Walker, L.S.K. and Sansom, D.M. (2015). Confusing signals: Recent progress in CTLA-4 biology. *Trends Immunol.* 36(2).
- Wang, X.B., Zhao, X., Giscombe, R. and Lefvert, A.K. (2002). A CTLA-4 gene polymorphism at position -318 in the promoter region affects the expression of protein. *Genes Immun.* 3:233–34.
- Wang, X.B., Kakoulidou, M., Giscombe, R., Qiu, Q., Huang, D., Pirskanen, R. and Lefvert, A.K. (2002). Abnormal expression of CTLA-4 by T cells from patients with myasthenia gravis: effect of an AT-rich gene sequence. *J. Neuroimmunol.* 130:224–32.
- Wang, X.B., Giscombe, R., Yan, Z., Heiden, T., Xu, D. and Lefvert, A.K. (2002). Expression of CTLA-4 by human monocytes. *Scand. J. Immunol* 55:1, 53-60.
- Wang, C.J., Kenefeck, R., Wardzinski, L., Attridge, K., Manzotti, C., Schmidt, E.M., Qureshi, O.S., Sansom, D.M. and Walker, L.S. (2012). Cutting edge: cell-extrinsic immune regulation by *ctla-4* expressed on conventional T cells. *J. Immunol.* 189:1118–1122.
- Ward, S., Westwick, J., Hall, N. and Sansom, D. (1993). CD28 ligation elevates PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> and PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> in T cells. *Eur. J. Immunol.* 23:2572–2577.
- Ward, F.J., Dahal, L.N., Wijesekera, S.K., Abdul-Jawad, S.K., Kaewarpai, T., Xu, H., Vickers, M.A. and Barker, R.N. (2013). The soluble isoform of CTLA-4 as a regulator of T-cell responses. *Eur. J. Immunol.* 43:1274–1285.
- Williams, J.A., Hathcock, K.S., Klug, D., Harada, Y., Choudhury, B., Allison, J.P., Abe, R. and Hodes, R.J. (2005). Regulated costimulation in the thymus is critical for T cell development: dysregulated CD28 costimulation can bypass the pre-TCR checkpoint. *J. Immunol.* 175:4199–4207.
- Wing, K., Onishi, Y., Prieto-Martin, P., Yamaguchi, T., Miyara, M., Fehervari, Z., Nomura, T. and Sakaguchi, S. (2008). CTLA-4 control over Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cell function. *Science* 322:271–275.
- Wing, K., Yamaguchi, T. and Sakaguchi, S. (2011). Cell-autonomous and -non-autonomous roles of CTLA-4 in immune regulation. *Trends Immunol.* 32:9, 428-33.
- Wojciechowski, D. and Vincenti, F. (2012). Belatacept in kidney transplantation. *Curr. Opin. Organ Transplant.* 17(6):640-647.

Wood, J.P., Pani, M.A., Bieda, K., Meyer, G., Usadel, K.H. and Badenhoop, K. (2002). A recently described polymorphism in the CD28 gene on chromosome 2q33 is not associated with susceptibility to type 1 diabetes. *Eur. J. Immunogenet.* 29: 347–349.

Wu, L.X., La Rose, J., Chen, L., Neale, C., Mak, T., Okkenhaug, K., Wange, R. and Rottapel, R. (2005). CD28 regulates the translation of Bcl-xL via the phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin pathway. *J. Immunol.* 174:180–194.

Wülfing, C. (1998). A Receptor/Cytoskeletal Movement Triggered by Costimulation During T Cell Activation. *Science* 282(5397):2266-2269.

Xing, Y. and Hogquist, K.A. (2012). T-Cell Tolerance: Central and Peripheral. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4:6.

Yokochi, T., Holly, R.D. and Clark, E.A. (1982). B lymphoblast antigen (BB-1) expressed on Epstein-Barr virus-activated B cell blasts, B lymphoblastoid cell lines, and Burkitt's lymphomas. *J. Immunol.* 128:823–827.

Yokosuka, T., Kobayashi, W., Takamatsu, M., Sakata-Sogawa, K., Zeng, H., Hashimoto-Tane, A., Yagita, H., Tokunaga, M. and Saito, T. (2010). Spatiotemporal basis of CTLA-4 costimulatory molecule-mediated negative regulation of T cell activation. *Immunity* 33:326–339.

## **KASUTATUD RAAMATUD**

Abbas, A.K., Lichtman, A.H. (2005). Cellular and Molecular Immunology. *Published by Elsevier Oxford.*

## **KASUTATUD VEEBIAADDRESSID**

<http://www.cram.com>

<http://www.genecards.org>

<http://primer3.ut.ee>

## **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, **Jürgen Pahla**, (sünnikuupäev: 29.03.1989)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose **Nelja immuunsünapsi molekuli (CTLA-4, CD28, CD80, CD86) ekspressiooni ja funktsiooni analüüs**, mille juhendajad on Kalle Kisand ja Sulev Ingerpuu

1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 26.05.2015 (*kuupäev*)