

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

# **Tsentraalse tolerantsuse mehhanismid APECED-i rotimudelis**

Magistritöö (30 EAP)

**Artur Stoljar**

Juhendajad:  
PhD Martti Laan  
PhD Kai Kisand  
MSc Sulev Kuuse

TARTU 2020

# Infoleht

## Tsentraalse tolerantsuse mehhanismid APECED-i rotimudelis

Tüümus on immuunsüsteemi üks olulisemaid organeid, kus pannakse alus tsentraalsele tolerantsusele. Tsentraalse tolerantsuse tekkimises üks kõige olulisemaid molekule on tüümuse epiteelis ekspresseeruv autoimmuunregulaator (*autoimmune regulator*, Aire), mille puudulikkusest tekib raske autoimmuunhaigus APECED (autoimmuunne poliendokrinopaatia-kandidoos-ektodermaalne düstroofia, *autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy*).

Käesoleva uurimistöö eesmärk oli uurida Aire puudulikus rotimudelis tsentraalse tolerantsuse häirest tekkivat autoimmuunfenotüüpi ning Aire rolli tsentraalse tolerantsuse tekkes. Uurimistöös kinnitati, et Aire puudulikud rotid on APECED-i sarnase fenotüübiga; leiti, et roti põletikulise süljenäärme autoimmuunfenotüüp sarnaneb hiire autoimmuunfenotüübiga ja tüümuses puuduvad B-raku agregaadid. Tsentraalse tolerantsuse kujunemise uurimisel leiti, et Aire puudulikus rotis pole tüümuse epiteelirakkude diferentseerumine ja kemokiinide ekspressioon vastupidiselt hiirele häiritud. Uurimistöös kinnitati, et Aire reguleerib rotimudelis koespetsiifiliste valkude ekspressiooni sarnaselt hiiremudelis ning rotis on reguleerivate T-rakkude (*regulatory T-cell*, T<sub>reg</sub>) diferentseerumine samamoodi nagu Aire KO hiires häiritud. Uurimistöös jõuti lõppjäreldele, et Aire puudulikkusest tingitud häire tsentraalses tolerantsuses on põhjustatud tõenäoliselt defektsest koespetsiifiliste valkude ekspressioonist ja/või T<sub>reg</sub>-ide diferentseerumisest.

**Märksõnad:** Aire, APECED, tsentraalne tolerantsus, tüümus, tüümuse epiteel

**CERCS:** B500

## Central tolerance mechanisms in an APECED rat model

Central tolerance occurs in the thymus. Autoimmune regulator (Aire), which is expressed in thymic epithelial cells (TECs), is a critical molecule in inducing central tolerance and Aire deficiency causes multi-organ autoimmune disease APECED (autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy).

The aim of the current thesis was to describe in Aire knock-out (KO) rat model the autoimmune phenotype caused by breakdown of central tolerance and to delineate the role of Aire in establishing central tolerance. We confirmed that Aire KO rats had a similar immune phenotype with APECED patients and autoimmune phenotype in the nonlymphoid tissues imitated Aire KO mouse model. We found no disturbance in TEC differentiation nor chemokine expression, which is opposite to Aire KO mouse. We saw that Aire regulates tissue restricted antigen (TSA) expression in the rat model similarly to the mouse model and regulatory T-cells (T<sub>reg</sub>) differentiation was impaired, just as in the Aire KO mouse model. Main conclusion of this thesis is that breakdown of central tolerance is likely to be caused by impaired TSA expression, T<sub>reg</sub> differentiation and/or by an unknown mechanism.

**Key words:** Aire, APECED, central tolerance, thymus, thymic epithelial

**CERCS:** B500

# Sisukord

Infoleht .....	2
Sisukord.....	3
Kasutatud lühendid.....	5
Sissejuhatus .....	7
1. Kirjanduse ülevaade .....	8
1.1 Tüümus .....	8
1.1.1 Tüümotsüütide diferentseerumine .....	9
1.1.2 Tüümuse säsi epiteelirakud ja tüümuse taandareng .....	11
1.2 AIRE .....	12
1.3 Aire KO rotimudel .....	15
1.4 APECED-i autoimmuunfenotüüp .....	15
2. Eksperimentaalosa .....	17
2.1 Töö eesmärgid.....	17
2.2 Materjalid ja meetodika .....	17
2.2.1 Rotid .....	17
2.2.2 Voolutsütomeetria ja rakkude sortimine .....	18
2.2.3 RNA eraldamine, cDNA süntees ja RT-qPCR.....	19
2.2.4 Ülegenoomne transkriptoomianalüüs .....	20
2.2.5 Immuunfluorestsentsmikroskoopia .....	21
2.2.6 Kudede histoloogiline analüüs .....	22
2.2.7 Tüümuse massi analüüs .....	22
2.3 Tulemused.....	23
2.3.1 Aire KO rottidel on APECED-i sarnane fenotüüp.....	23
2.3.2 Põletikus süljenäärme autoimmuunfenotüübi analüüs .....	24
2.3.3 Tüümuse morfoloogia ei ole muutunud.....	26
2.3.4 Tüümuse epiteeli lõppdiferentseerimine ei ole häiritud .....	27
2.3.5 Aire reguleerib rotimudelil TSA-de ekspressiooni sarnaselt hiiremodelile .....	31
2.3.6 Tüümuse epiteeli kemokiinide ekspressioonimuster ei ole muutunud.....	32
2.3.7 T <sub>reg</sub> -ide diferentseerumine on häiritud.....	33
2.4 Arutelu .....	35
Kokkuvõte .....	39

Tänuõnad.....	42
Kirjanduse loetelu.....	43
Lisa .....	47
Lisa 1. Uurimistöös kasutatud praimerid.....	47
Lisa 2. Maksa histoloogiline analüüs.....	50
Lisa 3. Tuumuse morfoloogia analüüs.....	51
Lisa 4. Sorditud mTEC-ide ülegenoomne transkriptomianalüüs.....	53
Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks .....	54

## Kasutatud lühendid

AIRE	autoimmuunregulaator ( <i>autoimmune regulator</i> )
APECED	autoimmuunne poliendokrinopaatia-kandidoos-ektodermaalne düstroofia ( <i>autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy</i> )
BSA	veise seerumi albumiin ( <i>bovine serum albumin</i> )
B2m	$\beta_2$ mikroglobuliin ( <i><math>\beta_2</math> microglobulin</i> )
CCL	C-C motiivi sisaldav kemokiin ( <i>C-C motif chemokine ligand</i> )
CD	diferentseerumise klaster ( <i>cluster of differentiation</i> )
CK	tsütokeratiin ( <i>cytokeratin</i> )
cTEC	tüümuse koore epiteelirakk ( <i>cortical thymic epithelial cell</i> )
DN	topeltnegatiivne ( <i>double negative</i> )
DP	topeltposiitivne ( <i>double positive</i> )
FBS	veise loote seerum ( <i>fetal bovine serum</i> )
FOXP3	<i>forkhead box P3</i>
GADPH	glütseraldehüüd-3-fosfaat dehüdrogenaas ( <i>glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i> )
HET	heterosügoot
ICAM1	rakusisene adhesioonimolekul 1 ( <i>intercellular adhesion molecule 1</i> )
IFN $\gamma$	interferoon $\gamma$ ( <i>interferon <math>\gamma</math></i> )
IL	interleukiin ( <i>interleukin</i> )
INV	involukriin ( <i>involucrin</i> )
KLK	kallikreiiniga seotud peptidaas ( <i>kallikrein-related peptidase</i> )
KO	geennokauditud ( <i>knock-out</i> )
LIPS	lutsiferaasi immunosadestamissüsteem ( <i>luciferase immunoprecipitation system</i> )
MHC	peamine koesobivuskompleks ( <i>major histocompatibility complex</i> )
mTEC	tüümuse säsi epiteelirakk ( <i>medullary thymic epithelial cell</i> )
MUC	mutsiin ( <i>mucine</i> )
NGS	tavaline kitseseerum ( <i>normal goat serum</i> )
PBS	fosfaadiga puhverdatud soolalahus ( <i>phosphate-buffered saline</i> )
RPMI	Roswell Park Memorial Institute

SP	üksikpositiivne ( <i>single positive</i> )
SPINK5	5. Kazal tüüpi seriinproteaasi inhibiitor ( <i>serine protease inhibitor, Kazal-type 5</i> )
TNF $\alpha$	tuumori nekroosi faktor $\alpha$ ( <i>tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i> )
T <sub>reg</sub>	regulatoorne T-rakk ( <i>regulatory T-cell</i> )
TSA	koespetsiifiline antigeen ( <i>tissue specific antigen</i> )
TSLP	tüümuse stromaalne lümfoetiin ( <i>thymic stromal lymphopietin</i> )
UEA1	<i>Ulex europaeus agglutinin 1</i>
VCAM	veresoone raku adhesioonimolekul ( <i>vascular cell adhesion protein</i> )
XCL1	C-motiivi sisaldav ligand 1 ( <i>chemokine (C motif) ligand</i> )

## Sissejuhatus

Tüümus on immuunsüsteemi üks tähtsamaid organeid, kus toimub T-rakkude areng. T-rakud on immuunsüsteemi ühed kõige olulisemad rakud, kes suudavad eristada normaalseid keharakke patogeenidest ja kasvajatest ning indutseerida nende vastu immuunvastuse. Häired T-rakkude arengus võivad põhjustada autoimmuunhaigusi või immuunpuudulikkust. Autoimmuunsuse ärahoidmine tagatakse tsentraalse tolerantsusega, mille käigus elimineeritakse negatiivse selektsiooni käigus liiga tugevalt kehaomaseid valke äratundvad autoreaktiivsed T-rakud või suunatakse nad diferentseeruma immuunvastuseid mahasuruvateks regulatoorseteks T-rakkudeks (*regulatory T-cell*,  $T_{reg}$ ). Kõige olulisemad tsentraalse tolerantsuse kujundajad on tüümuse säbiosas paiknevad epiteelirakud (*medullary thymic epithelial cell*, mTEC), kellel on eriline võime ekspresseerida ja esitleda arenevatele T-rakkudele valke, mida tavaolukorras ekspresseeritakse vaid koespetsiifiliselt (*tissue specific antigen*, TSA). Väga paljude koespetsiifiliste valkude ekspressiooni eest vastutab transkriptsiooniregulaator AIRE (autoimmuunregulaator, *autoimmune regulator*), mille puudulikkusel tekib raske ja haruldane autoimmuunhaigus APECED (autoimmuunne polüendokrinopaatia-kandidoos-ektodermaalne düstroofia, *autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy*) ning seetõttu peetakse AIRE-t tsentraalse tolerantsuse kujunemisel üheks kõige kriitilisemaks valguks.

APECED on monogeenne haigus, mis teeb temast suurepärase mudelhaiguse uurimaks tsentraalse tolerantsuse kujunemist ning selle häiretest tingitud autoimmuunfenotüüpi. Saadud teadmised võimaldavad mõista immuunsüsteemi nii füsioloogilistel kui ka patoloogilistel tingimustel. Seni on APECED-i uurimiseks kasutatud enamasti Aire KO (geennokauditud, *knock-out*) hiiri, kuna inimeste kaasamine uuringutesse on olnud piiratud, sest APECED haigus on üliharuldane ning tüümus vananedes taandareneb. Samas, Aire KO hiire fenotüüp ei jäljenda APECED-i fenotüüpi ning see omakorda tõstatab küsimuse, mil määral on hiirelt saadud teadmised ülekantavad inimestele. Seetõttu löid Ossart jt. tööühm Aire KO rotimudeli, mida kasutati ka siinses magistritöös, ning kelle fenotüüp on väga sarnane APECED-i patsientide fenotüübiga (Ossart jt., 2018).

Käesoleva töö üks eesmärk oli uurida rotimudelis Aire puudulikkuse tõttu tekkivat autoimmuunfenotüüpi ning teine eesmärk oli uurida Aire rolli tsentraalse tolerantsuse tekkimises.

Magistritöö koostati Bio- ja Siirdemeditsiini instituudis Molekulaarpatoloogia uurimisgrupis.

# 1. Kirjanduse ülevaade

## 1.1 Tüümus

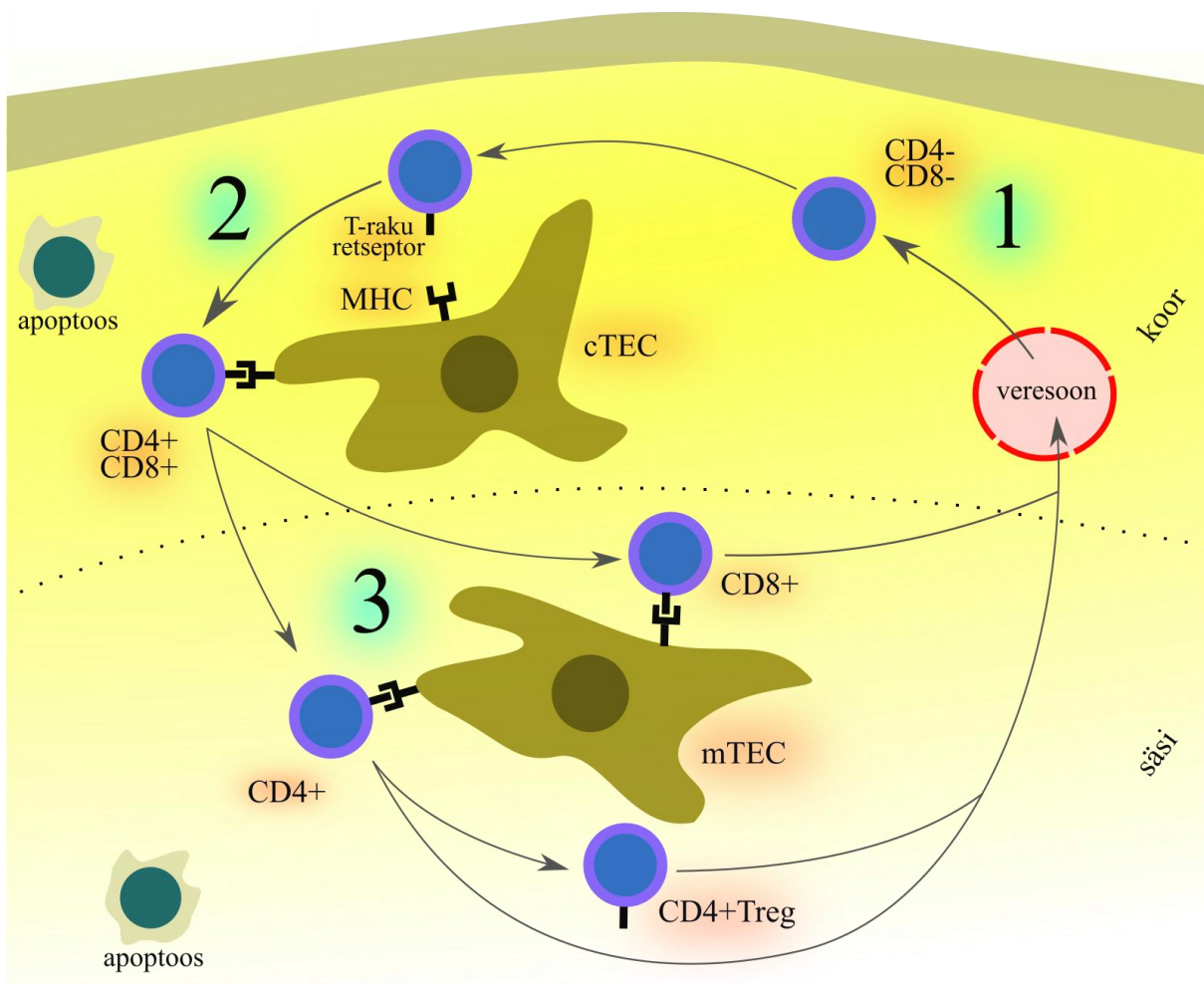
Immuunsüsteemi üheks oluliseks omaduseks on tema võime eristada oma võõrast. Selle eristusvõime üheks tähtsamaks komponendiks on T-rakud, kes tunnevad oma T-raku retseptoriga ära teiste rakkude MHC molekulide (peamine koosobivuskompleks, *major histocompatibility complex*) vahendusel esitatud võõrvalke ja initsieerivad nende rakkude vastu immuunvastuse (Thapa ja Farbeer, 2019). T-rakkude areng leiab aset tüümuses, kus toimub tsentraalse tolerantsuse tekitamine, mille käigus elimineeritakse negatiivse selektsiooni käigus autoreaktiivsed T-rakud või suunatakse nad diferentseeruma  $T_{reg}$ -ideks, kelle ülesanne on maha suruda autoimmuunseid immuunvastuseid (Sprent ja Kishimoto, 2001).

Tüümus on rinnaku taga paiknev elund, mis koosneb kahest sagarast ning iga sagar omakorda väiksematest sagarikest. Tüümuses saab eristada seesmist säsiosa ja välist kooreosa (Roosalu, 2010). Tüümus sisaldab põhiliselt tümotsüüte ehk ebaküpseid T-rakke ning veel tüümuse epiteelirakke, dendriitrakke jt. rakke. Tüümuse epiteelirakud jaotatakse nende asukoha alusel kaheks põhipopulatsiooniks: säsiosas paiknevad säsi epiteelirakud ja kooreosas paiknevad koore epiteelirakud (*cortical thymic epithelial cell*, cTEC). Tüümuse epiteelirakud moodustavad tüümuses keerulise kolmemõõtmelise keskkonna ning koos dendriitrakkude jt. rakkudega osalevad tümotsüütide arengus, milles on olulised nii rakkude omavahelised interaktsioonid kui ka signaalmolekulide, s.h rakkude liikumist suunavate kemokiinide, tootmine (Klein jt., 2011).

T-rakud jaotatakse CD4 (diferentseerumise klaster, *cluster of differentiation*) ja CD8 pinnamarkeri alusel kahte põhipopulatsiooni – tsütotoksilised  $CD8^+$  T-rakud ja  $CD4^+$  T-abistajarakud. Tsütotoksilised  $CD8^+$  T-rakud viivad põhiliselt läbi rakulist immuunsust, kutsudes nakatunud rakkudes ja vähirakkudes esile apoptoosi (Wong ja Pamer, 2003).  $CD4^+$  T-abistajarakud on väga heterogeenne grupp rakke, kes toodavad tsütokiine, millega nad reguleerivad immuunsüsteemi. Kolmanda,  $CD4^+$  T-abistajarakkudest eraldiseisva, grupina käsitletakse tavaliselt  $CD4^+$  FOXP3<sup>+</sup> (*forkhead box P3*)  $T_{reg}$ -e (edaspidi  $T_{reg}$ ), kes on olulised homöostaasi hoidmisel, surudes maha autoimmuunseid immuunreaktsioone ja hoides ära immuunvastuste ülereageerimist (Zhu jt., 2010).

### 1.1.1 Türotsüütide diferentseerumine

Türotsüütide areng jaotatakse CD4 ja CD8 pinnamarkeri alusel kolme põhietappi: CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> DN (topeltnegatiivne, *double negative*), CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> DP (topeltpositiivne, *double positive*) ja CD4<sup>+</sup> või CD8<sup>+</sup> SP (üksikpositiivne, *single positive*). Areng algab DN etapiga, kus luuüdi päritolu CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> T-raku eellased sisenevad vereringest säsi ja koore piirilt tüümusesse. Sealt liiguvad nad koore suunas ning DN etapi lõpus ja DP etapi alguses hakkab toimuma T-raku retseptorit kodeerivate geenide juhuslik rekombinatsioon, mille õnnestumisel hakkavad tümötsüüdid ekspresseerima funktsioneerivat T-raku retseptorit. Kui tümötsüüdid hakkavad ekspresseerima funktsionaalset T-raku retseptorit, peab see kontakteeruma MHC pinnal oleva antigeeniga, mida ekspresseerivad cTEC-id jt. rakud. Tümötsüütide antigeenideks on kehaomastest valkudest pärit peptiidid, mis spetsiifiliselt seonduvad T-raku retseptoriga. Kui areneva tümötsüüdi T-raku retseptoril on liiga tugev või nõrk afiinsus MHC pinnal oleva antigeeni suhtes, siis suunatakse tümötsüüt apoptoosi. Taolist protsessi, kus cTEC-id jt. rakud annavad tümötsüütidele MHC molekuli vahendusel ellujäämissignaale, nimetatakse positiivseks selektsiooniks. Positiivselt selekteeritud tümötsüüdid liiguvad säsisse, kus toimub eristumine CD4<sup>+</sup> T-abistajarakudeks või tsütotoksilisteks CD8<sup>+</sup> T-rakkudeks. Säsis toimub mTEC-ide ja dendriitrakkude abil tümötsüütide negatiivne selektsioon, mille käigus elimineeritakse potentsiaalselt autoreaktiivsed T-rakud, kellel on liiga tugev või nõrk afiinsus MHC pinnal oleva antigeeni suhtes. Enamik tümötsüüte suunatakse negatiivse selektsiooni käigus apoptoosi ja tüümusest väljuvad reeglina kehaomaseid antigeene mitteäratundvad tsütotoksilised CD8<sup>+</sup> T-rakud või CD4<sup>+</sup> T-abistajarakud (Rothenberg jt., 2016). Osa CD4<sup>+</sup> tümötsüütidest, kellel on kõrge afiinsus kehaomaste antigeenide suhtes, arenevad IL2 (interleukiin 2, *interleukin 2*), IL15, TSLP (tüümuse stromaalne lümfoepoetiin, *thymic stromal lymphopoietin*) jt. molekulide toimel T<sub>reg</sub>-ideks (joonis 1) (Burchill jt., 2007; Jiang jt., 2006; Kondělkov jt., 2010).

