TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

Regulatoorse T-raku areng hiire tüümuse organkultuuris

Bakalaureusetöö

12 EAP

Kerli Reintamm

Juhendajad

MSc Rudolf Bichele

MSc Sulev Kuuse

TARTU 2018

Infoleht

Minu bakalaureusetöö pealkiri on „Regulatoorse T-raku areng hiire tüümuse organkultuuris“. Antud töö eesmärgiks oli uurida *ex vivo* tüümuse organkultuuri sobilikkust regulatoorse T-raku arengu jälgimiseks. Käesolevas töös leiti, et *ex vivo* tüümuse organkultuur võimaldas nii T-raku kui ka regulatoorse T-raku normaalset diferentseerumist ning sarnaselt *in vivo* süsteemile õige kasvukeskkonna teket tüümuses.

Märksõnad: tüümus, regulatoorne T-rakk, *ex vivo* tüümuse organkultuur

CERCS kood: B500 Immunoloogia, seroloogia, transplantoloogia

The title of my Bachelor's thesis is "The Development of Regulatory T Cells in the Murine Thymic Organ Culture". The aim of this thesis was to assess the suitability of *ex vivo* thymic organ cultures for observing the development of regulatory T cells. In this thesis we demonstrate that the *ex vivo* thymic organ culture facilitates the normal differentiation of both T cells in general and regulatory T cells in particular as well as maintaining a correct microenvironment for their development in the thymus.

Keywords: thymus, regulatory T cell, *ex vivo* thymus organ culture

CERCS code: B500 Immunology, serology, transplantology

Sisukord

Infoleht 2
Sisukord 3
Kasutatud lühendid 5
Sissejuhatus 7
1. Kirjanduse ülevaade 9
1.1 Immuuntolerantsus 9
1.1.1 Ülevaade 9
1.1.2 Tsentraalne T-rakuline tolerantsus 10
1.2 Tüümus 11
1.2.1 Ülevaade 11
1.2.2 Hiire tüümuse ontogenees 12
1.3 T-raku areng 13
1.3.1 Ülevaade 13
1.3.2 Positiivne selektsioon 15
1.3.3 Negatiivne selektsioon 15
1.4 Regulatoorne T-rakk 17
1.4.1 Ülevaade 17
1.4.2 Tregi teke tüümuses 17
1.4.3 Foxp3 18
2. Eksperimentaalne osa 20
2.1 Töö eesmärgid 20
2.2 Materjalid ja metoodika 20
2.2.1 Hiired 20
2.2.2 Embrüonaalse tüümuse organkultuur (FTOC) 20
2.2.3 RNA eraldamine ja cDNA süntees 21
2.2.4 Kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon 21
2.2.5 Voolutsütomeetria 23
2.2.6 Andmete analüüs 24
2.3 Tulemused ja arutelu 24
2.3.1 T-raku areng embrüonaalse tüümuse organkultuuris 24

2.3.2 Regulatoorse T-raku areng tüümuse organkultuuris 27
2.3.3 Normaalse kasvukeskkonna teke tüümuses..... 28
Kokkuvõte 33
The Development of Regulatory T Cells in Murine Thymic Organ Culture 34
Kasutatud kirjandus 35
Kasutatud veebiaadressid 40
Lihtlitsents 41
Tänusõnad..... 42

Kasutatud lühendid

AIRE – autoimmuunne regulaator (*autoimmune regulator*)

APC – antigeeni esitlev rakk (*antigen presenting cell*)

CCL19 – C-C motiivi sisaldav kemokiin 19

CCL21 – C-C motiivi sisaldav kemokiin 21

CCR7 - C-C motiivi sisaldava(te) kemokiini(de) retseptor 7

CD25 – diferentseerumise klaster 25 (*cluster of differentiation 25*)

CD4 – diferentseerumise klaster 4 (*cluster of differentiation 4*)

CD40 – diferentseerumise klaster 40 (*cluster of differentiation 40*)

CD45 – diferentseerumise klaster 45 (*cluster of differentiation 45*)

CD8 – diferentseerumise klaster 8 (*cluster of differentiation 8*)

CD80 – diferentseerumise klaster 80 (*cluster of differentiation 80*)

cDNA – komplementaarne DNA (*complementary DNA*)

Csnβ – beeta kaseiin

cTEC – tüümuse koore epiteelirakk (*cortical thymic epithelial cell*)

CXCL12 – C-X-C motiivi sisaldav kemokiin 12

CXCR4 – C-C motiivi sisaldava(te) kemokiini(de) retseptor 4

DC – dendriitrakk (*dendritic cell*)

DN – topelt negatiivne (*double negative*)

DP – topelt positiivne (*double positive*)

FBS – veise loote seerum (*fetal bovine serum*)

FezF2 – FEZ perekonna tsinksõrme sisaldav valk 2 (*FEZ Family Zink Finger 2*)

FOXN1 – *Forkhead Box Protein N1*

FOXP3 – *Forkhead Box P3*

FTOC – embrüonaalse tüümuse organkultuur (*fetal thymic organ culture*)

IL-2 – interleukiin 2

Ins2 – insuliin 2

KRT10 – keratiin 10

MHC – peamine koesobivuskompleks (*major histocompability complex*)

mTEC – tüümuse säsi epiteelirakk (*medullary thymic epithelial cell*)

PBS – fosfaatpuhver (*phosphate buffered saline*)

pTreg – perifeeria Treg (*peripherally induced Treg*)