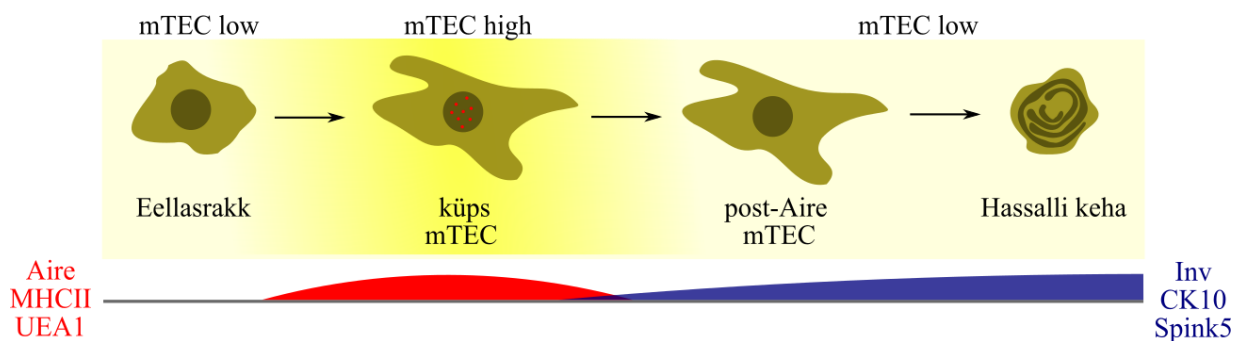


**Joonis 1.** Türotsüütide areng tüümuses. **(1)** Türotsüütide areng algab DN etapiga, kus vereringest sisenevad tüümusesse luuüdi päritolu  $CD4^-CD8^-$  T-raku eellased. **(2)** DN etapi lõpus ja DP alguses toimub T-raku retseptorit kodeerivate geenide juhuslik rekombinatsioon, mille õnnestumisel hakkavad  $CD4^+CD8^+$  türotsüüdid ekspresseerima funktsionaalset T-raku retseptorit, mis peab kontakteeruma cTEC-id jt. rakkude MHC molekulide pinnal oleva antigeeniga. Toimub positiivne selektsioon, mille käigus saavad ainult need türotsüüdid cTEC-idelt jt. rakkudelt ellujäämis-signaale, kelle afiinsus MHC pinnal oleva antigeeni suhtes ei ole liiga tugev või nõrk. **(3)** Edasi liiguvad positiivselt selekteeritud türotsüüdid säsisse, kus nad eristuvad tsütotoksilisteks  $CD8^+$  T-rakkudeks või  $CD4^+$  T-abistajarakkudeks. Säsiosas läbivad türotsüüdid negatiivse selektsiooni, mille käigus need türotsüüdid, kellel on liiga tugev või nõrk afiinsus MHC pinnal oleva antigeeni suhtes, suunatakse apoptoosi ning osa  $CD4^+$  türotsüüdid, kellele on liiga tugev afiinsus MHC pinnal oleva antigeeni suhtes, suunatakse diferentseeruma  $T_{reg}$ -ideks. Joonis on tehtud uurimistöo autori poolt Inkscape 0.92 tarkvaraga.

### 1.1.2 Tuumuse säsi epiteelirakud ja tuumuse taandareng

mTEC-id on väga heterogeenne grupp rakke, mis hõlmab erineva funktsionaalsusega ja diferentseerumisjärgus olevaid rakupopulatsioone. Sünnijärgses tuumuses eristatakse kaht põhilist mTEC-ide alampopulatsiooni: mTEC<sup>high</sup> populatsioon, kellel on kõrge MHC II valguekspressioon ja suur reaktiivsus lektiini UEA1 (*Ulex europaeus agglutinin I*) suhtes, ning mTEC<sup>low</sup> populatsioon, kellel on vastavate molekulide tase madalam (Takahama jt., 2017). mTEC<sup>high</sup> on kõige kõrgemas aktiivsustasemes olev mTEC-ide rakupopulatsioon ning põhiline tümotsüütide negatiivse selektsiooni eest vastutav rakupopulatsioon. Tema eripäraks on see, et ta ekspresseerib antigene, mida tavaolukorras ekspresseeritakse koospetsiifiliselt, nagu näiteks pankreasespetsiifilist insuliini, ning suure osa koospetsiifiliste antigeenide ekspressiooni eest vastutab transkriptsiooniregulaator AIRE (Liston jt., 2003). mTEC<sup>low</sup> populatsioon hõlmab mitmeid erinevaid rakupopulatsioone, mille hulgas on nii mTEC<sup>high</sup> eellasrakud kui ka AIRE ekspresseerimise lõpetanud post-Aire rakud. Küpsed mTEC<sup>high</sup> rakud ekspresseerivad AIRE-t lühikest aega, misjärel hakkab neis langema AIRE ja MHC II ekspressioon, vähenema reaktiivsus UEA1 suhtes ning tõusma CK10 (tsütokeratiin 10, *cytokeratin 10*) ekspressioon ning rakkudest saavad post-Aire rakud (Abramson ja Anderson, 2017). Diferentseerumise lõpufaasis hakkavad post-Aire rakud ekspresseerima involukriini (*involucrin*, Inv) ja Spink5 (5. Kazal tüüpi seriinproteaasi inhibiitor; *serine protease inhibitor*, *Kazal-type 5*) rakud hakkavad koonduma ning moodustavad lõpuks rakukogumikud, mida kutsutakse Hassalli kehadeks (joonis 2) (Galliano jt., 2005; Wang, X. jt., 2012). Post-Aire rakkude, s.h Hassalli kehade, funktsioonist teatakse väga vähe – on leitud, et Aire ekspresseerimise lõpetanud rakud säilitavad mõneks ajaks võime ekspresseerida TSA-sid ning aitavad läbi viia negatiivset selektsiooni ja Hassalli kehad toodavad madalal tasemel tsütokiine, mis arvatakse olevat olulised tümotsüütide arengus (Metzger jt., 2013; Wang, J. jt., 2019).

Tuumuse üks kõige huvitavaimaid nähtusi on tema taandareng ehk involutsioon, mida iseloomustab tuumuse massi vähenemine ja funktsionaalse koe asendumine rasv- ja sidekoega. Tuumuse taandareng toimub teadaolevalt kõikidel selgroogsetel ning tema evolutsiooniline mõte ei ole veel senini selge. Tuumuse taandarengumehhanismidest teatakse väga, kuid arvatakse, et selles on keskne roll tuumuse epiteelirakkudel (Abramson ja Anderson, 2017).



**Joonis 2.** mTEC-i diferentseerumistapid. mTEC<sup>low</sup> on heterogeenne grupp rakke, mis hõlmab nii mTEC<sup>high</sup> eellarakke kui ka Aire ekspresseerimise lõpetanud post-Aire rakke, s.h Hassalli kehi. mTEC-ide diferentseerumine algab eellarakust, kellel hakkab tõusma Aire ja MHC II ekspressioon ning suurenema reaktiivsus UEA1 suhtes ja tekib küps mTEC<sup>high</sup> rakk. Seejärel hakkab vastavate molekulide tase langema, tõuseb Inv, CK10 ja Spink5 ekspressioon ning mTEC<sup>high</sup> rakust saab post-Aire rakk. Post-Aire rakud hakkavad koonduma ning moodustub Hassalli keha. Joonis on tehtud uurimistöö autori poolt Inkscape 0.92 tarkvaraga.

## 1.2 AIRE

AIRE on transkriptsiooniregulaator, mida kodeerib *AIRE* geen. Mutatsioon(id) *AIRE* geenis põhjustab (põhjustavad) häire tsentraalse tolerantsuse tekkes, mille tõttu tekib väga haruldane, retsessiivne autoimmuunhaigus APECED (Aaltonen jt., 1997). APECED-i patsientidel tekivad mitmed autoimmuunsusega seotud sümptomid, nagu autoantikehad, krooniline naha- ja limaskestade kandidoos, alopeetsia ja organtalitluse häired. Sümptomid tekivad üsna noores eas, mis ajajooksul süvenevad, ning võivad indiviidide vahel varieeruda (Husebye jt., 2018). Seni ei ole täpselt selge, miks Aire puudulikkusest tekib häire tsentraalses tolerantsuses. Hiiremudelite põhjal on välja pakutud erinevaid mehhanisme, kuidas Aire tsentraalselt tolerantsust mõjutab: puudulik TSA-de ekspressioon, häired tüümuse epiteeli diferentseerumises, muutunud kemokiinide ekspressiooniprofiil või häired T<sub>reg</sub>-ide diferentseerumises (Laan ja Peterson, 2013). Enamgi veel, Aire madal ekspressioon toimub ka väljaspool tüümust, näiteks lümfisõlmedes ja testistes, kus tema funktsioonist ja rollist autoimmuunsuse ärahoidmisest teatakse väga vähe (Eldershaw jt., 2011).

TSA-de ekspressioon põhjustab autoreaktiivsete tümotsüütide negatiivset selektsiooni ning on näidatud, et puudulik TSA-de ekspressioon võib põhjustada koespetsiifilisi autoimmuunreaktsioone. Aire KO hiires on paljude TSA-de ekspressioon langenud, mis on omakorda andnud alust arvata, et Aire roll TSA-de ekspressiooni reguleerimises on üks olulisemaid mehhanisme

tsentraalne tolerantsuse kujunemises (Metzger ja Anderson, 2011). Faktorid, mis mõjutavad Aire-st sõltuvate TSA-de ekspressiooni, on mitmeid. Esiteks, Aire-st sõltuvate TSA-de ekspressioonimustri kujunemisel on oluline roll geneetilisel taustal, sest erinevate hiireliinide TSA-de ekspressioonimustri võrdlusel on leitud, et igal hiireliinil on oma Aire-st sõltuv ekspressioonimuster, mis eri liinide vahel veidi erineb (Venantzi jt., 2008). Teiseks on leitud, et Aire reguleerib TSA-sid mitte ühekaupa, vaid pigem üksteisele füüsiliselt lähedal paiknevate geeniklastritena – näiteks on leitud, et hiires on mutsiiniklaster (*mucin*, Muc) ja kallikreiniklaster (*kallikrein*, Klk) Aire poolt reguleeritud (Brennecke jt., 2015; Stephens ja McNamara, 2015). Kolmandaks osutub, et TSA-de aktivatsioon mTEC-ides on juhuslik ja ajutine (Derbinski jt., 2008). Arvatakse, et taoline geneetikast sõltuv, juhuslik ja klasterdunud TSA-de ekspressiooni evolutsiooniline eesmärk on tagada indiviidide vahel suur T-raku retseptorite variatsioon, et paremini kaitsta organismi patogeenide eest (Venantzi jt., 2008).

Tuumuse epiteelirakkudel on oluline roll tsentraalse tolerantsuse kujunemisel, kuna nende ülesanne on elimineerida negatiivse selektsiooni käigus autoreaktiivsed tümotsüüdid või suunata nad diferentseeruma  $T_{reg}$ -ideks. Aire KO hiirtel on tuumuse epiteeli diferentseerumine häiritud, mistõttu on oletatud, et häire tsentraalses tolerantsuses võib olla tingitud häirest tuumuse epiteeli diferentseerumises (Laan ja Peterson, 2013). Esmased tõendid Aire rollist tuumuse diferentseerumisest tulid Aire KO hiire tuumuse morfoloogia uuringutest, kus täheldati, et Aire KO hiire tuumuse säsiomas on mTEC-idega seonduv UEA1 fluoretsentssignaal nõrgem, UEA1<sup>+</sup> mTEC-id ei moodusta klastreid ning CK14<sup>+</sup> mTEC-de võrgustik on hõredam kui kontrollloomades (Gillard jt., 2007). Tuumuse epiteelirakkude uurimisel on selgunud, et Aire puudulikkuse tõttu on häiritud ennekõike mTEC-ide lõppdiferentseerumine, mida ilmestab Aire KO säsis vähenenud Hassalli kehade arv ning suurenenud mTEC<sup>high</sup>-de osakaal, mis näitab, et post-Aire rakkudes on diferentseerumine peatunud (Yano jt., 2008). Kuidas Aire tuumuse epiteeli diferentseerumist mõjutab, ei ole teada. Ühe hüpoteesi kohaselt on Aire otseselt seotud mTEC-ide arenguga, indutseerides nende rakkude edasist diferentseerumist. Sellest hüpoteesist tulenevalt on välja pakutud nõ küpsemismudel, mille kohaselt Aire indutseerib mTEC-i edasist diferentseerumist ning alles siis saavutab mTEC võime ekspresseerida TSA-sid. Teise hüpoteesi kohaselt Aire ei osale otseselt mTEC-ide diferentseerumises ning häire nende rakkude diferentseerumises on tingitud mõne muu molekuli(de) poolt, mille funktsioon on Aire puudulikkuse tõttu häiritud (Matsumoto, 2011).

Kemokiinidel on tähtis roll koordineerida tümotsüütide liikumist läbi kõikide diferentseerumisetappide, mille käigus tekitatakse tsentraalne tolerantsus (Laan ja Peterson, 2013). Aire KO hiire tüümuses on kemokiinide ekspressiooniprofiil muutunud, kuid siiski on väga paljude kemokiinide roll, mille ekspressioon on Aire puudulikkuse tõttu häiritud, tsentraalse tolerantsuse tekkes kas väheoluline või teadmata (Anderson jt., 2005). Kõige olulisemad kemokiinid, mis on tüümuse epiteelirakkudes Aire poolt reguleeritud, on Ccl5 (C-C motiivi sisaldav kemokiin 5, *C-C motif chemokine ligand 5*), Ccl17, Ccl21, Ccl19 ja Ccl22. Arvatakse, et need kemokiinid on olulised CD4<sup>+</sup> tümotsüütide lõppdiferentseerumises, kuna on leitud, et Aire KO hiires toimub CD4<sup>+</sup> tümotsüütide enneaegne küpsemine ja pääsemine vereringesse. Arvatakse, et enneaegse küpsemise tõttu ei läbi tümotsüüdid negatiivset selektsiooni, mis omakorda põhjustab autoimmuunsust. Seni pole teada, kas häired kemokiinide ekspressioonis on põhjustatud defektist tüümuse epiteeli diferentseerumises või Aire reguleerib kemokiinide ekspressiooni otse (Laan jt., 2009).

T<sub>reg</sub>-id on tsentraalse tolerantsuse kujunemise üks alustalasisid, kelle põhiülesanne on maha suruda autoimmuunreaktsioone ning häired T<sub>reg</sub>-ide diferentseerumises võivad põhjustada tõsiseid autoimmuunhaigusi (Wing ja Sakaguchi, 2010). Aire KO hiire tüümuses ja APECED-i patsientide veres on vähem T<sub>reg</sub>-e, mis näitab, et Aire mõjutab T<sub>reg</sub>-ide diferentseerumist, kuid ei ole teada kuidas see toimub. Arvatakse, et Aire osaleb T<sub>reg</sub>-ide positiivses selektsioonis, kus autoreaktiivne CD4<sup>+</sup> tümotsüüt diferentseerub Aire-st sõltuva TSA toimel T<sub>reg</sub>-ks. Aire puudulikkuse tõttu Aire poolt indutseeritud T<sub>reg</sub>-e aga ei teki ning CD4<sup>+</sup> tümotsüüdid arenevad autoreaktiivseteks T-rakkudeks. Siiski on leitud, et enamuse T<sub>reg</sub>-e tekib Aire-st sõltumatult ning Aire poolt indutseeritud T<sub>reg</sub>-ide roll tsentraalse tolerantsuses kujunemises ei ole teada (Anderson ja Su, 2016). On ka pakutud, et Aire mõjutab T<sub>reg</sub>-ide teket kaudselt, näiteks dendriitrakkude liikumist suunava kemokiini Xcl1 (C-motiivi sisaldav ligand 1, *chemokine (C motif) ligand*) kaudu. Nimelt, Aire KO hiire tüümuses on langenud Xcl1 ekspressioon, mistõttu on langenud dendriitrakkude arvukus. Dendriitrakud osalevad aga T<sub>reg</sub>-ide diferentseerumises ning nende rakkude arvukus põhjustab omakorda häire T<sub>reg</sub>-ide tekkes (Lei jt., 2011).

Viimasel ajal on kirjeldatud APECED-i patsientidel ja teisi autoimmuunhaigusi põdevatel haigetel tsütokiinidevastaseid autoantikehasid – näiteks tekivad pea kõikidel APECED-i patsientidel interferoonidevastased autoantikehad (Meager jt., 2006; Zhang jt., 2007). Interferoonid on olulised tsütokiinid, mis osalevad põhiliselt immuunvastuste läbiviimisel (Borden jt., 2007), kuid neil on leitud ka füsioloogilisi funktsioone, näiteks osalemine organogeneesis (Takayanagi jt., 2002). Tsütokiinidevastased autoantikehad muudavad aga aursaama autoimmuunhaigustest, kuna

enam ei ole tegemist haigustega, kus tekivad organspetsiifilised immuunvastused, vaid rünnaku all on hoopis terved süsteemid. Senini pole teada, miks tekivad APECED-i patsientidel tsütokiinidevas-tased autoantikehad ja mis rolli nad mängivad APECED-i fenotüübi kujunemisel (Passos, 2019).

### **1.3 Aire KO rotimudel**

Kui pea 20 aastat tagasi leiti seos APECED-i haiguse ja *Aire* geeni vahel, loodi tsentraalse tolerantsuse uurimiseks mitmeid Aire KO hiireliine. Samas, hiiremudeli fenotüüp ei jäljenda patsientide APECED-i fenotüüpi – hiirel on sümptomid suhteliselt kerged ning paljud tüüpilised APECED-i sümptomid, nagu kandidoos, puuduvad sootuks või tekivad alles väga kõrges eas (Aaltonen jt., 1997; Mathis ja Benoist, 2009). Enamgi veel, hiirel ei teki interferoonidevastased autoantikehad, kuigi pea kõikidel APECED-i patsientidel need tekivad (Meager jt., 2006; Zhang jt., 2007). See aga tõstatab küsimuse, mil määral on hiiremudelitest saadud teadmised ülekantavad teistele liikidele, s.h inimestele.

Ossart jt. võtsid kasutusele Aire KO rotiliini, mida kasutati ka siinses uurimistöös, ning nad nägid, et juba üsna noortes, 6-kuustes rottides, sõltumata rotiliinist, tekivad tsütokiinidevastased autoantikehad ja silmnähtavad APECED-ile iseloomulikud sümptomid: alopeetsia, karvastiku depigmentatsioon ja küünte düstroofia. Leiti, et üheaastastel Aire KO rottidel olid paljud organid, nagu näiteks neerud, epidermis ja maks infiltreerunud põletikurakkudega ning nekroosis, samas süljenäärmetes tugevat põletikku ei täheldatud. Huvitaval kombel täheldasid uurijad, et 1-aastastel Aire KO rottidel oli 73% juhtudest tuumus makroskoopiliselt kadunud, samas kontroll-loomadel oli tuumus kadunud kolmandikul juhtudest, mis viitab tuumuse taandarengu kiirenemisele Aire KO rottides. Uurijad järeldasid, et rotimudeli fenotüüp on väga sarnane APECED-i patsientide fenotüübiga, mis teeb temast uue ja lootustandva loomumudeli tsentraalse tolerantsuse uurimiseks (Ossart jt., 2018).

### **1.4 APECED-i autoimmuunfenotüüp**

APECED-i patsientidel ja Aire KO hiirtel tekivad mitmed organtalitushäirest tingitud sümptomid, nagu 1. tüüpi diabeet või kilpnäärme alatalitus, mis arvatakse olevat põhjustatud koekahjustustest. Aire KO hiirtel tekivad tõepoolest paljudesse kudedesse põletikulised rakuinfiltraadid, mis häirivad koe funktsiooni (Husebye jt., 2018). Põletikulistes kudedes toimuvad autoimmuunsed protsessid on kompleksed ja dünaamilised ning arvatakse, et seal on kesksel kohal

autoreaktiivsed T-rakud: CD4<sup>+</sup> T-abistajarakud, kes reguleerivad põletikuprotsesse, ning tsütotoksilised CD8<sup>+</sup> T-rakud, kes arvatakse olevat põhilised rakud, kes viivad läbi koehävingut (Luger jt., 2012). Samas, arvatakse, et APECED-i kujunemises mängivad olulist rolli ka autoreaktiivsed B-rakud, kuna Aire puudulikel hiirtel ja inimestel tekivad autoantikehad ning Aire KO hiirte põletikulistesse kudedesse, nagu maksa või süljenäärmesse, infiltreeruvad B-rakud. B-rakkude infiltreerumine mitteimmuunkudedesse on omane ainult autoimmuunhaigustele ning pole päris selge, miks see toimub ning millist rolli mängivad B-rakud APECED-i haiguse kujunemises (DeVoss jt., 2010; Gavanescu jt., 2008; Hässler jt., 2006).

APECED on monogeenne haigus, mis teeb temast hea mudelhaiguse teiste autoimmuunhaiguste uurimiseks. Paljud uurijad on kasutanud Aire KO hiiri autoimmuunhaiguse Sjögreni sündroomi uurimiseks, kuna Aire KO hiired sarnanevad sellele haigusele mitmeti – nii patsientidel kui ka Aire KO hiirtel tekivad sülje- ja pisaranäärmetes B- ja T-rakke sisaldavad rakuinfiltraadid ning tekib silmade ja suu limaskestade kuivus (Chan, M. F. jt., 2007; DeVoss jt., 2010). Pole selge, mis inimestel Sjögreni sündroomi põhjustab, kuid arvatakse, et see tekib geneetika ja keskkonna koosmõjul (Brito-Zerón jt., 2016). Sjögreni sündroomi patsientide süljenäärmete uurimisel on selgunud, et süljenäärme näärmeline osa ekspresseerib infiltreerunud piirkonnas MHC II, CD80, ICAM1 (rakusisene adhesioonimolekul 1, *intercellular adhesion molecule 1*), VCAM (veresoone raku adhesioonimolekul, *vascular cell adhesion protein*) jt. molekule, mida üldiselt ekspresseerivad immuunrakud, tüümuse epiteel ning põletikulises olukorras endoteel. Arvatakse, et süljenääre on võimeline nende molekulide vahendusel aktiveerima CD4<sup>+</sup> T-abistajarakke ning selle kaudu veelgi võimendama iseenda hävingut. Mehhanismid, mis muudavad süljenäärmed immuunrakke aktiveerivateks rakkudeks, pole täiesti selged, kuid arvatakse, et selles osalevad tsütokiinid, nagu IFN $\gamma$  (interferoon  $\gamma$ , *interferon  $\gamma$* ) ja TNF $\alpha$  (tuumori nekroosi faktor  $\alpha$ , *tumor necrosis factor  $\alpha$* ) (Tsunawaki jt., 2002).

Aire KO rott on potentsiaalne mudelloom uurimaks tüümuses B-raku agregaatide olemasolu ning nende rolli autoantikehade tootmises. Nimelt, autoimmuunset närvilishashagust põdevatel müasteenia patsientidel tekivad tüümuses B-raku agregaadid ning nii nagu APECED-i patsientidel, tekivad ka müasteenia patsientidel interferoonidevastased autoantikehad ning tüümuse funktsioonihäired, mis on omakorda andnud alust arvata, et müasteenia patoloogia võib olla tingitud häirest tsentraalsest tolerantsusest. APECED-i ja paljude teiste autoimmuunhaiguste korral tekivad autoantikehad, mille tootmiskoht ei ole sageli teada, ning seni pole tüümust kui autoantikehade allikat uuritud (Bofill jt., 1985; Passos, 2019).

## 2. Eksperimentaalosa

### 2.1 Töö eesmärgid

Antud uurimistöö üks eesmärk oli uurida Aire puudumisest tingitud tsentraalse tolerantsuse häirega kaasuvat autoimmuunfenotüüpi ning eesmärgi saavutamiseks:

- hinnati Aire KO rotimudeli APECED-i fenotüüpi;
- kirjeldati maksas ja süljenäärmes autoimmuunfenotüüpi;
- otsiti tuumusest B-raku agregate.

Uurimistöö teine eesmärk oli välja selgitada Aire rolli tsentraalse tolerantsuse tekkes ning eesmärgi saavutamiseks uuriti tuumuses:

- morfoloogiat;
- tuumuse epiteelirakkude diferentseerumist;
- kemokiinide ja TSA-de ekspressiooni;
- tümotsüütide diferentseerumist.

### 2.2 Materjalid ja metoodika

#### 2.2.1 Rotid

Uurimistöös kasutati uuritava rühmana homosügootseid geenokauditud Aire rotte (Aire KO) ja kontrollrühmana heterosügootseid Aire rotte (Aire HET). Rotid saadi Nantese Ülikoolist Prantsusemaalt ning nende genereerimine on kirjeldatud Ossart jt. töös (Ossart jt., 2018). Rotid kasvatati üles Tartu Ülikooli Molekulaar- ja Rakubioloogia instituudi vivaariumis. Katsetes kasutati võrdselt nii emaseid kui ka isaseid rotte, kes olid 1–2 kuu vanused, kui töös ole öeldud teistmoodi. Rotid uinutati isofluraaniga Isocare (Animalcare) ja surmati südame punktsioonil teostatud veretustamise teel ning seejärel koguti koed edasiseks analüüsiks. Rottides mõõdeti tuumuse massid ning LIPS-meetodiga (lutsiferaasi immunosadestamissüsteem, *luciferase immunoprecipitation system*) vereseerumist interferoonidevastaste autoantikehade tasemed, mille mõõtmises uurimistöö autor ei osalenud. Loomkatsete tegemiseks andis loa Põllumajandusministeeriumi loomkatse läbiviimise loakomisjon (luba nr 139).

## 2.2.2 Voolutsütomeetria ja rakkude sortimine

Tuumuse epiteelirakkude efektiivsemaks sortimiseks viidi läbi eelnevalt rikastamine, mille käigus eemaldati tuumusest tümotsüüte. Rikastamiseks hakiti tuumused esmalt umbes 2 mm<sup>3</sup> suurusteks tükkideks ning koetükid pandi 50 ml 2% FBS-i (veise seerumi albumiin, *fetal bovine seerum*, Gibco) sisaldava RPMI (Roswell Park Memorial Institute, Thermo Fisher Scientific) söötmesse. Koetükke suspendeeriti seroloogilise pipetiga 20 korda üles-alla, misjärel lasti tuumuse tükkidel 5 min põhja settida. Seejärel eemaldati peamiselt tümotsüüte sisaldav supernatant, lisati uus sööde ning sama tsüklit teostati 6–9 korda, pärast mida korrati tsüklit veel 4–6 korda, kasutades suspendeerimiseks 15 ml söödet. Üherakulise suspensiooni saamiseks inkubeeriti koetükke esmalt 20 min 37 °C söötmes, kuhu oli lisatud 15 U/ml DNAasi I (Applichem) ja 125 U/ml kollageenaasi II (Gibco). Pärast esimest inkubatsiooni eemaldati põhiliselt tümotsüüte sisaldav supernatant ja lisati uus sööde, milles oli kollageenaasi II ja DNAasi I samas kontsentratsioonis, kuid kuhu oli lisatud veel 0,75 U/ml dispaasi (Gibco), ning proove inkubeeriti 20 min 37 °C juures. Supernatant eemaldati ning proove inkubeeriti samade lisanditega söötmes 37 °C juures, kuni tuumuse tükid olid täielikult üherakuliseks suspensiooniks lahutatud. Rakususpensioon sõeluti, loendati ning seejärel rakke hoiti vastavate antikehadega 30 min 4 °C juures, mis on välja toodud tabelis 1. Rakud sorditi pinnamarkerite alusel 3 fraktsiooni: cTEC, mTEC<sup>low</sup> ja mTEC<sup>high</sup>. cTEC fraktsiooni sorditi Epcam<sup>+</sup> CD45<sup>-</sup> UEA1<sup>madal</sup> MHC<sup>madal</sup> rakud; mTEC<sup>low</sup> fraktsiooni sorditi Epcam<sup>+</sup> CD45<sup>-</sup> UEA1<sup>keskmine</sup> MHC<sup>keskmine</sup> rakud ja mTEC<sup>high</sup> fraktsiooni Epcam<sup>+</sup> CD45<sup>-</sup> UEA1<sup>kõrge</sup> MHC<sup>kõrge</sup> rakud.

Tuumuse T-rakkude voolutsütomeetriaanalüüsiks võeti tuumuse epiteeli rikastamise käigus tekkiv põhiliselt tümotsüüte sisaldav rakususpensioon. See sõeluti, rakud loendati ja seejärel hoiti rakke 30 min 4 °C juures vastavate antikehadega, mis on välja toodud tabelis 1. Seejärel teostati Foxp3 Fix/Perm Buffer Set (Biolegend) ametliku protokoll järgi tuumasisene Foxp3 värving, mida uurimistöö autor ise ei teinud.

Rakkude sõelumisel kasutati 100 µm silmaga sõelu (Thermo Fisher Scientific) ning rakud loendati LUNA-FL<sup>TM</sup> fluorestsentsrakuloenduriga (Logos Biosystems). Elusate rakkude eristamiseks surnutest kasutati akridiinoranži (Logos Biosystems).

Tuumuse epiteelirakkude sortimiseks kasutati MA900 rakusorteri (Sony) ning analüüsiks Sony Cell Sorter (Sony) programmi. Rakud sorditi katsutitesse, mis sisaldasid 1 ml LS TriZol reagenti (Invitrogen). T-rakkude voolutsütomeetriaanalüüsiks kasutati LSRFortessa analüsaatorit (BD Bioscience) ja analüüsiks FACSDiva programmi (BD Bioscience). Graafikute visualiseerimiseks kasutati Graphpad Prism 8 tarkvara. Tulemuste analüüsiks tehtud

punktdiagrammid kujutavad keskmistatud tulemusi koos standardveaga ja statistilise olulisuse määramiseks kasutati t-testi mitte-paarikaupa andmetele, kus \* =  $p < 0,05$ .

**Tabel 1.** Voolutsütomeetrias kasutatavad antikehad.

Antigeen	Kloon	Konjugaat	Lahjendus	Tootja
CD3	1F4	BV605	1:2000	BD Bioscience
CD4	W3/25	PE/Cy7	1:2000	Biologend
CD8	G28	APC	1:400	Biologend
CD25	OX-39	PE	1:200	Biologend
CD45	OX-1	PerCP-Cy5.5	1:80	Biologend
Epcam	GZ1	AF647	1:100	Abcam
Foxp3	150D	AF488	1:20	Biologend
MHC II	Ox6	PE	1:4000	Novusbio
UEA1 (lektiin)	-	FITC	1:1000	Vector

### 2.2.3 RNA eraldamine, cDNA süntees ja RT-qPCR

RNA eraldati tüümuse sagarast ning lõuaalusest süljenäärrest Mini Kiti (Qiagen) ametliku protokoll järgi. Uurimistöö autor ei osalenud ise süljenäärrest RNA eraldamises. RNA eraldamiseks peenestati 1,5 ml katsutis plastiknuiaga koed, kuhu misjärel lisati 200 µl kloroformi ning seejärel inkubeeriti proove 2–3 min toatemperatuuril. Proove tsentrifugeeriti 15 min 12000 rpm 4 °C juures (Centrifuge 5415R, Eppendorf). Tekkinud vesifaas koguti uude katsutisse, kuhu lisati prooviga võrdses ruumalas 70% etanooli. Edasi kanti proovid eralduskolonnile, mis tsentrifugeeriti toatemperatuuril 15 s 8000 rpm. Kolonni lisati 350 µl puhvrit RW1, proovid tsentrifugeeriti samadel tingimustel, seejärel proove inkubeeriti toatemperatuuril 15 min DNaa I-ga (Qiagen). Pärast DNaa si töötlust tsentrifugeeriti proove samadel tingimustel kaks korda RW1 puhvris mahuga vastavalt 350 µl ja 700 µl. Seejärel teostati kaks tsentrifugeerimist samadel tingimustel RPE puhvris mahuga 500 µl. Kolonnidele pandi alla uued 2 ml katsutid ja proove tsentrifugeeriti ilma kaaneta 5 min 16000 rpm. Kolonnidele pandi alla uued 1,5 ml katsutid, lisati 14 µl vett ja tsentrifugeeriti 1 min 16000 rpm.

cDNA sünteesimiseks lisati 10 µl RNA proovile 1 µl 10 mM dNTP segu (Fermentas), 1 µl 500 µg/ml oligo(dT) praimerit (Invitrogen) ja proove inkubeeriti praimerite seondumiseks 5 min 65 °C, pärast mida hoiti proove vähemalt 1 min jääl. Proovidele lisati 4 µl 5x First Strand puhvrit (Invitrogen), 1 µl 40 U/µl ribonukleaasi inhibiitorit RiboLock (Fermentas), 1 µl 0,1 M DTT (Invitrogen) ja 1 µl 200 U/µl SuperScript III pöördtranskriptaasi (Invitrogen). cDNA sünteesiks inkubeeriti proove 60 min 50 °C juures ning ensüümi inaktiveerimiseks 15 min 70 °C juures.

RT-qPCR läbiviimiseks kanti proovid 384 auguga RT-qPCR plaadile (Applied Biosystems) 10 µl kaupa kolme paralleelse kordusena, kus iga 10 µl proov sisaldas 0,5 µl cDNA-d, 9,3 µl 2x Maxima™ SYBR Green/ROX qPCR Master Mix-i (Thermo Fisher Scientific) 0,1 µl 5 mM *reverse* praimerit ja 0,1 µl 5 mM *forward* praimerit. Uurimistöös kasutatud praimerid on välja toodud lisas 1. RT-qPCR tegemiseks kasutati ViiA7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) masinat. Tuumuses mõõdetud tulemused normaliseeriti koduhoidja geeni *B2m* ( $\beta_2$  mikroglobuliin,  *$\beta_2$  microglobulin*) ning süljenäärmes mõõdetud tulemused analüüsiti *Gadph* (glütseraldehyüd-3-fosfaat dehüdrogenaas, *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*) ekspressiooni järgi ning analüüsiti  $\Delta\Delta C_t$  või  $2^{\Delta\Delta C_t}$  meetodiga, kus referentsiks võeti Aire HET rott. Uurimistöö autor ei analüüsinud ise *Ccl5*, *Ccl17*, *Ccl21*, *Ccl19*, *Ccl22* ja *Foxp3* ekspressiooni. Graafikute visualiseerimiseks kasutati Graphpad Prism 8 ja Inkscape 0.92 tarkvara. Tulemuste analüüsiks tehtud punktdiagrammid kujutavad keskmistatud tulemusi koos standardveaga ja statistilise olulisuse määramiseks kasutati t-testi mitte-paarikaupa andmetele, kus \* =  $p < 0,05$ .

#### 2.2.4 Ülegenoomne transkriptomianalüüs

Kuue roti tuumusest sorditud mTEC<sup>high</sup> ja mTEC<sup>low</sup> rakkudest teostati ülegenoomne transkriptomianalüüs, kus proovide ettevalmistamises Genetitan MC (Affymetrix) masinale ja selle masina opereerimises uurimistöö autor ei osalenud. Transkriptomianalüüsi sooritamiseks eraldati esmalt sorditud rakkudest RNeasy Micro Kiti (Qiagen) ametliku protokoll järgi RNA. Seejärel määrati Agilent RNA 6000 Pico (Agilent Technologies) ametliku protokoll järgi RIN väärtused ning proovid, mille RIN väärtused olid suurem kui 7,5, sooritati Genetitan MC masinaga tootja protokoll järgi analüüs Clariom™ S Pico Assay HT (Thermo Fisher Scientific) geeniekspressiooni kiibil. Saadud andmed analüüsiti Transcriptome Analysis Console programmiga (Affymetrix) ning statistilise olulisus määrati dispersioonanalüüsiga, kasutades ebayes meetodit tingimustel, kus  $p < 0,05$  ja geeniekspressiooni suhteline muutus erines vähemalt 2 korda. Tulemuste visualiseerimiseks kasutati Graphpad 8 Prism ja Inkscape 0.92 tarkvara.

Rottides tehtud ülegenoomse transkriptomianalüüsist saadud andmeid võrreldi analoogse andmestikuga Aire KO ja metsiktüüpi C57BL/6I hiirtest, kus vastava genotüübiga tuumused olid analüüsi käigus kokku segatud. Andmestik saadi Hamish S. Scott tööühmalt (Centre for Cancer Biology, Melbourne ülikool, Austraalia) ning Aire KO hiirte genereerimine on kirjeldatud Hubert jt. töös (Hubert jt., 2008).

Transkriptoomianalüüsi andmeanalüüsis kasutatud post-Aire diferentseerumisetapile iseloomulikud markergeenid saadi Dhalla jt. tööst (Dhalla jt., 2020) ning maksa-, süljenäärme- ja pankreasespetsiifilised geenid saadi hiire tehtud ja mikroibitehnoloogial baseerual GNF Mouse GeneAtlas V3 (GEO accession GSE10246) andmebaasist ([www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE10246](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE10246)). Andmebaasis jooksutati vastava koe vastu 36 kude ja valiti välja need geenid, mis ekspresseerusid koespetsiifiliselt.

Ülegenoomse transkriptoomianalüüsi andmeanalüüsi võeti ainult need geenid, millele leiti vastavad ortoloogid nii roti kui ka hiire andmestikust. Ortoloogide leidmiseks kasutati roti genoomi andmebaasi (Rat Genome Database, [www.rgd.mcw.edu](http://www.rgd.mcw.edu)). Kuni kümnendikule geenidele ortolooge ei leitud, mistõttu neid analüüsi ei kaasatud.

### 2.2.5 Immuunfluorestsentsmikroskoopia

Immuunfluorestsentsmikroskoopias kasutatud preparaatide tegemiseks eemaldati rotist tüümuse sagar või lõuaalaune süljenääre ning need pandi Neg 50 (Richard-Allan Scientific) lahusega täidetud vormidesse, mis seejärel külmutati kuiva jää ja 96% etanooli segu peal. Koelõigud lõigati Leica CM 1950 krüostaadiga 5 µm paksusteks.

Immuunfluorestsentsmikroskoopia analüüsi läbiviimiseks fikseeriti koelõigud 15 min 4% formaldehüüdiga, misjärel fikseeritud lõigud pesti 3x5 min PBS-puhvriga (fosfaadiga puhverdatud soolalahus, *phosphate-buffered saline*, Naxo). Seejärel koelõigud permabiliseeriti 15 min 0,3% TritonX100 (Applichem) ning 1% BSA (veise seerumi albumiin, *bovine serum albumin*, GE Healthcare) PBS-puhvril, misjärel koelõike taaskord pesti 3x5 min PBS-puhvriga. Seejärel toimus koelõikude antikehade ebaspetsiifilise seondumise vähendamiseks 10 min inkubatsioon 1% NGS-i (tavaline kitseseerum, *normal goat serum*, Dako Cytomation) või 1% Aire HET rottidest saadud seerumi sisaldava PBS-puhvril. Koelõike loputati PBS-puhvril misjärel töödeldi koelõike 8 h +4 °C juures vastavate antikehadega, mis on välja toodud tabelis 2. Pärast antikehadega töötlust pesti lõike 3x10 min PBS-puhvril ning konjugeerimata primaarsed antikehad töödeldi sekundaarsete antikehadega 1 h toatemperatuuril, mis on välja toodud tabelis 2. Seejärel pesti koelõike 3x10 min ning kudesid töödeldi toatemperatuuril 10 min 2 µg/ml DAPI-ga (Roche diagnostics Corporation) ja pesti 10 min PBS-puhvriga. Katteklaasid kinnitati alusklaasile sulundusvedelikuga Fluorescent Mounting Medium (Dakocytomation). Mikroskoopimisel kasutati Leica 310 FX fluorestsentsmikroskoopi ning pilte töödeldi ImageJ tarkvaraga.