RANK – NF-κB retseptori aktivaator (*receptor activator of NF-κB*)

RB – *running buffer*

SP – *single positive*

Spt1 – *salivary protein 1*

TCR – T-raku retseptor (*T cell receptor*)

TFF3 – *trefoil factor 3*

TRA – koespetsiifiline antigeen (*tissue-restricted antigen)*

Treg – regulatoorne T-rakk (*regulatory T cell*)

tTreg – tüümuse Treg (*thymus-derived Treg*)

Sissejuhatus

Immuunsüsteemi moodustavad organismi immuunvastuse aktivatsioonil ja selle vältel koostöös osalevad organid, rakud ja molekulid. Immuunsüsteemi füsioloogiline funktsioon on kaitsta organismi viiruste, toksiinide ja mikroobsete haigustekitajate eest.

Immuunsüsteemi saab jaotada laias laastus kaheks: kaasasündinud ning omandatud immuunsuseks. Kaasasündinud immuunsus hõlmab endas füüsilisi barjääre, nagu seda on näiteks nahk, rakulisi barjääre fagotsüteerivate rakkude näol ja komplemendi süsteemi. Omandatud immuunsuse peamised rakud on aga B-ja T-lümfotsüüdid ning nende edastatud immuunvastus on võrreldes kaasasündinud immuunsuse rakkudega oluliselt spetsiifilisem. B-lümfotsüüdid sekreteerivad antikehi ehk on osa humoraalsest immuunvastusest ning T-lümfotsüüdid vastutavad eelkõige rakulise immuunvastuse eest, tundes oma pinnal olevate retseptorite abil ära organismiväliseid molekule.

T-lümfotsüüdid on oma nime saanud tüümuselt, mis on nende küpsemiskohaks, ning funktsiooni alusel jaotatakse neid mitmeks erinevaks alatüübiks, millest peamised on tsütotoksilised T-lümfotsüüdid, abistaja T-rakud ning regulatoorsed T-rakud. Viimaseid vaadeldakse lähemalt ka antud töös. T-lümfotsüütide küpsemine tüümuses on suhteliselt keeruline protsess ning hõlmab endas paljude erinevate rakkude, molekulide ja signaaliradade omavahelist koostoimist. Kui tüümuses nende küpsemise käigus läheb midagi valesti, on tulemuseks autoreaktiivsed ehk organismi ennast ründavad T-lümfotsüüdid. Nende vigade paremaks mõistmiseks ning T-lümfotsüütide küpsemise ja arengu mehhanismide täpsemaks uurimiseks tüümuses kasutatakse peamiselt kolme mudelit: *in vivo, in vitro* ja *ex vivo.*

In vivo mudelid tüümuse uurimiseks kujutavad endast eelkõige hiirte loommudeleid ning võimaldavad hästi uurida näiteks mingi konkreetse mutatsiooni või geeni puudumise mõju kogu organismile. Sellegi poolest on vastavate hiireliinide loomine ning sellist tüüpi mudelite ülal pidamine suhteliselt kulukas ja aeganõudev. *In vitro* mudeleid kasutatakse just ühe konkreetse rakutüübi või organi osa uurimiseks ning võrreldes *in vivo* loommudelitega on tegemist lihtsama ja odavama meetodiga. Kahjuks on sellises kahedimensionaalses süsteemis T-rakkude arengut väga keeruline jälgida, sest kaob nende normaalseks diferentseerumiseks vajalik tüümuse

keskkond. Tüümuse ja T-raku arengu jälgimiseks on kõige optimaalsemad *ex vivo* organkultuurid. *Ex vivo* mudeli jaoks eraldatakse organismist mingi kude või organ, mis pannakse kasvama võimalikult sarnaselt *in vivo* tingimustele. Sellised tüümuse organkultuurid on tüümuse ja T-raku arengu uurimiseks väga levinud, võimaldades õiget kolmedimensionaalset keskkonda ning mõne konkreetse ühendi või geenimutatsiooni otsese mõju vaatlemist rakkudele.

Antud töö eesmärk oli hinnata hiire embrüonaalse tüümuse organkultuuri sobivust regulatoorse T-raku küpsemise hindamiseks. Töö teostati Tartu Ülikooli meditsiiniteaduste valdkonna bio- ja siirdemeditsiini instituudi molekulaarpatoloogia uurimisrühmas.