**Tabel 2.** Immuunfluorestsentsmikroskoopia katsetes kasutatud antikehad

<b>Antigeen</b>	<b>Kloon</b>	<b>Konjugaat</b>	<b>Lahjendus</b>	<b>Tootja</b>
Aire	5H12	AF488	1:400	eBioscience
CK10	oly19054	-	1:500	Biologend
CK14	10143-1-AP	-	1:200	Prototech
Donkey anti-rabbit IgG	-	AF488	1:1000	Abcam
Foxp3	150D	AF488	1:150	Biologend
Goat anti-rabbit IgG	-	AF594	1:1000	Invitrogen
Inv	Poly19244	-	1:300	Biologend
MHC II	Ox6	PE	1:400	Novusbio
UEA1 (lektiin)	-	FITC	1:500	Vector

### 2.2.6 Kudede histoloogiline analüüs

Kudede histoloogilise analüüsi läbiviimiseks võeti rottidest tüümuse saagar, maks ja lõuaalune süljenääre, mis fikseeriti üleöö formaliinis ning Tartu Ülikooli kliinikumi patoloogiateenistus tegi parafiinlõikudest hematoksüliin-eosiiniga töödeldud ja järjestikku lõigatud koelõigud. Koed analüüsiti Eclipse Ci valgusmikroskoobiga (Nikon) ja töödeldi ImageJ tarkvaraga.

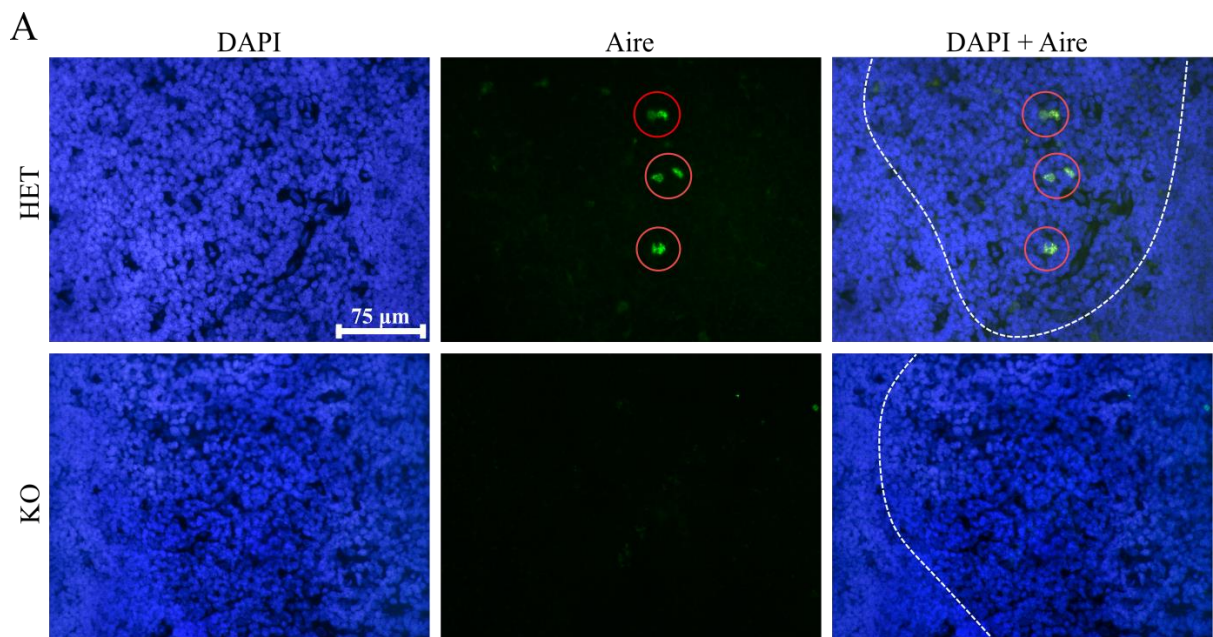
### 2.2.7 Tüümuse massi analüüs

Erinevates vanusegruppides rottidest mõõdeti tüümuse massid ning lineaarse regressiooni-analüüsiga koos standardveaga leiti 95% kindlusega Aire HET ja KO rottide tüümuse massi kahanemiskiirused koos usaldusintervallidega. Andmed analüüsiti ja visualiseeriti RStudio programmiga, kasutades ggplot2 pakki.

## 2.3 Tulemused

### 2.3.1 Aire KO rottidel on APECED-i sarnane fenotüüp

Kuna Aire KO hiiremudeli fenotüüp erineb oluliselt APECED-i patsientide fenotüübist, võttis meie labor kasutusele Aire KO rotimudeli. Esmalt veenduti, et Aire KO rotid on tõepoolest Aire puudulikud ning APECED-ile sarnase fenotüübiga. Selleks tehti immunofluorestsentsmikroskoopia analüüs, kus leiti, et Aire KO roti tüümuses ei ekspresseerita Aire valku ning seejärel tehti RT-qPCR analüüs, mis näitas, et Aire KO roti tüümuses oli *Aire* ekspressioon langenud 24 korda (joonis 3A ja 3B). LIPS-meetodiga leiti, et 4-kuustel Aire KO rottidel hakkas tõusma veres interferoonidevastaste autoantikehade tase (andmeid käesolevas töös ei esitata) ning 6-kuustel rottidel hakkasid tekkima silmnähtavad APECED-i sümptomid: silmapõletik, küünte düstroofia ja alopeetsia (joonis 3C). Antud tulemuste põhjal järeldati, et Aire KO rotid on Aire puudulikud ning nende autoimmuunfenotüüp sarnaneb APECED-i patsientide fenotüübiga.



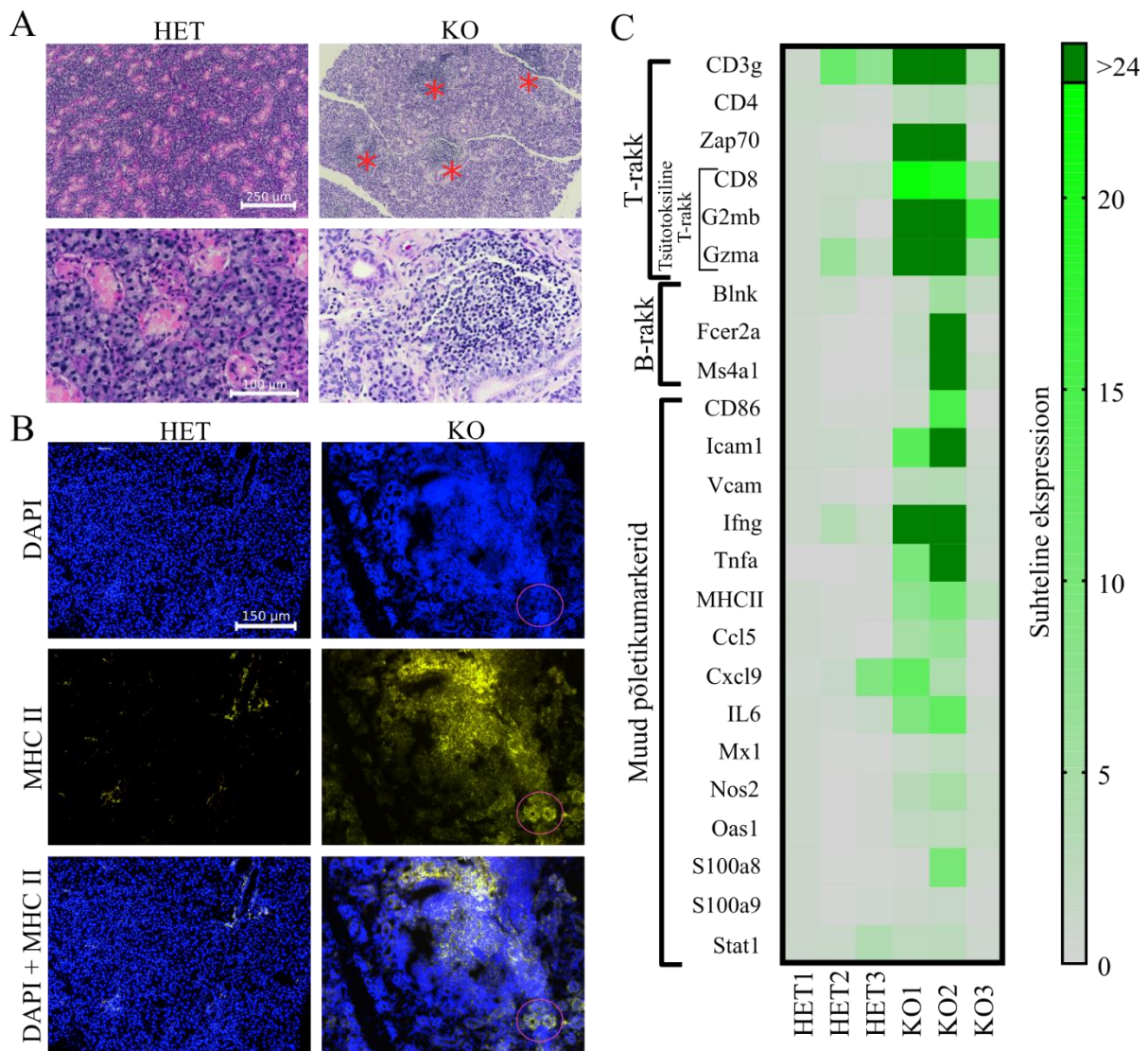
Joonis jätkub →



**Joonis 3.** APECED-i fenotüübi kirjeldamine rotimudelil. **(A)** Immuunfluorestsentsmikroskoopia analüüs DAPI ja Aire-ga märgistatud tüümuselõikudele (n = 3). Punase ringiga on märgitud spetsiifiline Aire signaal ja punktiirjoonega on tähistatud säsi-koore ligikaudne piir. **(B)** RT-qPCR analüüs, kus tüümusest leiti *Aire* suhteline ekspressioon koos standardveaga (n = 3, t-test mittepaarikaupa andmetele, \* = p < 0,05). **(C)** Põletikus silmade ja kahjustunud künnetega (tähistatud noolega) 5-kuuline Aire KO rott.

### 2.3.2 Põletikus süljenäärme autoimmuunfenotüübi analüüs

APECED on hea mudelhaigus erinevate autoimmuunhaiguste tekkemehhanismide uurimiseks, kuid seni on APECED-i autoimmuunfenotüüpi uuritud põhiliselt Aire KO hiiremudelil. Rotimudelil autoimmuunfenotüübi kirjeldamiseks uuriti kuues, noores 4-kuuses, rotis maksa ja süljenääret. Esmalt vaadati mikroskoobiga hematoksüliin-eosiiniga töödeldud kudedes põletiku olemasolu ning leiti, et maksas põletikutunnuseid puudusid, küll aga oli kahes Aire KO loomas – KO1 ja KO2 – süljenäärme tugevalt infiltreerunud põletikurakkudega. Huvitaval kombel olid infiltreerunud süljenäärmed tuhmimalt värvunud kui infiltreerumata koelõigud, mis ühe võimaliku selgitusena võib tuleneda sellest, et infiltreerunud koe pH oli muutunud, mis omakorda mõjutas hematoksüliin-eosiini värvingut (joonis 4A ja lisa 2) (Chan J. K., 2014). Järgmisena teostati süljenäärmelõikudele immuunfluorestsentsmikroskoopia analüüs, kus vaadati MHC II<sup>+</sup> rakkude, kelleks on enamasti immuunrakud, olemasolu ja paiknemist. Ootuspäraselt toimus madalatasemeline (tõenäoliselt immuunrakkude poolne) MHC II ekspressioon KO1 ja KO2 roti süljenäärmetes, kuid lisaks nähti tugevalt infiltreerunud piirkonnas kõrgetasemelist MHC II ekspressiooni koe näärmeliselt osalt (joonis 4B). Süljenäärmetest tehti RT-qPCR analüüs, milles analüüsiti B- ja T-raku markerite ja mitmete teiste põletikumarkerite ekspressiooni. Ootuspäraselt leiti, et KO1 ja KO2 rottides oli suur osa markereid väga kõrgelt ekspresseerunud (joonis 4C).



**Joonis 4.** Autoimmuunfenotüübi kirjeldamine süljenäärmes (n = 3, tähistatud HET1–3 ja KO1–3, vanus 4–4,5 kuud). **(A)** Hematoksüliin-eosiiniga töödeldud süljenääre. Tärniga on tähistatud infiltraadid. **(B)** Immuunfluorestsentsmikroskoopia analüüs DAPI ja MHC II-ga märgistatud süljenäärmelõikudele. Punase ringiga on ära märgitud piirkond, kus süljenäärme näarmeline osa ekspresseerib MHC II molekule. **(A)** ja **(B)** KO pildid esindavad KO1 ja KO2 roti infiltreerunud süljenääret ning HET pildid esindavad HET1-3 ja KO3 roti põletikutunnusteta süljenääret. **(C)** Kuumakaart, kus on kujutatud RT-qPCR suhtelise geeniekspressiooni tulemused, milles vaadati T- ja B-rakumarkerite ning teiste põletikumarkerite ekspressiooni. Põletikumarkerid, mida ei käsitletud kirjanduse ülevaates, valiti välja NCBI geeni andmebaasist (NCBI Gene Database, [www.ncbi.nlm.nih.gov/gene](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene)).

KO1 ja KO2 rottide RT-qPCR andmete põhjal tehti infiltraatide kohta järgnevad üldistused:

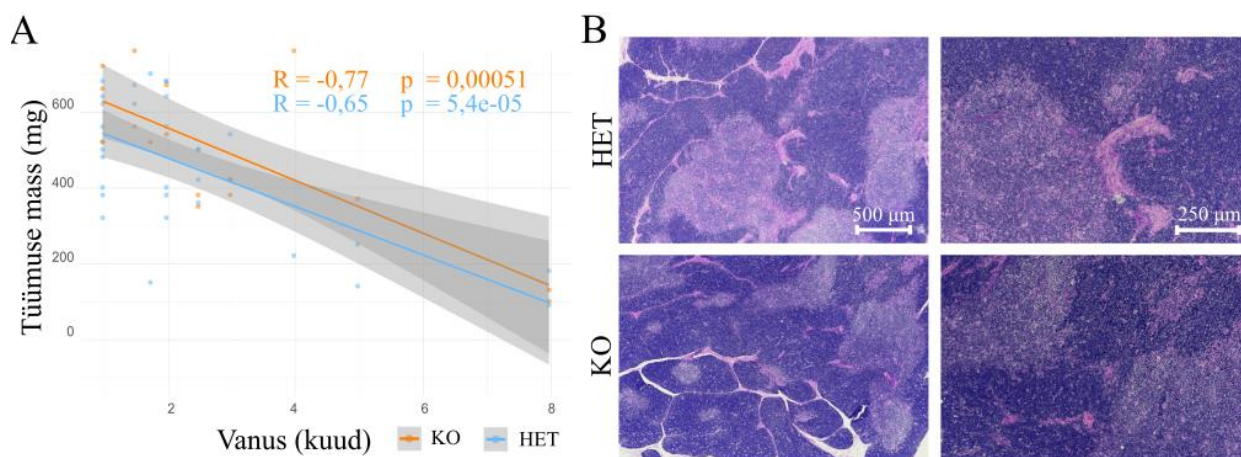
- kõrge tsütotoksiliste CD8<sup>+</sup> T-raku markerite ekspressioon osutab nende rakkude olemasolule ning võimalikule rollile koehävingu läbiviimisel;
- mõõdukas CD4 ekspressiooni tõus osutab CD4<sup>+</sup> T-abistajarakkude olemasolule ning võimalikule rollile autoimmuunreaktsioonide reguleerimises;
- KO2 roti süljenäärmes on väga kõrge B-raku markerite ekspressioon, mis näitab, et süljenäärmesse võivad infiltreeruda B-rakud;
- kõrge *Icam1*, *Vcam*, *MHC II* ning nende ekspressiooni indutseerivate *Ifn $\gamma$*  ja *Tnfa* ekspressioon ning kõrge *CD86* ekspressioon KO2 rotis osutab süljenäärme näärmelise osa rollile CD4<sup>+</sup> T-abistajarakkude aktiveerimises.

Antud tulemuste põhjal järeldati, et noortel Aire KO rottidel puuduvad maksas põletikutunnused, küll aga tekivad infiltraadid süljenäärmetes, mille autoimmuunsetes protsessides osalevad tsütotoksilised CD8<sup>+</sup> T-rakud, CD4<sup>+</sup> T-abistajarakud ning B-rakud. Infiltreerunud süljenääre ekspresseerib *CD86*, *Icam1*, *Vcam*, *MHC II* ning nende ekspressiooni indutseerivat *Ifn $\gamma$*  ja *Tnfa*, mis osutab süljenäärme näärmelise osa võimalikule rollile CD4<sup>+</sup> T-abistajarakkude aktiveerijana.

### 2.3.3 Tuumuse morfoloogia ei ole muutunud

Aire KO hiire tuumuse morfoloogia on muutunud, mida ilmestab hõredam CK14<sup>+</sup> mTEC-ide võrgustik, nõrk küpsete mTEC-dega seonduv lektiini UEA1<sup>+</sup> fluorestsentsisignaali ning samuti ei moodusta UEA1<sup>+</sup> mTEC-id klastreid. Enamgi veel, Ossart jt. täheldasid, et rohkematel Aire KO rottidel oli võrreldes kontroll-loomadega tuumus makroskoopiliselt kadunud, mis viitab tuumuse kiirenenud taandarengule (Ossart jt., 2018). Rotimudelil tuumuse morfoloogia uurimiseks teostati esmalt immuunfluorestsentsmikroskoopia analüüs mitmete mTEC-ide markeritega: CK10 (mTEC-i ja Hassalli keha marker), CK14 (mTEC-i marker), MHC II (mTEC-i ja dendriitraku marker) ja UEA1 (küpse mTEC-i marker). Nende markerite poolt märgistatud rakkude paiknemises, arvukuses ja signaali tugevuses erinevusi ei nähtud (lisa 3). Tuumuse taandarengu võimaliku kiirenemise uurimiseks mõõdeti rottide tuumuse massid ning lineaarse regressioonianalüüsiga leiti Aire HET ja Aire KO rottide tuumuse massi kahanemise kiirused vananedes. 95% kindlusega leiti, et Aire HET roti tuumuse mass kahanes 56,17 ( $\pm$ 20,19) mg/kuus ning Aire KO roti tuumuse mass kahanes 66,84 ( $\pm$ 26,44) mg/kuus (joonis 5A). Kuna analüüsis oli andmepunkte liiga vähe, siis seetõttu tulid usaldusintervallid laiad ja suure ülekattega ning seega antud analüüsi põhjal erinevust

Aire KO ja HET rottide tuumuse massi kahanemise kiiruse vahel ei tuvastatud. Hematoksüliin-eosiiniga töödeldud tuumuselõikude uurimisel hinnati morfoloogilisi muutusi, nagu sidekoestumist ja säsi-koore vahekorra muutusi, kuid erinevusi Aire HET ja KO rottide vahel ei nähtud (joonis 5B). Morfoloogia uurimise käigus otsiti ka B-raku agregate, kuna on pakutud, et APECED-i patsientide tuumus võib sarnaselt müasteenia patsientidele sisaldada B-raku agregate, kuid siiski tuumusest B-raku agregate ei tuvastatud. Antud tulemuste põhjal järeldati, et Aire puudulikkus ei mõjuta rotimudelil tuumuse morfoloogiat ega taandarengut ning Aire KO roti tuumuses ei leidu B-raku agregate.