1. Kirjanduse ülevaade

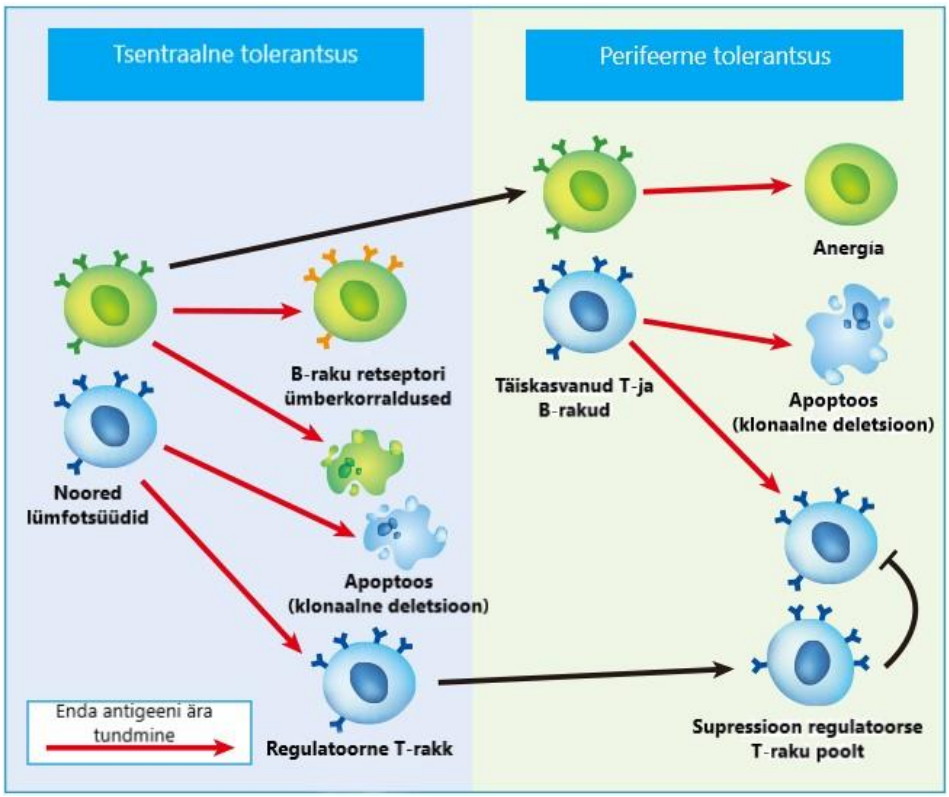
1.1 Immuuntolerantsus

1.1.1 Ülevaade

Immuuntolerantsus on defineeritud kui immuunsüsteemi mitte reageerimine antigeenile, mis on indutseeritud varasemast kokkupuutest sama antigeeniga. Antigeen võib olla nii võõrast päritolu kui ka organismist endast pärinev molekul, mis kutsub esile immuunvastuse. Tolerantsus ehk mitte reageerimine organismi enda kudede poolt ekspresseeritud antigeenidele on osa normaalsest immuunsüsteemist (Abbas et al., 2007).

Immuuntolerantsuse käigus kõrvaldatakse või inaktiveeritakse lümfotsüüdid, mis tunnevad ära organismi enda antigeene. T-raku repertuaari kujunemisel tekivad juhuslike rekombinatsioonide tõttu vahel ka sellised lümfotsüüdid, mille T-raku retseptor on võimeline ära tundma ka organismis tavaoludes esinevaid kehaomaseid antigeene ja võivad seega reageerida organismi enda rakkude ja kudede vastu. Immuuntolerantsuse mehhanismid hoiavad selliseid reaktsioone ära (Abbas et al., 2007; Cosway et al., 2017).

Tolerantsuse organismi enda antigeenide suhtes võivad indutseerida rakud, mis ümbritsevad ebaküpseid autoreaktiivseid lümfotsüüte lümfoidorganites – seda nimetatakse tsentraalseks tolerantsuseks – või küpsed lümfotsüüdid perifeerias, mida tuntakse perifeerse tolerantsusena (Joonis 1). Tsentraalse tolerantsuse tagavad tsentraalsed lümfoidorganid tüümus ja luuüdi, milles tekivad vastavalt sellised küpsete T- ja B- lümfotsüütide repertuaarid, mis ei reageeri konkreetses lümfoidorganis olemasolevatele antigeenidele (Xing ja Hogquist, 2012).



Joonis 1. Immuuntolerantsus. Tsentraalne tolerantsus tekib peamiselt luuüdis ja tüümuses ning perifeerne tolerantsus perifeersetes kudedes. Autoreaktiivsed lümfotsüüdid võivad lümfoidorganites minna apoptoosi, läbida retseptorite modifikatsiooni (B-rakud) või areneda regulatoorseteks T-rakkudeks (vaid CD4+ T-rakud). Mugandatud veebiaadressilt: https://www.genscript.com/self-tolerance.html.

1.1.2 Tsentraalne T-rakuline tolerantsus

Paljud ebaküpsed T-rakud, mis tunnevad tüümuses küpsedes ära organismi enda antigeene kõrvaldatakse ehk nad viiakse apoptoosi. Seda protsessi nimetatakse negatiivseks selektsiooniks ning see on üks peamisi tsentraalse T-rakulise tolerantsuse mehhanisme (Abbas et al., 2007). Olulisemad faktorid määramaks kas antigeen, millega autoreaktiivne tümotsüüt seondus, indutseerib negatiivse selektsiooni, on selle antigeeni kontsentratsioon tüümuses ning tümotsüüdi T-raku retseptori (TCR – *T cell receptor*) afiinsus ära tuntud antigeeni suhtes – mida tugevam seondumine, seda suurema tõenäosusega viiakse tümotsüüt apoptoosi. Neid antigeene esitletakse tümotsüüdile antigeeni esitleva raku (APC – *antigen presenting cell*) pinnal koos peamise koesobivuskompleksiga (MHC – *major histocompability complex*) (Kondo et al. 2017; Lucas et al., 2016). Näiteks tüümuse säsis on APCdeks medullaarsed tüümuse epiteeli rakud (mTEC – *medullary thymic epithelial cell*) ja dendriitrakud (DC – *dendritic cell*). Osad dendriitrakud on