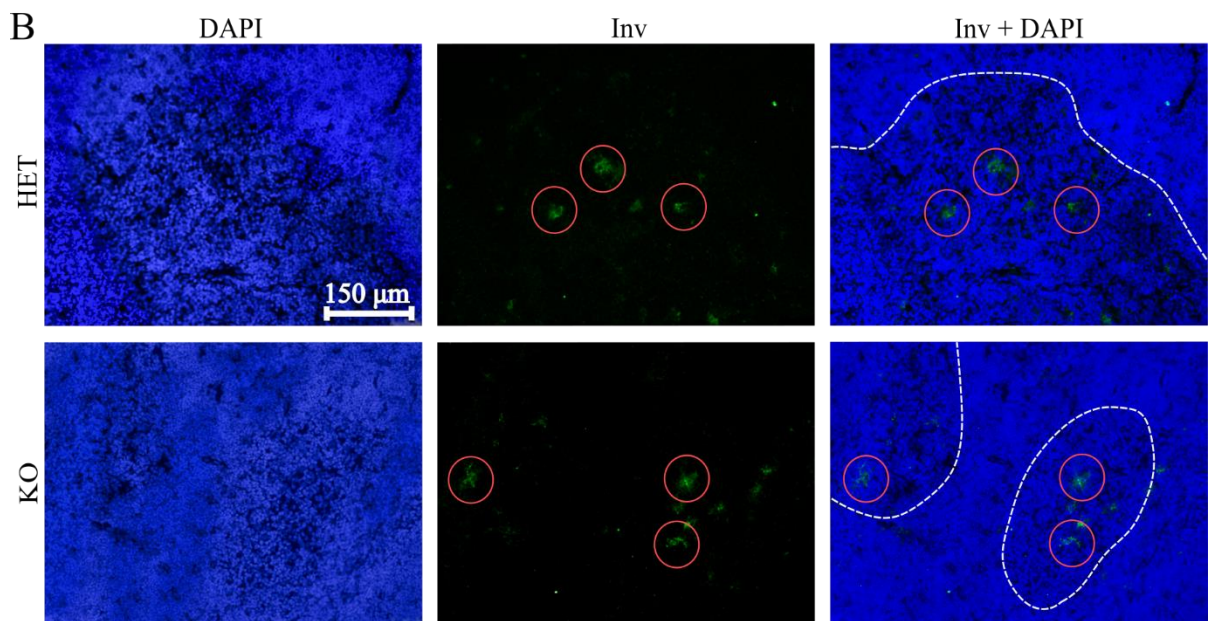
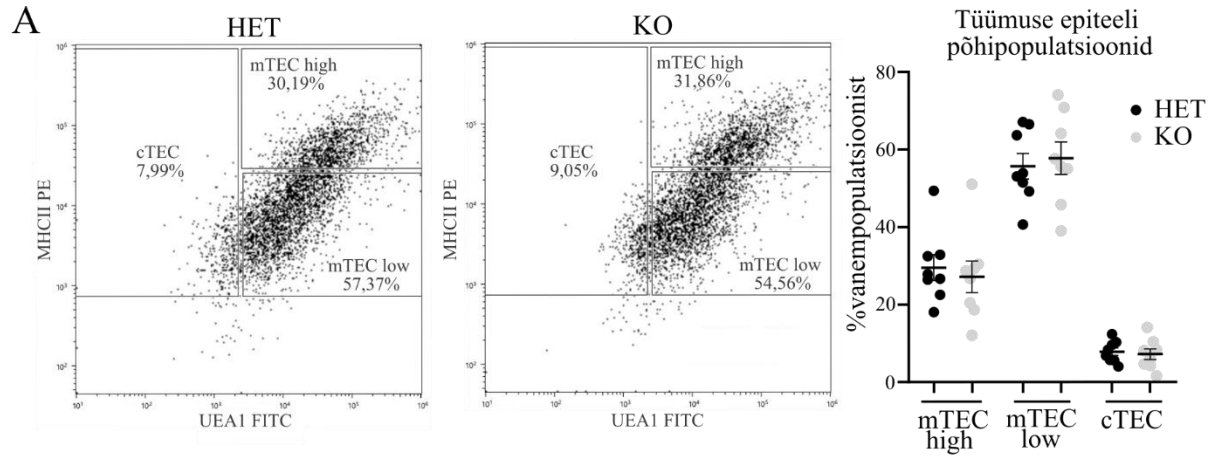


**Joonis 5.** Aire mõju tuumuse taandarengule ja tuumuse morfoloogiale. **(A)** Aire HET ja Aire KO rottide tuumuse massi sõltuvust ajast kirjeldav lineaarse regressioonianalüüsimudel ( $n = 35-18$ , kindlus 95%). **(B)** Hematoksüliin-eosiiniga töödeldud tuumuselõigud ( $n = 3$ , vanus 4–4,5 kuud).

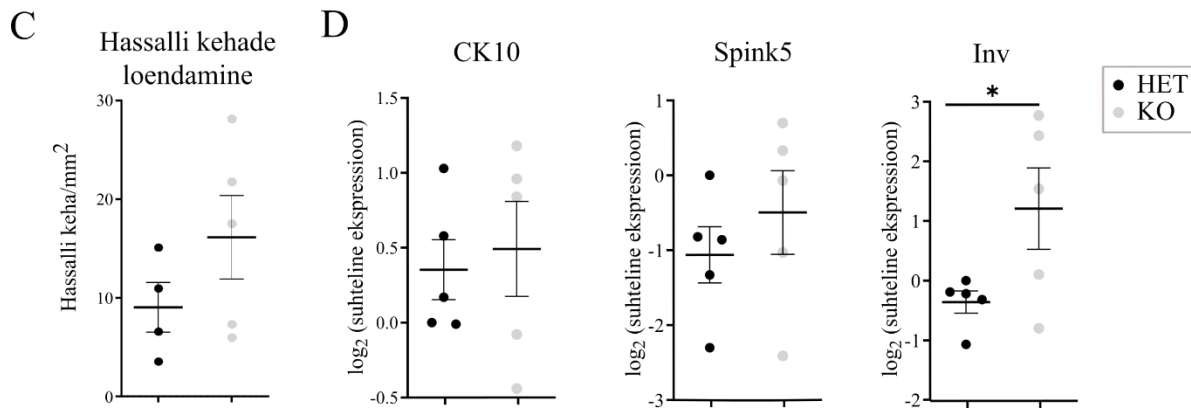
### 2.3.4 Tuumuse epiteeli lõppdiferentseerimine ei ole häiritud

On pakutud, et muutused Aire KO hiire tuumuse morfoloogias on tingitud häirest mTEC-ide lõppdiferentseerumises, mida ilmestab Aire KO hiire tuumustes vähenenud Hassalli kehade arv ning suurenenud mTEC<sup>high</sup> populatsiooni osakaal, mis osutab diferentseerumisbloki nende kahe populatsiooni vahel. Aire puudulikkuse mõju hindamiseks tuumuse epiteeli diferentseerumisele rotimudelil, teostati esmalt sorditud rakkudest voolutsütomeetriaanalüüs, kus vaadati cTEC, mTEC<sup>high</sup> ja mTEC<sup>low</sup> populatsioonide jaotust. Selgus, et nende kolme põhipopulatsiooni jaotuses erinevust ei olnud (joonis 6A). Järgmisena vaadati immunofluorestsentsmikroskoopia analüüsis Inv<sup>+</sup> Hassalli kehade olemasolu. Selgus, et Aire KO rottides olid Hassalli kehad selgelt olemas, mis on aga vastupidine Aire KO hiiremudelile, kus Hassalli kehade arvukus on drastiliselt vähenenud (joonis 6B). Hassalli kehade loendamisel täheldati Aire KO rottides isegi Hassalli kehade arvukuse

suurenemist, mis siiski ei olnud statistiliselt oluline (joonis 6C). RT-qPCR analüüs kinnitas samuti, et mitmete Hassalli keha markerite, nagu *CK10* ja *Spink5*, ekspressioon ei ole muutunud ning *Inv* ekspressioon oli Aire KO-des tõusnud 3 korda (joonis 6D). Antud tulemused näitavad, et vastupidiselt hiirele, ei mõjuta Aire rotis tüümuse epiteelirakkude lõppdiferentseerumist.



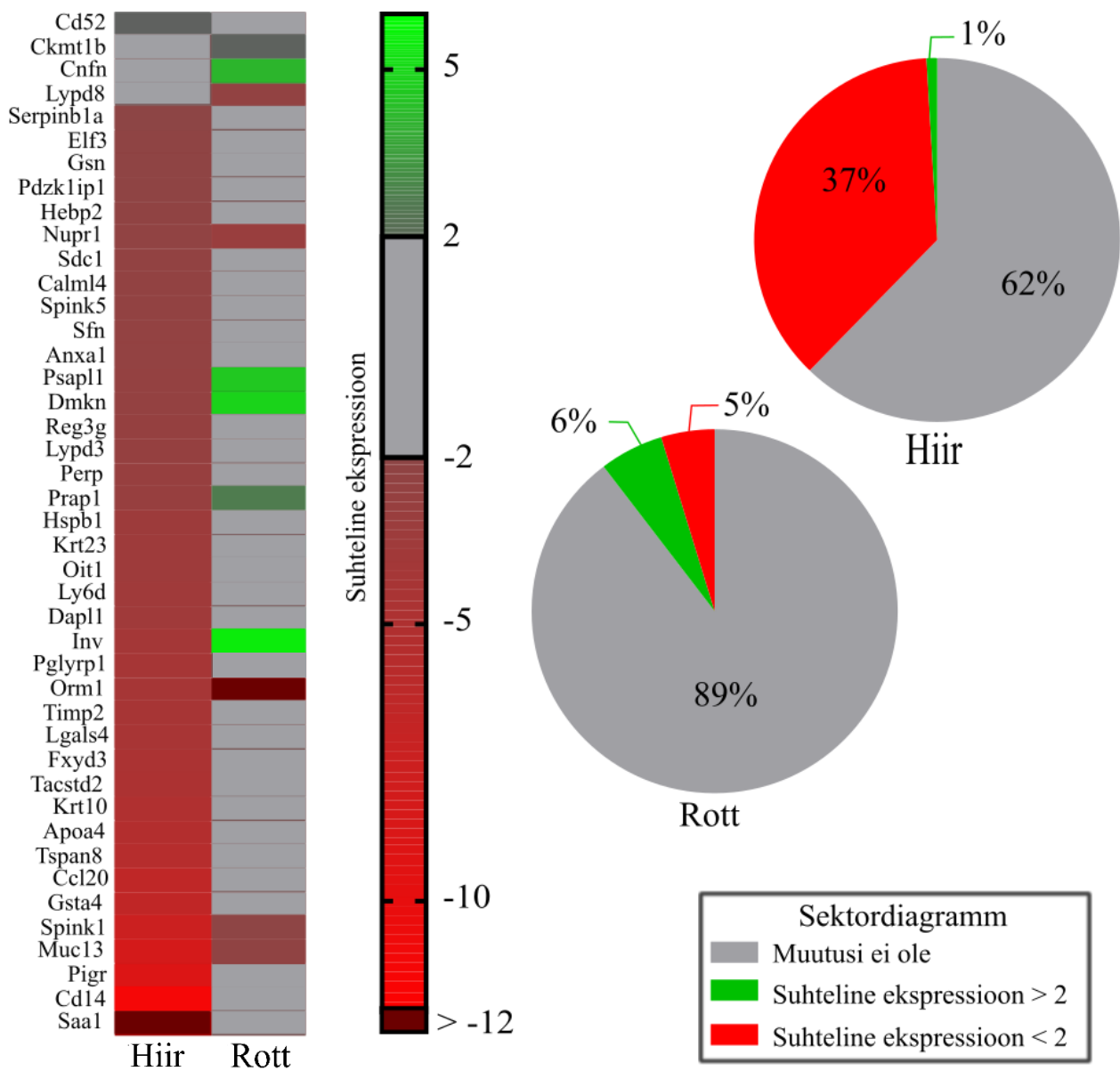
Joonis jätkub →



**Joonis 6.** Aire mõju tuumuse epiteeli diferentseerumisele. **(A)** Sorditud tuumuse epiteelirakkude voluutsütomeetriaanalüüs, kus vasakul pool on uuritavaid rakke kujutavad *dot plot* graafikud ning paremal pool on uuritavate rakupopulatsioonide analüüsimisel saadud keskmised koos standardveaga ( $n = 8$ ). **(B)** Immuunfluorestsentsmikroskoopia analüüs DAPI ja Inv-ga märgistatud roti tuumuselõikudele ( $n = 4-5$ ). Punase ringiga on tähistatud  $Inv^+$  Hassalli kehad ja punktiirjoonega säsi-koore ligikaudne piir. **(C)** Keskmise  $Inv^+$  Hassalli kehade arv  $1 \text{ mm}^2$  säsi kohta roti tuumuses koos standardveaga ( $n = 4-5$ ). **(D)** RT-qPCR tulemused, kus tuumusest leiti *CK10*, *Spink5* ja *Inv* suhteline ekspressioon koos standardveaga ( $n = 5$ ). **(A)**, **(C)** ja **(D)** Statistiline olulisus leiti t-testi mitte-paarikaupa andmetele (\* =  $p < 0,05$ ).

Aire puudulikkuse täpsema mõju hindamiseks mTEC-de lõppdiferentseerumisele, tehti sorditud  $mTEC^{\text{high}}$  ja  $mTEC^{\text{low}}$  rakkudest ülegenoomne transkriptomianalüüs, kus leiti, et 23 188-st geenist oli Aire KO roti  $mTEC^{\text{high}}$  populatsioonis ekspressioon langenud 370 ja tõusnud 554 geenil ning  $mTEC^{\text{low}}$  populatsioonis oli ekspressioon langenud 208 ja tõusnud 248 geenil (lisa 4).

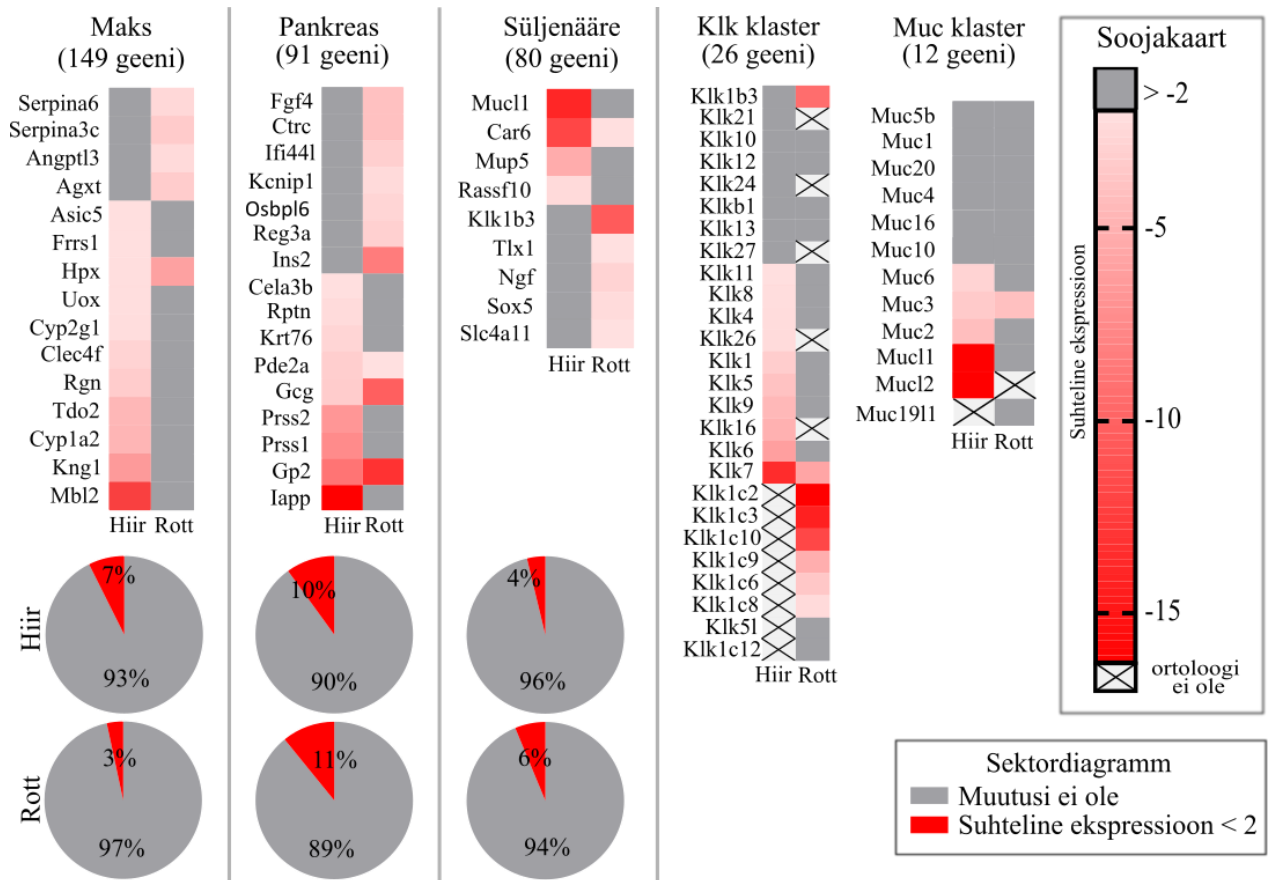
Ülegenoomse transkriptomianalüüsis saadud andmestikus uuriti, mil määral oli Aire KO ja Aire HET rottide  $mTEC^{\text{high}}$  populatsioonis muutunud post-Aire diferentseerumisetapiga seotud 104 geeni ekspressioon ning saadud tulemusi võrreldi eelnevalt publitseeritud analoogilise andmestikuga Aire KO ja metsiktüüpi hiirtes. Leiti, et kui Aire KO hiirtes oli  $mTEC^{\text{high}}$  populatsioonis pea kolmandik post-Aire geenide ekspressioon langenud, siis rottides oli langenud ainult 5% geenide ekspressioon. Enamgi veel, kui rottides oli tõusnud 6% geenide ekspressioon, s.h *Inv* ekspressioon, mis tõusis 5 korda, siis hiirtes tõusis vaid ühe (1%) geeni ekspressioon (joonis 7). Antud tulemused näitavad taas, et vastupidiselt hiirele ei ole rotis Aire puudulikkuse tõttu mTEC-ide lõppdiferentseerumine häiritud.



**Joonis 7.** Aire mõju post-Aire diferentseerumisetapiga seotud 106 geeni ekspressioonile hiire- ja rotimudelis ( $n = 3$ ). Ülegenoomne transkriptoomianalüüs Aire HET ja Aire KO rottide  $mTEC^{high}$  populatsioonis teostati nagu kirjeldatud meetodites ning võrreldi seda eelnevalt publitseeritud analoogilise andmestikuga Aire KO ja metsiktüüpi hiirtes. Kuumakaardil on kujutatud geenid, mille ekspressioon on hiire- või rotimudelises Aire puudulikkuse tõttu muutunud. Sektoridiagrammidel on väljatoodud kõik geenid ja nende muutunud suhtarvud hiire- ja rotimudelises.

### 2.3.5 Aire reguleerib rotimudelis TSA-de ekspressiooni sarnaselt hiiremudelile

Seni on Aire rolli TSA-de ekspressioonis uuritud põhiliselt hiiremudelites. Selleks, et välja selgitada, kuidas Aire reguleerib TSA-sid rotimudelis, analüüsiti Aire KO ja Aire HET rottide mTEC<sup>high</sup> populatsioonis 149 maksa, 91 pankrease ja 80 süljenäärme TSA ekspressiooni ning *Klk* ja *Muc* geeniklastrite ekspressiooni. Saadud tulemusi võrreldi eelnevalt publitseeritud analoogilise andmestikuga Aire KO ja metsiktüüpi hiirtes. Ootuspäraselt nähti, et Aire reguleerib rotis osa TSA-de ekspressiooni ning TSA-de ekspressioonimustri uurimisel leiti, et Aire reguleerib rotis TSA-sid samas suurusjärgus mis hiireski: maksa TSA-sid reguleeritakse Aire poolt rotis 7% ja hiires 3%, pankrease TSA-sid rotis 10% ja hiires 11% ning süljenäärme TSA-sid rotis 6% ja hiires 4%. Huvitaval kombel hiirte ja rottide TSA-de ekspressioonimuster omavahel suures osas ei kattu. *Klk* ja *Muc* geeniklastri analüüsis selgus, et rottides oli *Klk* klaster osaliselt Aire poolt positiivselt reguleeritud ning *Muc* klaster ei olnud vastupidiselt hiirtele Aire poolt reguleeritud (joonis 9). Antud andmete põhjal järeldub, et Aire reguleerib rotis TSA-de ekspressiooni, mille ekspressiooni- osakaal on samas suurusjärgus, mis hiires, ning et Aire reguleerib gene ka rotis klastritena.

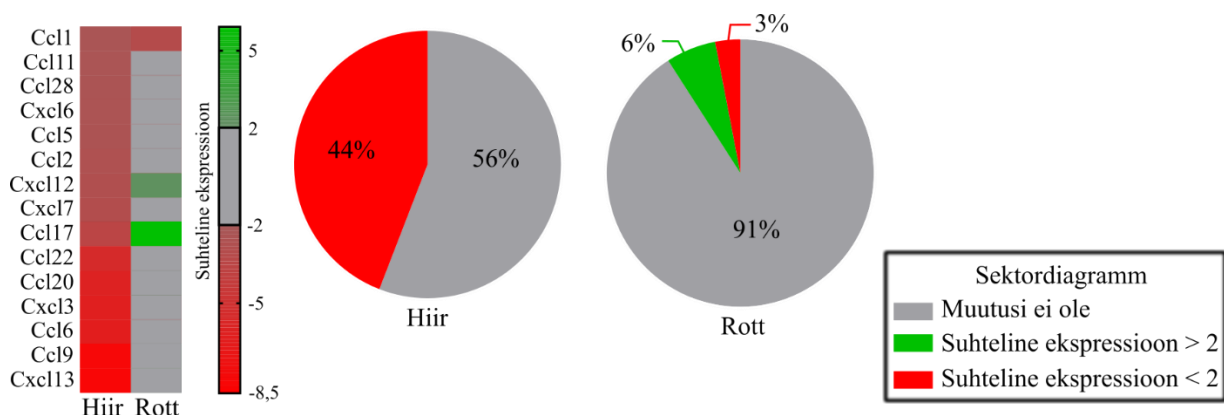


**Joonis 9.** Aire mõju TSA-de ekspressioonimustrile hiire- ja rotimudelis (n = 3). Ülegenoomne transkriptoomianalüüs Aire HET ja Aire KO rottide mTEC<sup>high</sup> populatsioonis teostati nagu

kirjeldatud meetodites ning võrreldi seda eelnevalt publitseeritud analoogilise andmestikuga Aire KO ja metsiktüüpi hiirtes. Maksa, pankrease ja süljenäärme kuumakaardil on kujutatud geenid, mille ekspressioon on hiire- või rotimudelil Aire puudulikkuse tõttu langenud ning *Klk* ja *Muc* geeniklastri kuumakaardil on kujutatud kõik vastava klasteri geenid. Sektordiagrammidel on väljatoodud kõik vastava koe geenid ja nende muutunud suhtarvud hiir- ja rotimudelil.

### 2.3.6 Tuumuse epiteeli kemokiinide ekspressioonimuster ei ole muutunud

Aire KO hiireuuringutest on teada, et Aire mõjutab mitmete kemokiinide ekspressiooni, millest osa on olulised tümotsüütide arengus. Selleks, et välja selgitada, kuidas on kemokiinide ekspressioonimuster muutunud Aire puudulikkuse tõttu rotis, analüüsiti ülegenoomse analüüsiga mTEC<sup>high</sup> rakupopulatsioonis 34 kemokiini ekspressiooni ja saadud andmeid võrreldi eelnevalt publitseeritud analoogilise andmestikuga Aire KO ja metsiktüüpi hiirtes. Selgus, et kui Aire KO hiires oli pea kolmandiku kemokiinide ekspressioon langenud, siis Aire KO rotis oli langenud vaid ühe (3%) kemokiini ekspressioon. Nii Aire KO rotis kui ka Aire KO hiires oli kahe (6%), kuid omavahel mittekattuva, kemokiini ekspressioon tõusnud. Huvitaval kombel ei olnud rotis muutunud tümotsüütide arengus oluliste kemokiinide *Ccl5*, *Ccl17*, *Ccl21*, *Ccl19*, *Ccl22* ja *Xcl1* ekspressioon, mis hiires on Aire poolt positiivselt reguleeritud. Erandlik oli *Ccl17*, mille ekspressioon oli rotis tõusnud 5 korda (joonis 8). Tervele tüümusele tehti RT-qPCR analüüs, kus kontrolliti üle eespool loetletud kemokiinide ekspressioon ning nende geenide ekspressioonis erinevust ei tuvastatud, s.h *Ccl17* ekspressioonis (andmeid käesolevas töös ei esitata). Antud tulemustest järeldati, et Aire puudulikkuse tõttu on rotis kemokiinide ekspressioon väga vähe häiritud ning tümotsüütide arengus oluliste *Ccl5*, *Ccl17*, *Ccl21*, *Ccl19*, *Ccl22* ja *Xcl1* ekspressioon ei ole rotis vastupidiselt hiirele Aire poolt reguleeritud.

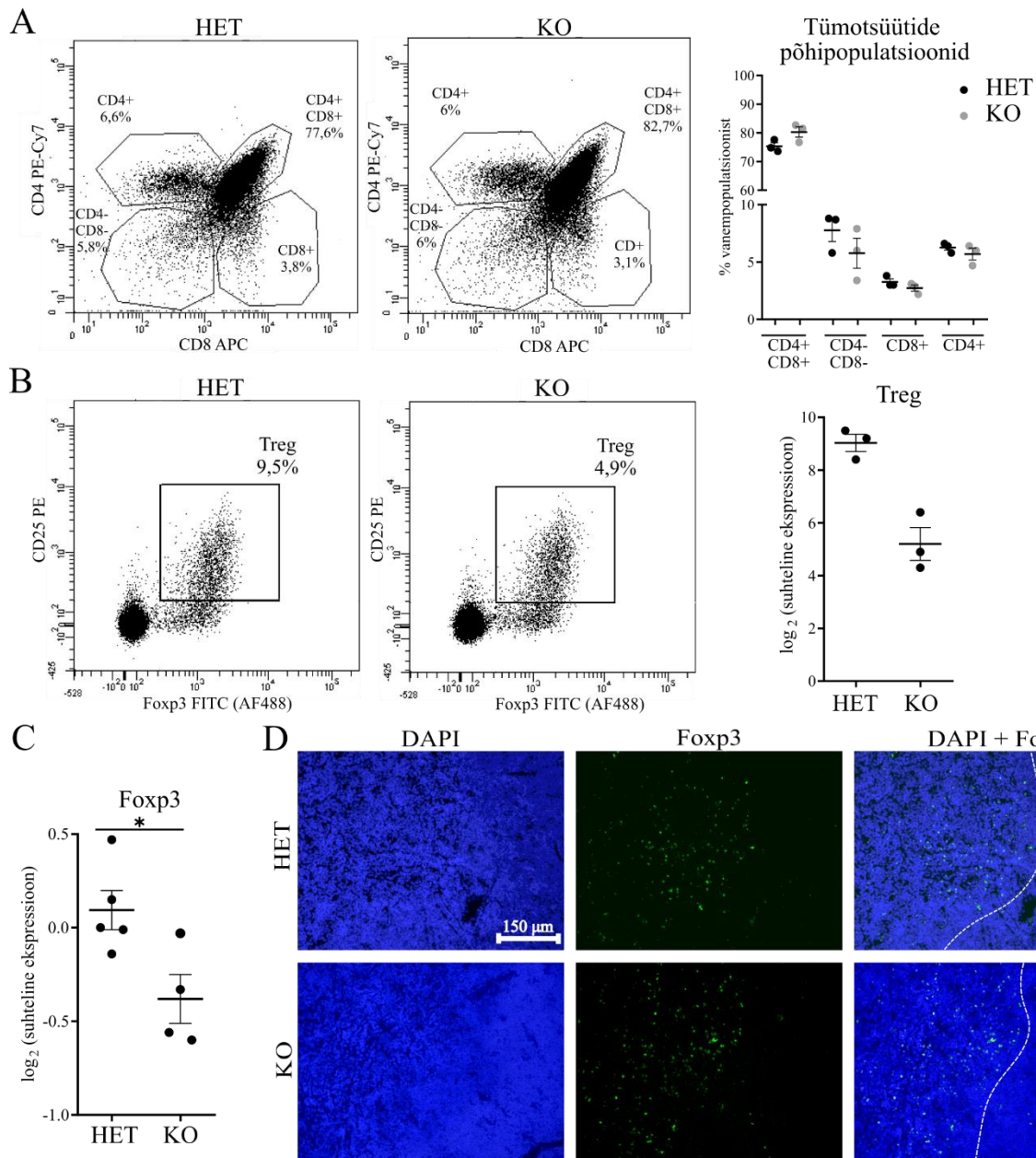


**Joonis 8.** Aire mõju 34 kemokiini ekspressioonile hiire- ja rotimudelil (n = 3). Ülegenoomse transkriptoomianalüüsi Aire HET ja Aire KO rottide mTEC<sup>high</sup> populatsioonis teostati nagu

kirjeldatud meetodites ning võrreldi seda eelnevalt publitseeritud analoogilise andmestikuga Aire KO ja Aire metsiktüüpi hiirtes. Kuumakaardil on kujutatud kemokiinid, mille ekspressioon on hiire- või rotimudelil Aire puudulikkuse tõttu muutunud. Sektordiagrammidel on väljatoodud kõik kemokiinid ja nende muutunud suhtarvud hiir- ja rotimudelil.

### 2.3.7 T<sub>reg</sub>-ide diferentseerumine on häiritud

Aire KO hiires on tümotsüütide diferentseerumise uurimisel leitud, et tüümuses toimub CD4<sup>+</sup> tümotsüütide enneaegne küpsemine ja vabanemine vereringesse ning et Aire KO hiire tüümuses ja APECED-i patsientide veres on T<sub>reg</sub>-ide arvukus langenud, mis osutab nende rakkude diferentseerumishäirele. Selleks, et välja selgitada, kuidas on muutunud tümotsüütide diferentseerumine rotimudelil, teostati voolutsütomeetriaanalüüs, kus vaadati tümotsüütide nelja põhipopulatsiooni ning T<sub>reg</sub>-ide osakaalu tümotsüütide põhipopulatsioonis. Selgus, et tümotsüütide põhipopulatsioonide jaotuses muutusi ei olnud, küll aga leiti, et Aire KO rotis oli T<sub>reg</sub>-e 42% vähem kui Aire HET rotis (joonis 10A ja 10B). T<sub>reg</sub>-ide vähenemist kinnitas ka RT-qPCR analüüs, kus leiti, et Aire KO tüümuses oli langenud T<sub>reg</sub>-i markeri *Foxp3* ekspressioon pea 100% (joonis 10C). Immuunfluorestsentsmikroskoopia analüüsis vaadati Foxp3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-ide paiknemist, milles erinevusi ei täheldatud (joonis 10D). Selleks, et täpsemalt mõista, kuidas Aire puudulikkus mõjutab T<sub>reg</sub>-ide diferentseerumist, vaadati sorditud tüümuse epiteelirakkudele tehtud ülegenoomses transkriptomianalüüsis ning kogu tüümuse tehtud RT-qPCR analüüsis T<sub>reg</sub>-ide tekkes oluliste molekulide *IL2*, *IL15*, *Tlsp* ekspressiooni. Leiti, et nende molekulide ekspressioon muutunud ei olnud (andmeid käesolevas töös ei esitata). Antud tulemuste põhjal jäeldati, et rotimudelil mõjutab Aire sarnaselt hiiremudelile T<sub>reg</sub>-ide diferentseerumist ning tümotsüütide neljas põhipopulatsioonis diferentseerumishäireid ei tuvastatud.



**Joonis 10.** Aire mõju tümotsüütide diferentseerumisele. **(A)** Voolutsütomeetriaanalüüs, kus vasakul pool on uuritavate tümotsüütide nelja põhipopulatsiooni kujutavad *dot plot* graafikud ning paremal on uuritavate rakupopulatsioonide analüüsimisel saadud keskmised koos standardveaga ( $n = 3$ ). **(B)** Voolutsütomeetriaanalüüs, kus vasakul pool on uuritavate T<sub>reg</sub> populatsiooni kujutavad *dot plot* graafikud ning paremal pool on uuritavate rakkude analüüsimisel saadud keskmised koos standardveaga ( $n = 3$ ). **(C)** RT-qPCR analüüsi tulemus, kus tuumuses määrati *Foxp3* suhteline ekspressioon koos standardveaga ( $n = 5-4$ ). **(D)** Immuunfluorestsentsmikroskoopia analüüs DAPI ja Foxp3-ga märgistatud tuumuselõikudele ( $n = 3$ ). Punktirjoonega tähistatud säsi-koore ligikaudne piir. **(A)**, **(B)** ja **(C)** Statistiline olulisus leti t-testi mitte-paarikaupa andmetele ( $* = p < 0,05$ ).

## 2.4 Arutelu

APECED on hea mudelhaigus tsentraalse tolerantsuse tekkemehhanismide ning selle häirest tingitud autoimmuunfenotüübi uurimiseks. Seni on APECED-i uurimiseks kasutatud põhiliselt Aire KO hiiri, kellel siiski ei teki patsientidele sarnane autoimmuunfenotüüp, mistõttu võttis meie labor kasutusele Aire KO rotimudeli. Me esmalt kinnitasime, et rotimudeli fenotüüp sarnaneb APECED-i patsientide fenotüübiga, seejärel kirjeldasime uurimistöö ühe eesmärgina tsentraalse tolerantsuse häirest tekkivat autoimmuunfenotüüpi ning seepeale uurisime teise eesmärgina Aire rolli tsentraalse tolerantsuse kujunemises.

Autoimmuunfenotüübi kirjeldamiseks analüüsisime noorte rottide maksa ja süljenääret ning otsisime tütumusest B-raku agregate. Maksas ja süljenäärmes autoimmuunfenotüübi uurimiseks teostasime esmalt histoloogilise analüüsi, kus nägime, et enamikel Aire KO rottidel olid süljenäärmed põletikurakkudega infiltreerunud, samas maksas põletikutunnused puudusid. Huvitaval kombel Ossart jt. leidsid, et vanadel rottidel olid vastupidiselt maksad infiltreerunud ja nekroosis, kuid süljenäärmetes tugev põletik puudus, mis viitab, et APECED-i sümptomite kujunemine on ajast sõltuv ning individuaalne (Ossart jt., 2018). Süljenäärme infiltraatide iseloomustamiseks tegime RT-qPCR analüüsi, kus leidsime, et nii nagu Aire KO hiire puhul, infiltreeruvad rotis tsentraalse tolerantsuse häirest tingitud põletiku korral kudedesse tsütotoksilised CD8<sup>+</sup> T-rakud, kes on tõenäoliselt põhilised koekahjustuste läbiviijad, ning CD4<sup>+</sup> T-abistajarakud ja B-rakud, kes osalevad autoimmuunsuse läbiviimisel, kuid kelle roll antud uurimistöös ei selgu. Ainult ühel rotil kahest, kellel tekkisid infiltraadid, esines süljenäärmes B-raku markerite ekspresioon, mis näitab, et põletikuprotsessid võivad olla ajas muutuvad ning varieeruda indiviidide vahel. Siiski, ühe koe pealt tehtud üldistusi ei saa üle kanda teistele põletikulistele kudedele, mistõttu oleks tarvis iseloomustada rohkem põletikulisi kudesid. Immuunfluorestsentsmikroskoopia analüüsis nägime, et infiltreerunud süljenäärme näärmeline osa ekspresseerib MHC II molekule ning RT-qPCR näitas *MHC II*, *CD86*, *Icam1*, *Vcam* ning nende ekspresiooni indutseerivate *Ifny* ja *Tnfa* kõrget ekspresiooni ning nii nagu Sjögreni sündroomi puhul, võib ka siin toimuda CD4<sup>+</sup> T-abistajarakkude aktiveerimine süljenäärme poolt. Kuigi me nägime, et süljenäärmes oli mõõdukas koguses CD4<sup>+</sup> T-abistajarakke, siis sellegipoolest ei ole võimalik nende rakkude olemasolu seostada eelpool mainitud molekulide ekspresiooniga ning samuti ei saa tervele süljenäärmele tehtud RT-qPCR põhjal määrata *CD86*, *Icam1*, *Vcam* ekspresiooniallikat, mistõttu oleks tarvis teha täiendavaid uuringuid. Rotimudeli süljenäärme

autoimmuunfenotüüp on väga sarnane Sjögreni sündroomi autoimmuunfenotüübiga, mistõttu võib oletada, et haiguse üheks tekkepõhjuseks võib olla häire tsentraalses tolerantsuses.

Me otsisime tüümusest B-raku agregate, mille olemasolu korral oleks saanud Aire KO rotimudelil uurida tüümust kui autoantikehade allikat. Me siiski B-raku agregate ei tuvastatud, mis näitab, et müasteenia ja APECED ei ole nii sarnase etioloogiaga, kui on seni arvatud. Siiski, selleks et täielikult veenduda, et tüümuses ei ole B-raku agregate, oleks tarvis teha täiendavad katsed mikroskoopiaanalüüsis, kus kasutatakse B-raku spetsiifilist markerit.

Uurimistöö teine eesmärk oli välja selgitada Aire roll tsentraalse tolerantsuse tekkes ning selleks uurisime tüümuse epiteelirakke ja tümotsüütide diferentseerumist ja funktsioneerimist. Me uurisime esimese sammuna mitmes erinevas katses tüümuse epiteeli diferentseerumist, kus kõige suurema tähelapanu all oli lõppdiferentseerumine, kuna on teada, et Aire KO hiires on see blokeerunud. Me leidsime, et rotis ei ole tüümuse epiteelirakkude lõppdiferentseerumine häiritud, mida kõige selgemalt ilmestas Hassalli kehade olemasolu, mis on Aire KO hiires vähenenud. Tõsi küll, ülegenoomse transkriptomianalüüsis nägime, et Aire KO rotis oli mõne lõppdiferentseerumisega seotud markeri ekspressioon siiski muutunud, s.h nägime involukriini ekspressiooni tõusu, mille tõusu kinnitas ka RT-qPCR. Siiski, muutunud olid üksikute geenide ekspressioon, mis võis olla tingitud juhuslikust kõikumisest ning eeldatavasti olulist mõju lõppdiferentseerumisele ei oma. Antud tulemuste põhjal saab seega ümber lükata küpsemisemudeli, mille kohaselt Aire indutseerib mTEC-ides edasist diferentseerumist ja mille tagajärjel saavutab rakk TSA-de ekspressioonivõime – Aire KO rotis diferentseeruvad mTEC-id Aire-st sõltumatult, kuid sellegipoolest on langenud neis rakkudes TSA-de ekspressioon. Mis mehhanismiga mõjutab Aire mTEC-i diferentseerumist hiiremudelil, meie uurimistöös ei selgu ning selle väljaselgitamiseks oleks tarvis täiendavaid uuringuid. Kuna hiire- ja rotimudelil, kes on väga lähedased liigid, on mTEC-ide diferentseerumist kirjeldavad tulemused täiesti erinevad, on keeruline oletada, kuidas Aire mõjutab mTEC-ide diferentseerumist teistes liikides, s.h inimestes.

Me kontrollisime Ossarti jt. poolt püstitatud hüpoteesi, mille kohaselt võib Aire KO rottides tüümuse taandareng olla kiirenenud (Ossart jt., 2019). Selleks mõõtsime eri ajapunktides Aire HET ja Aire KO rottidelt tüümuse massid ning leidsime tüümuse massi kahanemise kiirused, mis siiski omavahel oluliselt ei erinevad. Kuna me ei näinud Aire KO rottides muutusi tüümuse morfoloogias ega ka häireid tüümuse taandarengus tõenäoliselt suurt rolli mängiva tüümuse epiteeli diferentseerumises, siis võib järeldada, et tüümuse taandareng ei ole Aire KO rottides oluliselt kiirenenud ega muud moodi häiritud. Siiski, tüümuse massi kahanemise kiiruse arvutamiseks oli

kasutatud liiga vähe andmepunkte, mistõttu saadi väga suured ja ülekattuvad usaldusintervallid ning seetõttu oleks vaja leida massi kahanemise kiirused rohkemate andmepunktidega.

Järgmise sammuna uurisime kuidas Aire mõjutab tuumuse epiteeli funktsioneerimist, mille käigus vaatasime kemokiinide ja TSA-de ekspressiooni. Selleks tegime tuumusest sortitud epiteelirakkudest ülegenoomse transkriptoomianalüüsi ja RT-qPCR analüüsi ning võrdlesime saadud tulemusi eelnevalt publitseeritud analoogilise andmestikuga Aire KO ja Aire metsiktüüpi hiirtest. Kemokiinide ekspressiooni analüüsimisel leidsime, et Aire KO rotis oli võrreldes Aire KO hiirega kemokiinide ekspressioon väga vähe muutunud, s.h ei olnud muutunud tūmotsūūtide arengus oluliste kemokiinide *Ccl5*, *Ccl17*, *Ccl19*, *Ccl21*, *Ccl22* ja *Xcl1* ekspressioon. Üks võimalik selgitus, miks Aire KO hiires on nii ulatuslikult kemokiinide ekspressioon häiritud, võib tuleneda häirest tūmuse epiteeli diferentseerumises, mis omakorda häirib nende molekulide ekspressiooni. Samas, ei saa välistada, et hiires osaleb kemokiinide ekspressiooni regulatsioonis molekul(id), mis on mingil põhjusel Aire poolt reguleeritud. TSA-de ekspressiooni uurimisel nägime, et Aire reguleerib rotis ootuspäraselt TSA-sid ning see toimub samadel printsiipidel nagu hiireski, reguleerides samas suurusjärgus TSA-sid nagu hiires ning et Aire reguleerib rotis geene klastritena. Huvitaval kombel hiire- ja rotimudeli Aire-st sõltuvate TSA-de ekspressioonimuster suuresti ei kattunud, mis võib tuleneda evolutsioonilisest põhimõttest, mille puhul tagatakse liikide vahel erinev TSA-de ekspressioonimuster, mistõttu tekib suur T-raku retseptorite variatsioon, mis omakorda annab parema kaitse patogeenide eest.