võimelised esitlema tümotsüütidele selliseid antigeene, mida ei leidu ainult tüümuses, vaid ka perifeerias. Nendest siiski ei piisa, et katta ära kogu perifeerias leiduv antigeenide repertuaar ning selle kompenseerimiseks ekspresseeritakse mTECdes tuhandeid kehaomaseid antigeene. mTECdes kontrollivad nende antigeenide ekspressiooni transkriptsiooni regulaator AIRE (autoimmuunne regulaator – *autoimmune regulator*) ja transkriptsioonifaktor Fezf2 (FEZ perekonna tsinksõrme sisaldav valk 2 – *FEZ Family Zink Finger 2*). Laias laastus jagatakse mTECdes ekspresseeritavad autoantigeenid kahte gruppi: Aire-sõltuvad ning Aire-sõltumatud (Akiyama et al., 2014; Anderson ja Su, 2011). Autoantigeenid on organismi enda antigeenid, millele organism on ise hakanud vastu tootma antikehasid ehk need on antigeenid, mida organism autoimmuunhaiguse korral ründab (Abbas et al., 2007).

1.2 Tüümus

1.2.1 Ülevaade

Tüümus on kahesagaraline primaarne lümfoidorgan ning vajalik normaalse omandatud immuunsüsteemi toimimiseks. Lümfoidorganid esinevad kõigil imetajatel ning funktsiooni alusel jagatakse nad peamiselt kahte gruppi: primaarsed ja sekundaarsed lümfoidorganid (Boehm ja Swann, 2014). Primaarsed lümfoidorganid, nagu seda on tüümus ja ka luuüdi, tagavad õige mikrokeskkonna esmaste B- ja T-lümfotsüütide repertuaari kujunemisel. Sekundaarsed lümfoidorganid nagu näiteks lümfisõlmed ja põrn koordineerivad immuunvastust ehk organiseerivad antigeeni esitlevate rakkude ja lümfotsüütide omavahelisi interaktsioone (Boehm et al., 2012).

Tüümus on kõige ürgsem teadaolev primaarne lümfoidorgan ning inimeses asetseb ta keskseinandi ehk mediastiinumi ülemises osas südame ees (Boehm et al., 2012). Tüümus koosneb välimisest osast, mida nimetatakse kooreks, ja sisemisest osast, mida nimetatakse säsiks (Abbas et al., 2007). Tüümuse mikrokeskkonna moodustavad stroomarakud, milleks on endoteeli rakud, fibroblastid, hematopoeetilised stroomarakud (näiteks makrofaagid ja dendriitrakud) ning tüümuse epiteeli rakud. Tüümuse epiteeli rakud jagunevad kaheks ning eristavad omavahel tüümuse koore ja säsi osa: koores esinevad kortikaalsed tüümuse epiteeli rakud (cTEC - *cortical thymic epithelial cell*) ning säsis medullaarsed epiteeli rakud ehk mTECd (Gray et al., 2005). Tüümuse epiteelilise osa

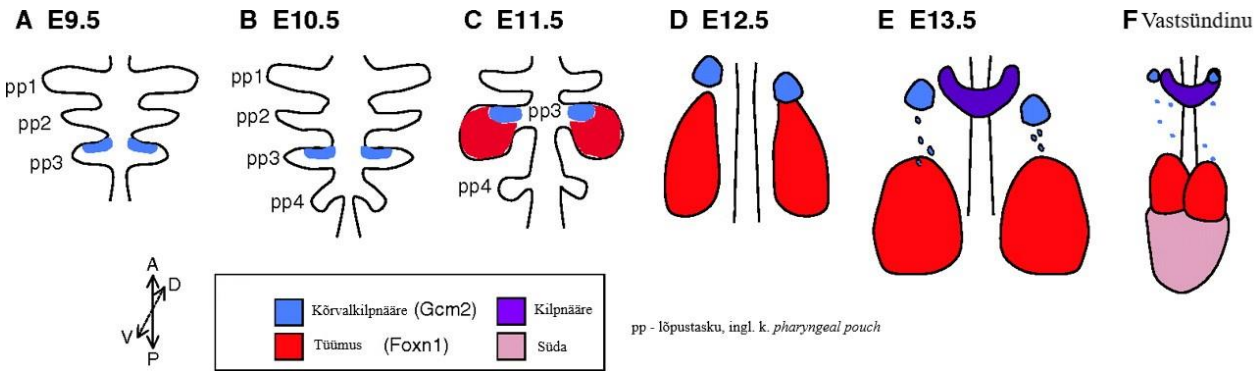
peamiseks markeriks on transkriptsioonifaktor FOXN1, mida kodeeritakse samanimeliselt geenilt. FOXN1 reguleerib tüümuse epiteeli rakkude arengut, diferentseerumist ja funktsioone nii sünnieelselt kui sünnijärgselt. Lisaks reguleerib FOXN1 imetajates kemokiini CCL25 ekspressiooni, mis näiteks hiire embrüos toetab hematopoeetiliste eellasrakkude, millest hiljem saavad tümotsüüdid, migratsiooni tüümusesse (Boehm et al., 2012).

Tüümuse epiteeli rakud koos stroomarakkudega reguleerivad arenevate tümotsüütide diferentseerumist, migratsiooni, proliferatsiooni, ellujäämist ja surma, omades seega keskset rolli omandatud immuunsüsteemi tekkes (Anderson ja Takahama, 2012).