Uurimistöö viimase sammuna uurisime tūmotsūūtide diferentseerumist, kus me tegime voolutsütomeetriaanalüüsi, milles analüüsisime tūmotsūūtide nelja põhipopulatsiooni ning  $T_{reg}$ -ide arvukust. Me tūmotsūūtide nelja põhipopulatsiooni jaotuses erinevust ei näinud, mis siiski ei välista võimalikke muutusi tūmotsūūtide alampopulatsioonides ning seetõttu oleks tarvis teha täiendavaid uuringuid. Oluline oleks uurida  $CD4^+$  SP tūmotsūūtide populatsioonisisest diferentseerumist, mis on Aire KO hiires häiritud puuduliku kemokiinide ekspressiooni tõttu, kuid mille ekspressioon rotis siiski muutunud ei ole. Me leidsime, et nii nagu hiireski, tekib ka roti tūmuses vähem  $T_{reg}$ -e, mis näitab, et nende rakkude teke on häiritud. Seni pole selge, kuidas mõjutab Aire  $T_{reg}$ -ide teket ning meie uurimistöö andmete põhjal saab järeldada, et seda ei põhjusta häired kemokiinide, *IL2*, *IL15* ja *Tslp* molekulide ekspressioonis, ega mTEC-ide diferentseerumises.

Meie tulemused näitavad, et tsentraalse tolerantsuse häirest tekkiva APECED-i fenotüübi kujunemine, olgu selleks autoantikehad ja koekahjustused, ei ole tõenäoliselt tingitud häirest tüümuse kemokiinide ekspressioonis või tüümuse epiteeli diferentseerumises, vaid on tingitud puudulikust TSA-de ekspressioonist ja/või häirest  $T_{reg}$ -ides diferentseerumises, samas, ei saa välistada mõnda muud seni kirjeldamata mehhanismi. Uue rotimudeli uurimine võimaldab paremini mõista tsentraalse tolerantsuse teket ning selle häirest tingitud sümptomeid, mis avalduvad väga paljudel erinevatel haigustel.

## Kokkuvõte

Aire puudulikud organismid on head mudelid tsentraalse tolerantsuse tekkemehhanismide ning selle häirest tingitud autoimmuunfenotüübi uurimiseks. Kõige enam on selleks kasutatud hiiri, kellel siiski ei teki õige APECED-i fenotüüp, mistõttu võttis meie labor kasutusele rotimudeli.

Uurimistöö üks eesmärk oli kirjeldada rotimudelis Aire puudulikkusest tingitud autoimmuunfenotüüpi. Esmalt kinnitati, et Aire KO rotid olid tõepoolest Aire puudulikud ning nende fenotüüp sarnanes APECED-i patsientide fenotüübile. Seejärel analüüsiti põletikulisi süljenäärmeid ning otsiti tuumusest B-raku agregate ja jõuti järgnevatele järeldustele:

- Põletikulise süljenäärme autoimmuunfenotüüp sarnaneb Aire KO hiire omale sisaldades CD4<sup>+</sup> T-abistajarakke, tsütotoksilisi CD8<sup>+</sup> T-rakke, kes on tõenäoliselt põhilised koekahjustuse läbiviijad, ja teatud juhtudel ka B-rakke ning süljenäärme näärmeline osa võib seotud olla CD4<sup>+</sup> T-abistajarakude aktiveerimisega.
- Tuumuse morfoloogia uurimisel B-rakkude agregate ei nähtud, mistõttu müasteenia etioloogia ei pruugi olla samade tekkemehhanismidega nagu APECED.

Uurimistöö teine eesmärk oli uurida rotimudelis Aire rolli tsentraalse tolerantsuse tekkes ning selleks analüüsiti tuumuse epiteelirakkude ja tümotsüütide diferentseerumist ning funktsioneerimist, kus jõuti järgnevatele järeldustele:

- Tuumuse morfoloogia ja mTEC-ide diferentseerumine ei ole vastupidiselt hiirele häiritud, mis viitab, et Aire puudulikus organismis ei ole tsentraalse tolerantsuse häire tekkes kesksel kohal epiteeli diferentseerumishäire.
- Aire reguleerib rotimudelis TSA-de ekspressiooni samas suurusjärgus hiiremudeliga, ehkki TSA-de ekspressioonimuster kahe liigi vahel suuresti ei kattu, ning sarnaselt hiirele reguleerib Aire ka rotimudelis TSA-sid klastritena.
- Kemokiinide ekspressioon ei ole rotis vastupidiselt hiirele häiritud ning hiires võib kemokiinide ekspressioonihäire tuleneda häirest mTEC-ide diferentseerumises.
- T<sub>reg</sub>-ide tekkimine on Aire KO rotis samamoodi nagu Aire KO hiireski häiritud, mida ei põhjusta häire kemokiinide ekspressioonis või tuumuse epiteeli diferentseerumises.

Antud uurimistöö põhileid on see, et Aire puudumisest tingitud tsentraalse tolerantsuse häire ja sellega kaasuva autoimmuunfenotüübi tekitab tõenäoliselt puudulik TSA-de ekspressioon ja/või häire T<sub>reg</sub>-ide diferentseerumises, ehkki välistada ei saa ka mõne senikirjeldamata mehhanismi olulisust.

# Central tolerance mechanisms in an APECED rat model

Artur Stoljar

Summary

Thymus is an essential organ involved in immature T-cell or thymocyte development and plays an important role in establishing central tolerance. During the course of central tolerance induction, thymocytes are presented with self-antigens by thymic stromal cells and thymocytes with reactivity to self-antigens are eliminated via apoptosis or directed to become immunosuppressive regulatory T-cells ( $T_{reg}$ ) (Kondělkov *et al.*, 2010; Rothenberg *et al.*, 2016). Transcription regulator Aire (autoimmune regulator), which is expressed in medullary thymic epithelial cells (mTECs), is a key molecule in establishing central tolerance by positively regulating tissue specific antigen (TSA) expression, mediating thymic epithelia differentiation, regulating chemokine expression and  $T_{reg}$  development (Laan and Peterson, 2013). Aire deficiency causes rare multiorgan autoimmune disease APECED (polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy), however it is not known which of the abovementioned mechanisms are responsible for breakdown the of central tolerance (Aaltonen *et al.*, 1997).

APECED is a good model disease for studying induction of central tolerance and autoimmune mechanisms caused by its breakdown. So far a mouse model of APECED has been used to study the mechanisms by which the lack of Aire results in central tolerance defect, however the phenotype of Aire KO mice do not resemble one of APECED patients. For that reason, Ossart *et al.* have created an Aire KO rat model, whose autoimmune phenotype is similar to APECED patients and allows to confirm the mechanisms proposed in mouse models (Ossart *et al.*, 2018).

The goal of the current thesis was to describe the Aire KO rat model in respect to its autoimmune phenotype and in respect to the mechanisms by which Aire deficiency results in autoimmunity. To describe the autoimmune phenotype, we first confirmed that Aire rats were Aire deficient and had a similar immune phenotype with APECED patients. Then we characterised inflammation in the liver and salivary gland and looked for B-cell aggregates in the thymi. We found no sign of inflammation in the liver, however the salivary gland was infiltrated and we made following conclusions:

- Autoimmune phenotype in the nonlymphoid tissue imitate Aire KO mouse model by involving CD4<sup>+</sup> T-cell and cytotoxic CD8<sup>+</sup> T-cells, which probably mediate tissue damage, and may include B-cells. We found that the salivary gland expresses molecules linked to T-cell activation ability.
- We found no B-cell aggregates in the thymus indicating that pathogenetic relation between myasthenia gravis and APECED is not so evident as previously thought.

To understand the role of Aire in establishing central tolerance, we studied mTEC and thymocyte differentiation and function. We made the following conclusions:

- We found no disturbance in thymic morphology nor thymic epithelial differentiation, which is opposite to Aire KO mouse. Our findings argue against the maturation model, where Aire is required for mTEC differentiation in order to acquire TSA expression capability.
- Aire regulates TSAs in the rat model similarly to the mouse model, however, the specific TSAs do not overlap between the two species.
- We saw no disturbance in chemokine expression which is opposite to the mouse model. Disruption in chemokine expression might be caused due to the disturbed mTEC differentiation, not direct chemokine expression.
- T<sub>reg</sub> differentiation is in Aire KO rat impaired, similarly to the mouse model and thus, seems not to be linked with impaired TEC differentiation or chemokine expression. The major thymocytes populations, however, were not changed.

Our main conclusion was that APECED symptoms are likely to be caused by impaired TSA expression, T<sub>reg</sub> differentiation and/or by an unknow mechanism, but not by mTEC differentiation or thymic chemokine expression.

## **Tänuõnad**

Soovin tänada kõiki oma juhendajaid eesotsas Martti Laanega suurepärase juhendamise eest ning loomulikult professor Pärt Petersoni, kes andis võimaluse teha tööd Molekulaarpatoloogia töögrupis. Veel tahan tänada Kristina Kasvandikku, Rudolf Bichelet, Merili Peltserit, Maire Pihlapit, Karita Särekannu, Ahto Salumetsa ja Hanna Seina, kes rõõmuga panustasid oma aega ja energiat katsete tegemisel. Samuti tänan kõiki teisi laborikaaslaste rõõmsa meelega ja heade nõuannete eest.

## Kirjanduse loetelu

- Aaltonen, J., Björnses, P., Perheentupa, J., ... Yaspo, M. L. (1997). An autoimmune disease, APECED, caused by mutations in a novel gene featuring two PHD-type zinc-finger domains. *Nat Genet.* 17(4): 399–403.
- Abramson, J., Anderson, G. (2017). Thymic epithelial cells. *Annu Rev Immunol.* 35: 85–118.
- Anderson, M. S., Su, M. A. (2016). AIRE expands: new roles in immune tolerance and beyond. *Nat Rev Immunol.* 16(4): 247–58.
- Anderson, M. S., Venanzi, E. S., Chen, Z., Berzins, S. P., Benoist, C., Mathis, D. (2005). The cellular mechanism of Aire control of T cell tolerance. *Immunity.* 23(2): 227–239.
- Bofill, M., Janossy, G., Willcox, N., Chilosi, M., Trejdosiewicz, L. K., Newsom-Davis, J. (1985). Microenvironments in the normal thymus and the thymus in myasthenia gravis. *Am J Pathol.* 119(3): 462–473.
- Borden, E. C., Sen, G. C., Uze, G., Silverman, R. H., Ransohoff, R. M., Foster, G. R., Stark, G. R. (2007). Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine. *Nat Rev Drug Discov.* 6(12): 975–990.
- Brennecke, P., Reyes, A., Pinto, S., Rattay, K., Nguyen, M., Küchler, R., Huber, W., Kyewski, B., Steinmetz, L. M. (2015). Single-cell transcriptome analysis reveals coordinated ectopic gene-expression patterns in medullary thymic epithelial cells. *Nat Immunol.* 16(9): 933–941.
- Brito-Zerón, P., Baldini, C., Bootsma, H., Bowman, S., Jonsson, R., Mariette, X., Sivils, K., Theander, E., Tzioufas, A., Ramos-Casals, M. (2016). Sjögren syndrome. *Nat Rev Dis Primers.* 2: 16047.
- Burchill, M. A., Yang, J., Vogtenhuber, C., Blazar, B. R., Farrar, M. A. (2007). IL-2 receptor  $\beta$ -dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells. *J Immunol.* 178(1): 280–90.
- Chan, J. K. (2014). The wonderful colors of the hematoxylin–eosin stain in diagnostic surgical pathology. *Int J Surg Pathol.* 22(1): 12–32.
- Chan, M. F., DeVoss, J., LeClair, N., Johannes, K., Lu, W., Anderson, M. S., Strauss, E. C. (2007) Mechanisms of autoimmunity in the aire-deficient mouse model of sjogren’s syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 48(9): 2833.
- Derbinski, J., Pinto, S., Rösch, S., Hexel, K., Kyewski, B. (2008). Promiscuous gene expression patterns in single medullary thymic epithelial cells argue for a stochastic mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA.* 105(2): 657-662.
- DeVoss, J. J., LeClair, N. P., Hou, Y., Grewal, N. K., Johannes, K. P., Lu, W., Yang, T., Meagher, C., Fong, L., Strauss, E. C., Anderson, M. S. (2010). An autoimmune response to odorant binding protein 1a is associated with dry eye in the Aire-deficient mouse. *J Immunol.* 184(8): 4236–4246.
- Dhalla, F., Baran-Gale, J., Maio, S., Chappell, L., Holländer, G. A., Ponting, C. P. (2020). Biologically indeterminate yet ordered promiscuous gene expression in single medullary thymic epithelial cells. *Embo J.* 39(1): e101828.

- Eldershaw, S. A., Sansom, D. M., Narendran, P. (2011). Expression and function of the autoimmune regulator (Aire) gene in non-thymic tissue. *Clin Exp Immunol.* 163(3): 296–308.
- Galliano, M. F., Roccasecca, R. M., Descargues, P., Micheloni, A., Levy, E., Zambruno, G., D'Alessio, M., Hovnanian, A. (2005). Characterization and expression analysis of the Spink5 gene, the mouse ortholog of the defective gene in Netherton syndrome. *Genomics.* 85(4): 483–492.
- Gavanescu, I., Benoist, C., Mathis, D. (2008). B cells are required for Aire-deficient mice to develop multi-organ autoinflammation: A therapeutic approach for APECED patients. *Proc Natl Acad Sci USA.* 105(35): 13009–13014.
- Gillard, G. O., Dooley, J., Erickson, M., Peltonen, L., Farr, A. G. (2007). Aire-dependent alterations in medullary thymic epithelium indicate a role for Aire in thymic epithelial differentiation. *J. Immunol.* 178(5): 3007–15.
- Hubert, F., Kinkel, S. A., Webster, K. E., Cannon, P. Z., Crewther, P. E., Proeitto, A. I., Wu, L., Heath, W. R., Scott, H. S. (2008). A specific anti-Aire antibody reveals aire expression is restricted to medullary thymic epithelial cells and not expressed in periphery. *J Immunol Res.* 180(6): 3824–32.
- Husebye, E. S., Anderson, M. S., Kampe, O. (2018). Autoimmune polyendocrine syndromes. *N Engl J Med.* 378(12): 1132–1141.
- Hässler, S., Ramsey, C., Karlsson, M. C., Larsson, D., Herrmann, B., Rozell, B., Backheden, M., Peltonen, L., Kämpe, O., Winqvist, O. (2006). Aire-deficient mice develop hematopoietic irregularities and marginal zone B-cell lymphoma. *Blood.* 108(6): 1941–1948.
- Jiang, Q., Su, H., Knudsen, G., Helms, W., Su, L. (2006). Delayed functional maturation of natural regulatory T cells in the medulla of postnatal thymus: role of TSLP. *BMC Immunol.* 7: 6.
- Klein, L., Hinterberger, M., von Rohrscheidt, J., Aichinger, M. (2011). Autonomous versus dendritic cell-dependent contributions of medullary thymic epithelial cells to central tolerance. *Trends Immunol.* 32(5): 188–93.
- Kondělkov, K., Vokurková, D., Krejsek, J., Borská, L., Fiala, Z., Ctírad, A. (2010). Regulatory T cells (TREG) and their roles in immune system with respect to immunopathological disorders. *Acta Medica (Hradec Kralove).* 53(2): 73–7.
- Laan, M., Kisand, K., Kont, V., Möll, K., Tserel, L., Scott, H. S., Peterson, P. (2009). Autoimmune regulator deficiency results in decreased expression of CCR4 and CCR7 ligands and in delayed migration of CD4+ thymocytes. *J Immunol Res.* 183(12): 7682–7691.
- Laan, M., Peterson, P. (2013). The many faces of Aire in central tolerance. *Front Immunol.* 4: 326.
- Lei, Y., Ripen, A. M., Ishimaru, ... Takahama, Y., (2011). Aire-dependent production of XCL1 mediates medullary accumulation of thymic dendritic cells and contributes to regulatory T cell development. *J Exp Med.* 208(2): 383–94.
- Liston, A., Lesage, S., Wilson, J., Peltonen, L., Goodnow, C. C. (2003). Aire regulates negative selection of organ-specific T cells. *Nat Immunol.* 4(4): 350–354.
- Luger, N., Ranki, A., Krohn, K. (2012). APECED: is this a model for failure of T cell and B cell tolerance? *Front Immunol.* 3: 232.
- Mathis, D., Benoist, C. (2009). Aire. *Annu Rev Immunol.* 27: 287–312.

- Matsumoto, M. (2011). Contrasting models for the roles of Aire in the differentiation program of epithelial cells in the thymic medulla. *Eur J Immunol.* 41(1): 12–7.
- Meager, A., Visvalingam, K., Peterson, P., Moll, K., Murumagi, A., Krohn, K., Eskelin, P., Perheentupa, J., Husebye, E., Kadota, Y., Willcox, N. (2006). Anti-interferon autoantibodies in autoimmune polyendocrinopathy syndrome type 1. *PLoS Med.* 3(7): e289.
- Metzger, T. C., Anderson, M. S. (2011). Control of central and peripheral tolerance by Aire. *Immunol Rev.* 241(1): 89–103.
- Metzger, T. C., Khan, I. S., Gardner, J. M., Mouchess, M. L., Johannes, K. P., Krawisz, A. K., Skrzypczynska, K. M., Anderson, M. S. (2013). Lineage tracing and cell ablation identify a post-Aire-expressing thymic epithelial cell population. *Cell Rep.* 5(1): 166–179.
- Ossart, J., Moreau, A., Autrusseau, E., Ménoret, S., Martin, J. C., Besnard, M. Ouisse, L. H., Tesson, L., Flippe, L., Kisand, K., Peterson, P., Hubert, F. X., Anegon, I., Josien, R., Guillonnet, C. (2018). Breakdown of immune tolerance in AIRE-deficient rats induces a severe autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy-like autoimmune disease. *J Immunol.* 201(3): 874–887.
- Passos, G. A. 2019. Thymus transcriptome and cell biology. *Lehekülg 197–199*, 1. trükk, Springer, Šveits.
- Roosalu, M. 2010. Inimese anatoomia. *Lehekülg 146*, 2. parandatud trükk, Koolibri, Tallinn.
- Rothenberg, E. V., Ungerback, J., Champhekar, A. (2016). Forging T-lymphocyte identity: intersecting networks of transcriptional control. *Adv Immunol.* 129: 109–174.
- Sprent, J., Kishimoto, H. (2001). The thymus and central tolerance. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 356(1409): 609–16.
- Stephens, D. N., McNamara, N. A. (2015). Altered mucin and glycoprotein expression in dry eye disease. *Optom Vis Sci.* 92(9): 931–938.
- Zhang, L., Barker, J. M., Babu, S., Su, M., Stenerson, M., Cheng, M., Shum, A., Zamir, E., Badolato, R., Law, A., Eisenbarth, G. S., Anderson, M. S. (2007). A robust immunoassay for anti-interferon autoantibodies that is highly specific for patients with autoimmune polyglandular syndrome type 1. *Clin Immunol.* 125(2): 131–137.
- Zhu, J., Yamane, H., Paul, W. E. (2010). Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annu Rev Immunol.* 28: 445–489.
- Takahama, Y., Ohigashi, I., Baik, S., Anderson, G. (2017). Generation of diversity in thymic epithelial cells. *Nat Rev Immunol.* 17(5): 295–305.
- Takayanagi, H., Kim, S., Matsuo, K., ... Taniguchi, T. (2002). RANKL maintains bone homeostasis through c-Fos-dependent induction of *Ifn* $\beta$ . *Nature.* 416(6882): 744–9.
- Thapa, P., Farber, D. L. (2019). The role of the thymus in the immune response. *Thorac Surg Clin.* 29(2): 123–131.
- Tsunawaki, S., Nakamura, S., Ohyama, Y., Sasaki, M., Ikebe-Hiroki, A., Hiraki, A., Kadana, T., Kawamura, E., Kumamaru, W., Shinohara, M., Shirasuna, K. (2002). Possible function of salivary gland epithelial cells as nonprofessional antigen-presenting cells in the development of Sjögren's syndrome. *J Rheumatol.* 29(9): 1884–96.

- Wang, J., Sekai, M., Matsui, T., Fujii, Y., Matsumoto, M., Takeuchi, O., Minato, N., Hamazaki, Y. (2019). Hassall's corpuscles with cellular-senescence features maintain IFN $\alpha$  production through neutrophils and pDC activation in the thymus. *Int Immunol.* 31(3): 127–139.
- Wang, X., Laan, M., Bichele, R., Kisand, K., Scott, H. S., Peterson, P. (2012). Post-Aire maturation of thymic medullary epithelial cells involves selective expression of keratinocyte-specific autoantigens. *Front Immunol.* 3: 19.
- Venanzi, E. S., Melamed, R., Mathis, D., Benoist, C. (2008). The variable immunological self: Genetic variation and nongenetic noise in Aire-regulated transcription. *Proc Natl Acad Sci.* 105(41): 15860.
- Wing, K., Sakaguchi, S. (2010). Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nat Immunol.* 11(1): 7–13.
- Wong, P., Pamer, E. G. (2003). CD8 T cell responses to infectious pathogens. *Annu Rev Immunol.* 21: 29–70.
- Yano, M., Kuroda, N., Han, H., Meguro-Horike, M., Nishikawa, Y., Kiyonari, H., Maemura, K., Yanagawa, Y., Obata, K., Takahashi, S., Ikawa, T., Satoh, R., Kawamoto, H., Mouri, Y., Matsumoto, M. (2008). Aire controls the differentiation program of thymic epithelial cells in the medulla for the establishment of self-tolerance. *J Exp Med.* 205(12): 2827–2838.

**Kasutatud veebiaadressid:**

NCBI geeni andmebaas (NCBI Gene Database):  
[www.ncbi.nlm.nih.gov/gene](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene)

Hiirel baseeruv GNF Mouse GeneAtlas V3 (GEO accession GSE10246) andmebaas:  
[www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE10246](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE10246)

Roti genoomi andmebaas (Rat Genome Database):  
[www.rgd.mcw.edu](http://www.rgd.mcw.edu)

# Lisa

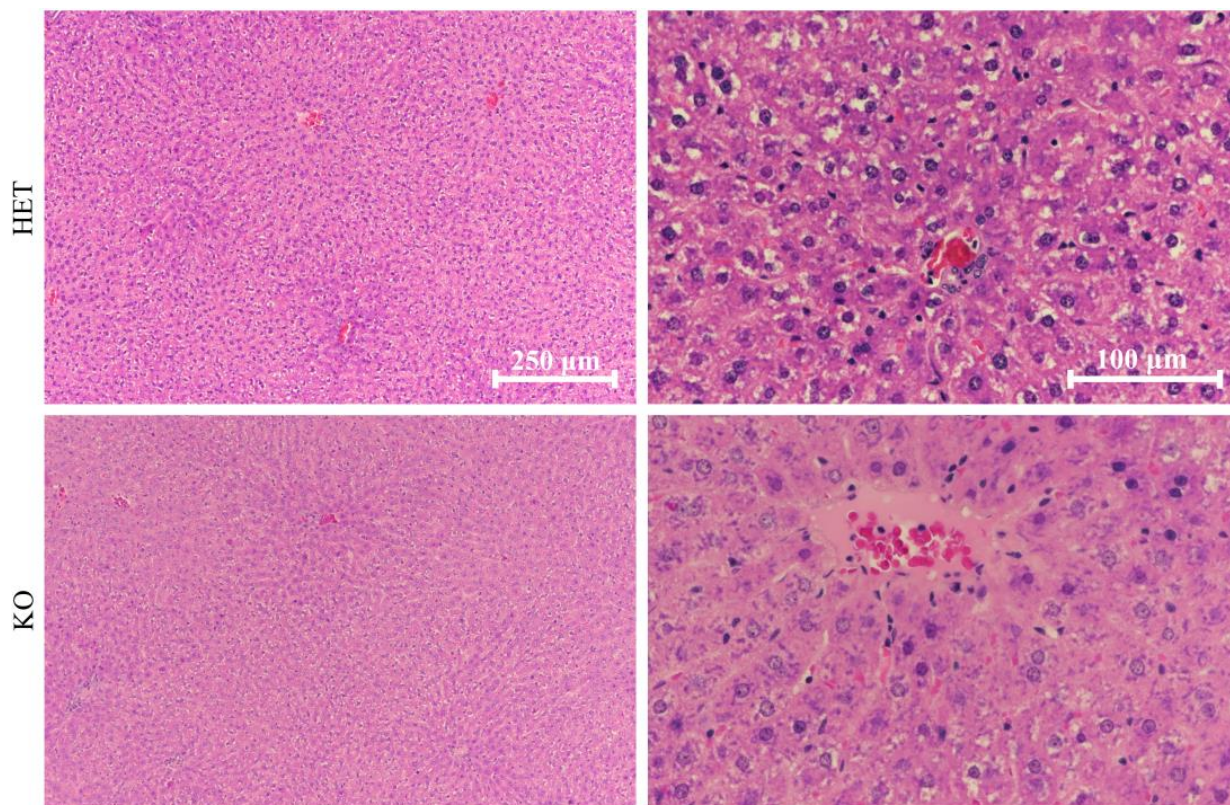
**Lisa 1. Uurimistöös kasutatud praimerid**

<b>Praimer (F – <i>forward</i>/ R – <i>reverse</i>)</b>	<b>Järjestus 5' -&gt; 3'</b>
Aire F	TTGCCAAGGTAGGGGACGAC
Aire R	ACTGCAGGATGCCGTCAA
B2m F	TGACCGTGATCTTTCTGGTG
B2m R	ATCTGAGGTGGGTGGAACTG
Blnk F	TATCCCTGTGCGGTTCATCG
Blnk R	CACAACGCTTCCAAAGTACTCT
Ccl5 F	GTGCCACGTGAAGGAGTAT
Ccl5 R	TCTGGGTTGGCACACACTTG
Ccl17 F	GGTTCAGGACCTCAGTGGAG
Ccl17 R	CACATGCTTGCTTTGGGGTC
Ccl19 F	GCTCTGTGCACCTCTAGACC
Ccl19 R	TTTCCTGGGCCAGAGTGAGT
Ccl21 F	GTCAGAAGCAGCAAGCAACTTT
Ccl21 R	GTCTGTTCAGTCCCCTTGCAG
Ccl22 F	CTGCCAGGACTACATCCGTC
Ccl22 R	CTCCCTAGGCCAACTTGTGG
CD3g F	CGCCAGTCAAGAGCTTCAGA
CD3g R	CCTTGGAGACGGCTGTACTG
CD4 F	TTTCTGGTTTTTCACGGGGCT
CD4 R	GCTTTTCTGCATCCGGTGGG
CD8 F	AGACATGTGTAACCTGCACCAT
CD8 R	ACCGACTTTTTCCGGTCCTG
CD86 F	AGTGGCTTCTACTTCTGCGC
CD86 R	GCCACATGTCAAGCCTTTCTG
CK10 F	AACGCCGAGTACCAACAAC
CK10 R	TTAGTATTGCTCCCCTTCCAGC
Cxcl9 F	TGCCTAGACCCAGATTCAGCA
Cxcl9 R	CGGATGGTGGGGTGTTTTAGC
Fcer2a F	CCGTGGGTTATAGCAACTGG

Fcer2a R	CAGAAGGCGTCATTCCACTG
Foxp3 F	GGTCTCCAGTACCCCCAAATTC
Foxp3 R	GCTGAAGACGTGTGCATCCTAT
G2mb F	TTGCTGCAGTTAGTTCGGGG
G2mb R	CTGTTGGGGGCATTTTCACA
Gapdh F	ATCCCGCTAACATCAAATGG
Gapdh R	GTGGTTCACACCCATCACAA
Gzma F	TCACCTCCCTCTGATACTCTGA
Gzma R	GCCTCCAGAATCTCCGTAGC
Icam1 F	GCCTGGGGTTGGAGACTAAC
Icam1 R	CTGTCTTCCCAATGTCGCT
Ifng F	ACTGCCAAGGCACACTCATT
Ifng R	TGTTACCGTCCTTTTGCCAGT
IL2 F	TCCCATGATGCTCACGTTT
IL2 R	TTCCAGCGTCTTCCAAGTGA
IL6 F	CTCTCCGCAAGAGACTTCCAG
IL6 R	TGTGGGTGGTATCCTCTGTGA
Inv F	CATTCGGAGAAGCAGCCACAG
Inv R	TCCTTCTGGTGCTGTCCCATA
MHC II (RT1-Bb) F	TCCGTCACAAGCGTCAGAAA
MHC II (RT1-Bb) R	TTGATGCGGAAAGATGGGGG
Ms4a1 F	GGCCCAAATCTAATGTGGTTCT
Ms4a1 R	TCTTCTCCTCCTGCACTGG
Mx1 F	TCAGATTGCGAGTGAGGAGC
Mx1 R	TTCGCAGTTTGGTGAACAGC
Nos2 F	CAGGCTTGGGTCTTGTTAGC
Nos2 R	TTGTTGGGCTGGGAATAGCA
Oas2 F	GGTTAAGGGTGGCTCCTATGG
Oas2 R	TGGCTTTTCAGCCGTTGTTC
S100a8 F	AGGGATGACTTCAGGAAAATGGT
S100a8 R	CGCCACCCTTATCACCAACA
S100a9 F	GGACATCCTGACACCCTGAACA
S100a9 R	TGGTTTGTGTCCAGGTCCTCC
Spink5 F	AGAATGACCCAGTCAGGGGT

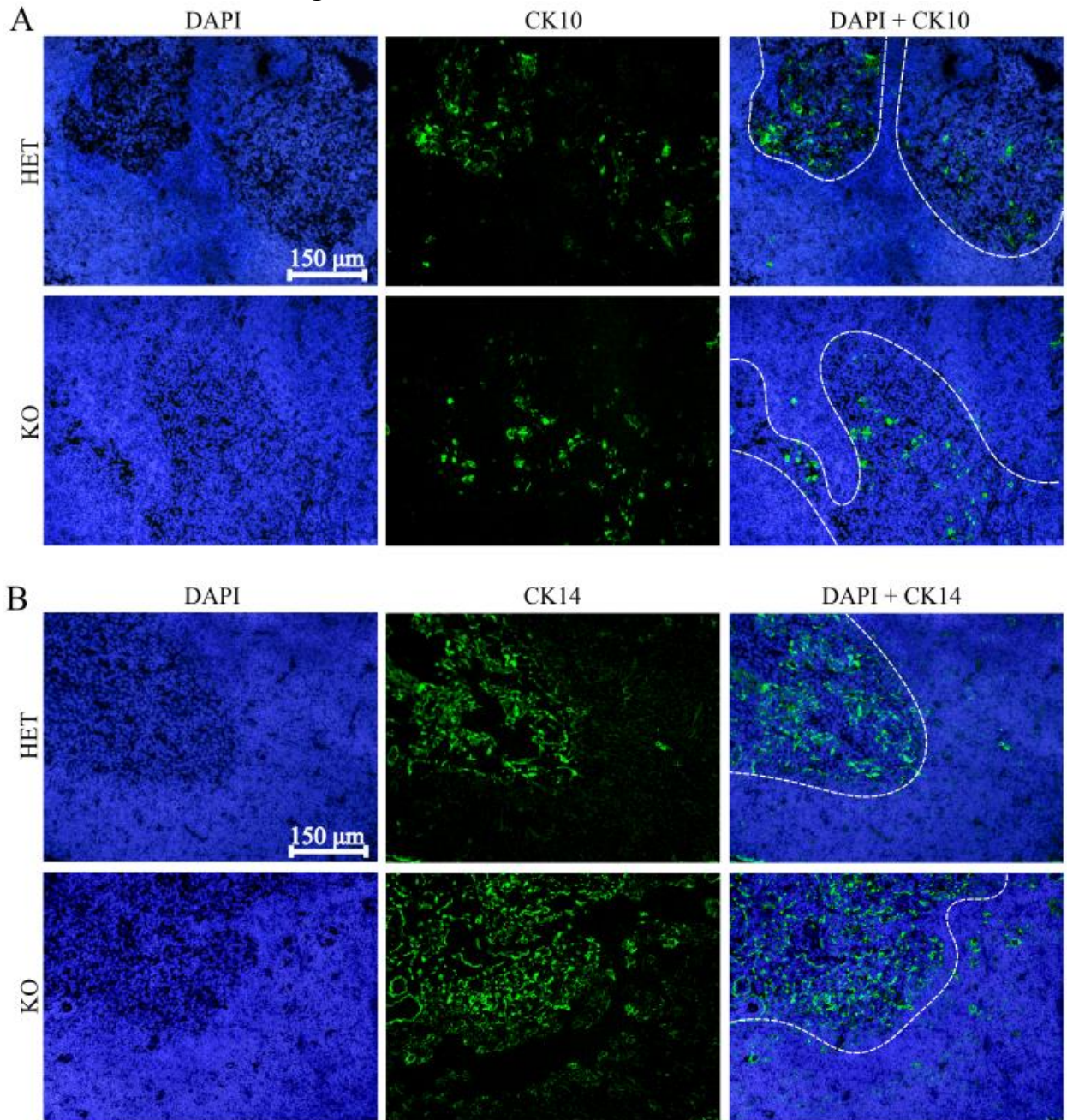
Spink5 R	TGCTTGGTCCTGGA ACTCAC
Stat1 F	CGGGAAGTACTACTCCAGGCC
Stat1 R	GATGGGGCTGGCTTGAGGTTC
Tnfa F	TGCTGGATATAACAAGTGGGAGG
Tnfa R	AAGGCTGAGGGTAGGGAGG
Tslp F	CTCAGCGAGGACACCAAGGG
Tslp R	CCAGTGTATGAGAGGGACGGA
Vcam F	TATCCTGCAAGTGGTACGGC
Vcam R	CTGCTGTCACAGTCCTCGAT
Xcl1 F	GGAAATGCCACCCTCACCTT
Xcl1 R	CACCTGAGATCCAGGGGAGA
Zap70 F	GGAGCCATGAGAGCTGTAATTTT
Zap70 R	TCAGGGTTACTGCTGTGCTG

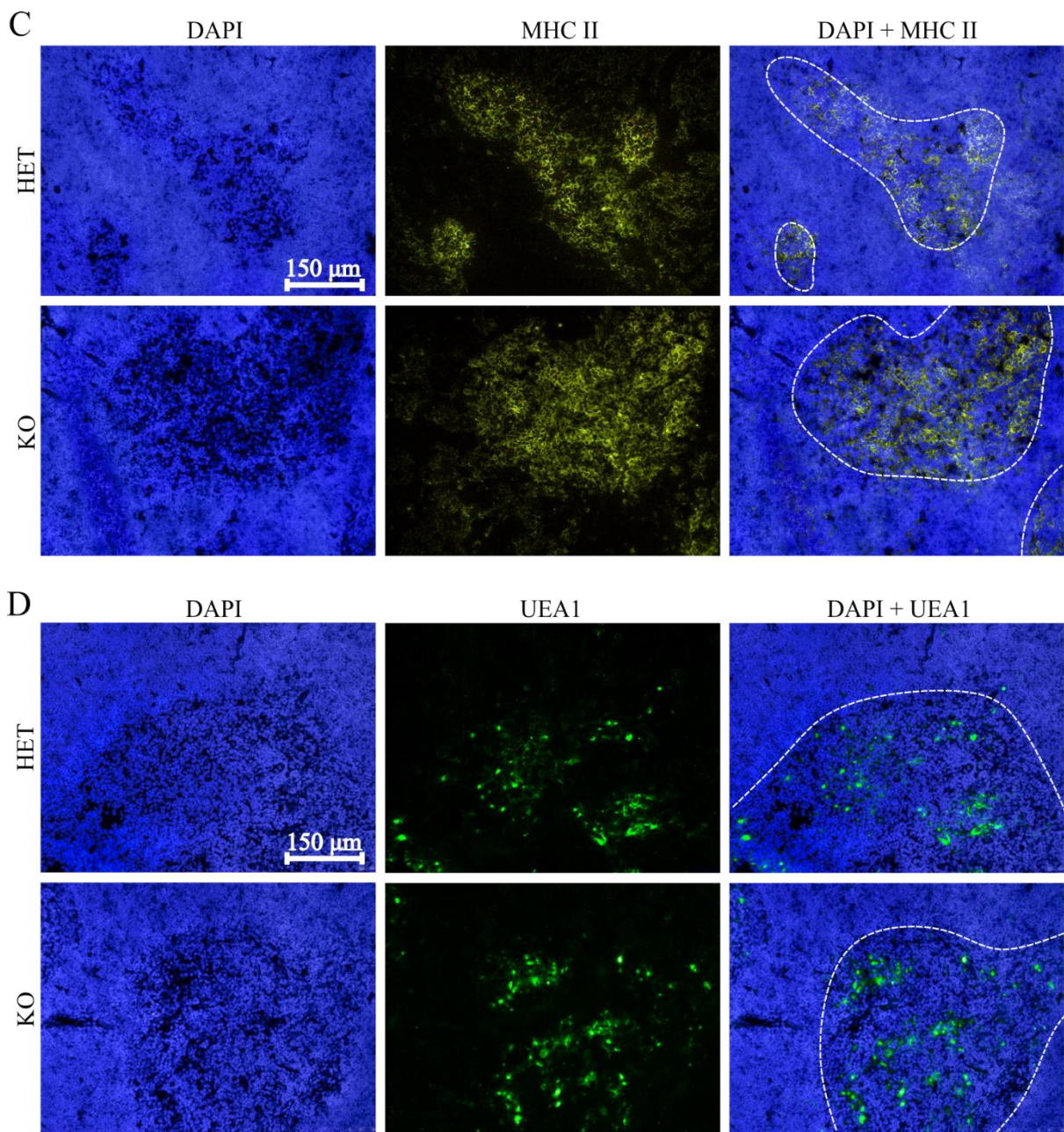
## Lisa 2. Maksa histoloogiline analüüs



**Joonis 11.** Hematoksüliin-eosiiniga töödeldud roti maksalõigud (n = 3, vanus 4–4,5 kuud).

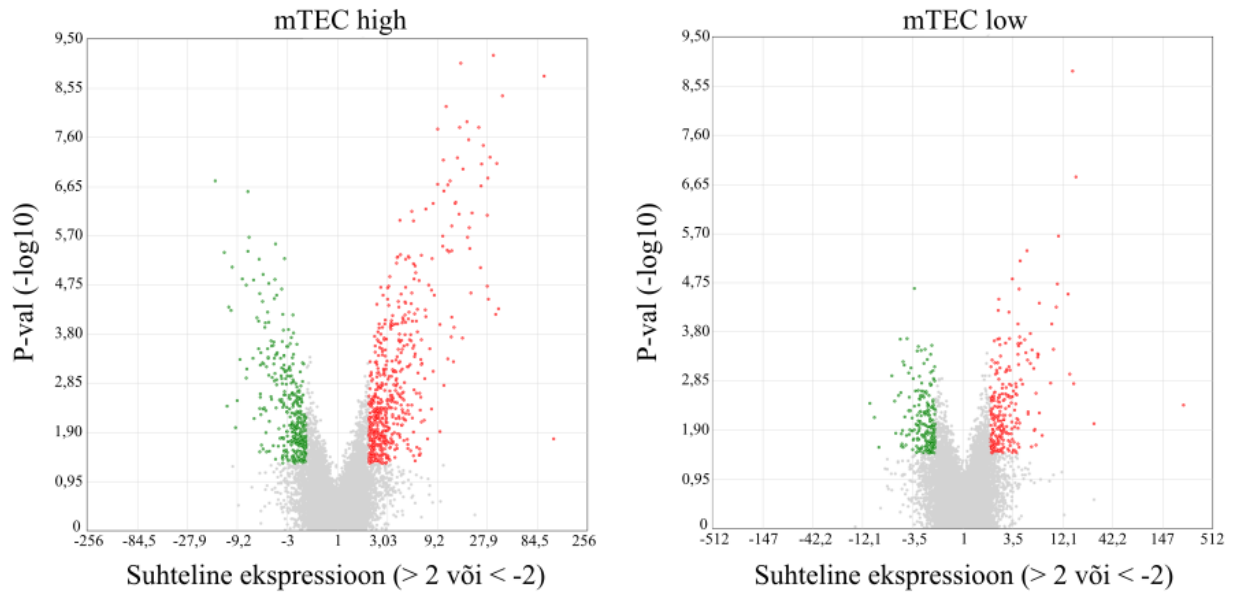
**Lisa 3. Tuumuse morfoloogia analüüs**





**Joonis 12.** Immuunfluorestsentsmikroskoopia analüüs DAPI, (A) CK10 (n = 3), (B) CK14 (n = 6), (C) MHC II (n = 6) ja (D) UEA1-ga (n = 6) märgistatud roti tüümuselõikudele. Punktirjoonega on tähistatud säsi-koore piir ligikaudne.

#### Lisa 4. Sorditud mTEC-ide ülegenoomne transkriptoomianalüüs



**Joonis 13.** Aire HET ja KO roti tuumusest sorditud mTEC<sup>high</sup> ja mTEC<sup>low</sup> rakkude ülegenoomne transkriptoomianalüüs (n = 3, p < 0,05, suhteline ekspressioon > 2 või < -2).

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

Mina, Artur Stoljar,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose

*Tsentraalse tolerantsuse mehhanismid APECED-i rotimudel*

*Central tolerance mechanisms in an APECED rat model*

mille juhendaja on Martti Laan, Kai Kisand, Sulev Kuuse,

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Artur Stoljar

11.06.2020