1.2.2 Hiire tüümuse ontogenees

Tüümuse arengut on viimase 20 aasta jooksul uuritud väga palju ning aina rohkem on kinnitust saanud tüümuse organogeneesi endodermi-keskne mudel ehk tüümuse alguse saamine vaid endodermist – varem arvati, et tüümus areneb embrüonaalses eas endodermi ja ektodermi kokkupuutest (Gordon ja Manley, 2011).

Tüümuse varajane areng on tihedalt seotud kõrvalkilpnäärmete arenguga, sest mõlemad saavad alguse kolmandast lõpustaskust. Kõrvalkilpnäärmed ja tüümus on kolmandas lõpustaskus üksteisest eristatavad 11ndal embrüonaalsel päeval (E11,5) ning 12ndal embrüonaalsel päeval (E12,5) eralduvad nad neelust (*pharynx*) (Grapin-Botton ja Constam, 2007). E11,5 päeval on täheldatav ka esimese tüümuse-spetsiifilise transkriptsioonifaktori FOXN1 ekspressioon, mis on vajalik tüümuse epiteeli rakkude arenguks (Abramson ja Anderson, 2017). 13ndaks embrüonaalseks päevaks (E13,5) on tüümus ja kõrvalkilpnäärmed eraldunud üksteisest eraldiseisvateks organiteks. Peale seda algab nende liikumine lõplikesse asukohtadesse organismis ning juba 16ndaks embrüonaalseks päevaks (E16,5) paikneb tüümus samal positsioonil täiskasvanud looma omaga (Joonis 2) (Gordon ja Manley, 2011).



Joonis 2. Hiire tüümuse arengu ülevaade. Kõrvalkilpnäärmete ja tüümuse piirkonnad on eristatavad vastavalt Gcm2 ja Foxn1 ekspressiooni alusel. Mugandatud algallikast: Gordon & Manley, 2011.

Tüümuse põhiline ülesanne on T-rakkude küpsemise soodustamine ja seega on kõige arvukamad rakud tüümuses erinevates küpsusastmetes olevad lümfotsüüdid. Esimeste lümfoidsete eellasrakkude ränne tüümusesse algab hiire arengus 11nda embrüonaalse päeva (E11,5) paiku (Liu et al., 2005; Liu et al., 2007). Eellasrakkude ränne tüümusesse ei ole sujuv protsess, vaid toimub lainetena ning tüümuse arengu kindlates etappides (Le Douarin, 1973; Le Douarin ja Jotereau, 1975). E11,5 päeva rakkude rändele järgneb paus, kus tüümusesse siseneb väga vähe rakke. See paus on ligikaudu vastavuses tüümuse liikumisega tema lõplikusse asukohta organismis. Peale seda pausi järgneb teine suurem lümfoidsete eellasrakkude ränne tüümusesse, mis vahetab esimese rände rakud peaaegu täielikult välja (Douagi et al., 2000; Le Douarin ja Jotereau, 1975). Seda tsüklilist mehhanismi kontrollib tüümuse strooma ning selline perioodiline lümfoidsete eellasrakkude sisenemine tüümusesse jätkub ka sünnijärgses tüümuses (Goldschneider, 2006).

1.3 T-raku areng

1.3.1 Ülevaade

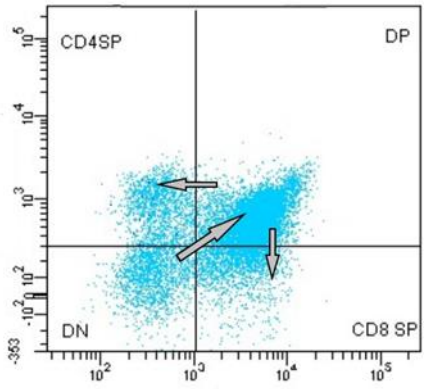
T-lümfotsüütide küpsemine hematopoeetilistest eellasrakkudest küpse T-lümfotsüüdini hõlmab endas mitmeid etappe alates T-raku retseptori geenide järjestuslikest ümberkorraldustest kuni funktsionaalse võimekuse omandamiseni (Abbas et al., 2007).

T-lümfotsüüdtide eellasrakud saabuvad tüümusesse vereringe kaudu sünnieelses staadiumis maksast ning täiskasvanud organismis luuüdist. Tüümusesse sisenevad lümfoidsed eellasrakud

koore ja säsi üleminekukohas, mida nimetatakse kortikomedullaarseks ühenduskohaks (Takahama, 2006).

Peale tüümusesse sisenemist algab lümfoidsete eellasrakkude areng T-rakkudeks. Seda arengut jälgitakse ja iseloomustatakse osaliselt pinnamarkerite CD4 ja CD8 alusel (Joonis 3). Tüümusesse sisenedes on tegemist pinnamarkerite CD4 ja CD8 suhtes topelt negatiivsete (DN – *double negative*) rakkudega (Abbas et al., 2007; Shinkai et al., 1992). Topelt negatiivsed tümotsüüdid rändavad tüümuse koore välimisse ossa. See ränne on peamiselt reguleeritud retseptori CXCR4 kemokiini CXCL12 poolt (Misslitz et al., 2004). Tüümuse koore välimises osas ehk subkapsullaarses regioonis toimuvad tümotsüütide T-raku retseptori β-ahelat kodeerivas geenis olulised ümberkorraldused. Vaid õigesti need geneetilised ümberkorraldused läbinud tümotsüüdid diferentseeruvad peale seda etappi edasi (Shinkai et al., 1992).

Järgmises T-raku küpsemise faasis ekspresseerivad tümotsüüdid mõlemat pinnamarkerit CD4 ja CD8 ehk nad on topelt positiivsed (DP – *double positive*). Topelt positiivsed T-rakud hakkavad oma pinnal ekspresseerima kemokiini retseptorit CCR7 ning tänu sellele liiguvad tüümuse säsi poole, sest mTECd toodavad retseptori CCR7 ligande CCL19 ja CCL21. Nii koordineeritakse tümotsüütide liikumist koorest säsisse. Selle migratsiooni ajal toimuvad T-raku retseptori α-ahela geenides ümberkorraldused, mille tulemuseks on CD4+CD8- ja CD4-CD8+ fenotüübiga rakud (Takahama, 2006). CD4+ rakkudest saavad näiteks abistaja T-rakud, mis perifeerias produtseerivad tsütokiine vastusena antigeeni stimulatsioonile ning lisaks ekspresseerivad makrofaage ja B-lümfotsüüte abistavaid efektormolekule. Samuti diferentseerub üks CD4+ rakkude alampopulatsioon regulatoorseteks T-rakkudeks (Treg – *regulatory T cell*). CD8+ rakkudest saavad näiteks tsütotoksilised T-rakud, mis on võimelised tapma kasvajarakke, viirustega nakatunud rakke või mõnel muul moel kahjustunud rakke (Abbas et al., 2007).



Joonis 3. T-raku arengu jälgimine pinnamarkerite CD4 ja CD8 põhjal voolutsütomeetria analüüsis. Esmalt tekib topelt negatiivne ehk DN rakupopulatsioon, millele järgneb topelt positiivse ehk DP rakupopulatsiooni teke. Seejärel toimub lahknemine kas CD4+ või CD8+ tümotsüütideks.

1.3.2 Positiivne selektsioon

Tüümuse koore subkapsullaarses regioonis toimuvad tümotsüütide T-raku retseptori β-ahelates sellised geneetilised ümberkorraldused, mis määravad küpseva tümotsüüdi edasise saatuse. Tümotsüüt, mille T-raku retseptor on peale nii α- kui ka β-ahelate ümberkorraldusi võimeline siduma peamise koesobivuskompleksi ehk MHC molekuli, jätkab oma arengut ning liigub edasi tüümuse säsisse. CD4+ rakud seonduvad MHC klass II molekulidega ning CD8+ rakud vastavalt MHC klass I molekulidega. Tümotsüüt, mille T-raku retseptor ei ole võimeline siduma MHC molekuli, saadetakse apoptoosi. Seda protsessi nimetatakse positiivseks selektsiooniks (Lucas et al., 2016; Takahama, 2006).

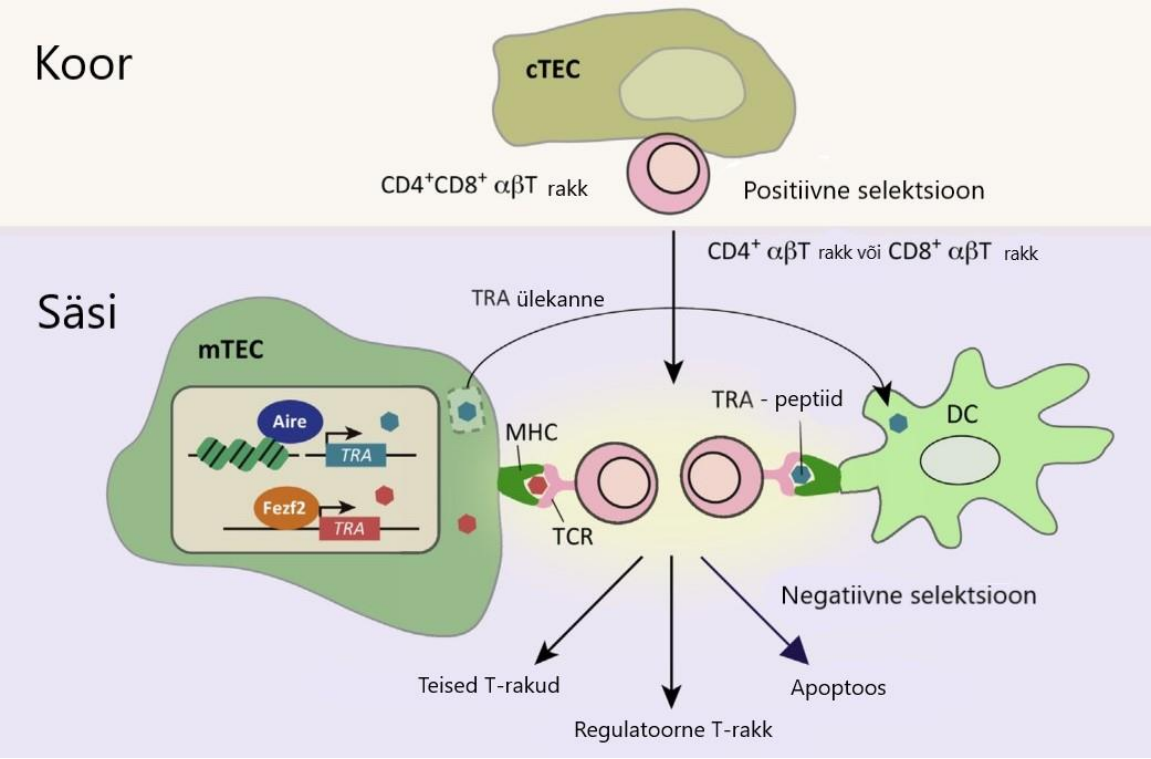
1.3.3 Negatiivne selektsioon

Peale positiivset selektsiooni liiguvad tümotsüüdid tüümuse säsisse, kus nad veedavad umbes 12 päeva. Säsis interakteeruvad CD4+ ja CD8+ tümotsüüdid mTECdega ja dendriitrakkudega, mis esitlevad neile võimalikult palju erinevaid kehaomaseid antigeene, millest suure osa moodustavad koespetsiifilised antigeenid (TRA – *tissue-restricted antigen*), mida leidub ka perifeerias ehk väljapool tüümust. Paljude TRAde ekspressioon mTECdes on reguleeritud transkriptsiooni regulaatorite Aire ja Fezf2 poolt (Takaba ja Takayanagi, 2017). Peaaegu kõik T-rakud, mis seonduvad mTECde poolt esitletud antigeeni ja MHC kompleksidega saadetakse apoptoosi. Seda

protsessi nimetatakse negatiivseks selektsiooniks ning see on oluline eemaldamaks autoreaktiivseid tümotsüüte ehk tümotsüüte, mis tunnevad ära organismi enda antigeene (Joonis 4) (Derbinski et al., 2001; Klein et al., 2014).

Seega on T-raku selektsioon reguleeritud peamiselt tüümuse epiteeli rakkude poolt, mis võimaldavad juhuslikult genereeritud T-rakkude testimiseks sobivat mikrokeskkonda (Takaba ja Takayanagi, 2017).

T-rakkude negatiivse selektsiooni käigus tüümuses tekib üks alampopulatsioon CD4+ T-rakke, mida peale enda antigeeni ära tundmist ei saadeta apoptoosi. Need T-rakud diferentseeruvad edasi regulatoorseteks T-rakkudeks ning nende ülesandeks on hiljem perifeerias supresseerida teisi autoreaktiivseid T-rakke, mis vaatamata selektsioonile siiski perifeeriasse pääsevad. Regulatoorsed T-rakud on osa perifeersest tolerantsusest ning seega on negatiivsel selektsioonil ka väga oluline panus üleüldisesse immuuntolerantsusesse (Abbas et al., 2007).



Joonis 4. Positiivne selektsioon tüümuse koores ning negatiivne selektsioon tüümuse säsis. Osad TRAd kantakse säsis mTECdelt üle dendriitrakkudele (DC), suurendades nii negatiivse selektsiooni efektiivsust. Mugandatud algallikast: Takaba ja Takayanagi, 2017.

1.4 Regulatoorne T-rakk

1.4.1 Ülevaade

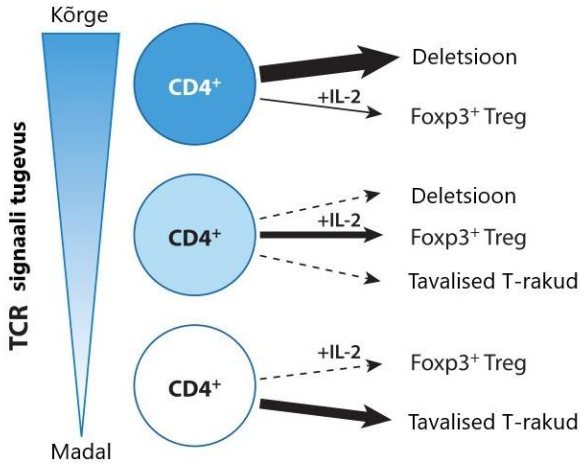
Regulatoorsed T-rakud (Treg – *regulatory T cell*) on CD4+ T-rakkude alampopulatsioon, mille funktsiooniks on supresseerida immuunvastuseid ning säilitada tolerantsus organismi enda antigeenidele. Nende üheks iseloomulikuks tunnuseks on transkriptsioonifaktori Foxp3 ekspressioon (Abbas et al., 2007).

Regulatoorsed T-rakud tekivad peamiselt tüümuse säsis peale CD4+ rakkude negatiivset selektsiooni – enamus oma antigeeni ära tundnud rakke saadetakse apoptoosi, kuid osa selliseid autoreaktiivseid CD4+ rakke diferentseeruvad Tregideks (Sakaguchi, 2005). Selliseid tüümuses tekkinud regulatoorseid T-rakke nimetatakse tüümuse Tregideks ehk tTregideks (tTreg - *thymus-derived Treg*). Samuti võivad Tregid tekkida perifeerias naiivsetest T-rakkudest ehk antigeeniga veel mitte kohtunud küpsetest T-rakkudest. Neid Trege nimetatakse perifeeria Tregideks ehk pTregideks (pTreg – *peripherally induced Treg*) (Kitagawa ja Sakaguchi, 2017).

1.4.2 Tregi teke tüümuses

Regulatoorsete T-rakkude teke tüümuses on eelkõige seotud T-raku retseptori ning MHC-peptiid kompleksi seondumise tugevusega (Joonis 5). Mida tugevama signaali saab CD4+ tümotsüüt oma TCRilt ehk mida tugevam oli seondumine omaenda organismi antigeeniga, seda suurema tõenäosusega saadetakse tümotsüüt apoptoosi. Keskmise tugevusega signaali saanud tümotsüüdid pääsevad apoptoosi saatmisest ning nemad diferentseeruvad suure tõenäosusega edasi Foxp3+ regulatoorseteks T-rakkudeks (Hsieh et al., 2012).

Lisaks TCRilt saadud signaali tugevusele on äärmiselt oluline Tregide tekkeks IL-2 olemasolu ja kättesaadavus. IL-2 on tsütokiin, mis on vajalik Tregide arenguks, funktsioneerimiseks ja ellujäämiseks (Sakaguchi et al., 2008). Hiljutised uuringud on näidanud, et IL-2 tootvad antigeeni esitlevad rakud hoiavad tüümuses toodetavate Tregide arvu tasakaalus. Olemasolevate Tregide vajadus piiratud koguse IL-2 suhtes vallandab negatiivse tagasiside uute Tregide tootmisele ehk kui tekib liiga palju Trege, siis nende juurde tootmist tüümuses piiratakse. Seega lisaks Tregide arengule ja õigele funktsioneerimisele koordineerib IL-2 ka uute Tregide tootmist (Weist et al., 2015).



Joonis 5. Tregide teke tüümuses. Mida tugevam on TCRilt saadud signaal, seda suurema tõenäosusega viiakse rakk apoptoosi. Keskmise signaali tugevuse korral tekivad Tregid. Noolte paksus näitab ühe või teise asja toimumise tõenäosust. Mugandatud algallikast: Josefowicz et al., 2012.

1.4.3 Foxp3

Regulatoorsed T-rakud ekspresseerivad neile iseloomulikku transkriptsioonifaktorit Foxp3. Foxp3 on Tregide arengu ja supresseeriva funktsiooni kõige suurem regulaator (Josefowicz et al., 2012).

Tregide arengut ning arvukust reguleerib Foxp3 peamiselt kahel moel: võimendades Tregi arengut soodustavate geenide ekspressiooni ning hiljem peale Tregide aktivatsiooni neid samu geene represseerides (Kitagawa ja Sakaguchi, 2017). Mitmed uuringud on näidanud, et Foxp3 puudulikes Tregides on Tregidele omased transkriptid olemas ning neid ekspresseeritakse lihtsalt madalamatel tasemetel. See omakorda tähendab, et Foxp3 käitub geenikspressiooni võimendava molekulina ning ei indutseeri *de novo* Tregi tüüpi geenikspressiooni (Samstein et al., 2012; Kitagawa ja Sakaguchi, 2017). Samuti on näidatud, et Tregide aktivatsioonil toimub suur transkriptsiooniline repressioon, mille käigus interakteerub Foxp3 ühe suure repressorkompleksi osaga, reguleerides nii aktiveeritavate Tregide arvu (Morikawa et al., 2014).

Foxp3 seos Tregide supressiivse võimega ei ole teada. Samuti ei ole teada Tregide supressiivse funktsiooni täpne mehhanism ning *in vitro* ja *in vivo* katsete põhjal on välja pakutud kolm erinevat mudelit: rakult rakule vahendatud supressioon, tsütokiinide sekretsioon ja rakkude metabolismi häirimine. Esimene variant kujutab endast dendriitrakkude küpsemise inhibeerimist ning selle läbi ka effektorrakkude aktiveerimise takistamist. Teine variant tähendab immuunosupressiivsete

tsütokiinide eritamist Tregide poolt, mis on vajalikud näiteks põletikukollete kontrollimiseks. Kolmas viis, kuidas Tregid võivad supresseerida effektorrakke on läbi IL-2 kättesaadavuse blokeerimise, sest effektorrakud vajavad diferentseerumiseks ja aktivatsiooniks samuti IL-2 ning ilma selleta ei saa nad areneda (Li et al., 2015). Teadmised, kuidas regulatoorsed T-rakud siiski täpsemalt oma supressiivset funktsiooni täidavad, on puudulikud. Samuti on ebaselged mehhanismid, mis mõjutavad tüümuses Tregide teket ja seega sai selle töö eesmärgiks vaadelda lähemalt regulatoorse T-raku küpsemist *ex vivo* ning välja selgitada, kas see mudelsüsteem võimaldab Tregi küpsemist ning kuidas seda saaks tulevikus Tregide uurimiseks kasutada.

2. Eksperimentaalne osa

2.1 Töö eesmärgid

Antud töö eesmärgiks oli hinnata *ex vivo* hiire tüümuse organkultuuri sobivust regulatoorse T-raku normaalse arengu vaatlemiseks. Täpsemalt vaadeldi kolme aspekti:

1. T-raku normaalne areng *ex vivo* tüümuse organkultuuris voolutsütomeetrilise analüüsi põhjal
2. Regulatoorse T-raku normaalne areng *ex vivo* tüümuse organkultuuris voolutsütomeetrilise analüüsi põhjal
3. *Ex vivo* tüümuse organkultuuris õige tüümuse kasvukeskkonna teke T-raku arengu jaoks erinevate geenide ekspressiooni alusel

2.2 Materjalid ja metoodika

2.2.1 Hiired

Katsetes kasutati C57BL/6 liini metsiktüüpi hiiri (Tartu ülikool, TÜ MRI vivaarium). Kindla vanusega hiire embrüote saamisel postuleeriti embrüonaalseks päevaks 0,5 (E0,5) päev, mille hommikul tuvastati emasel hiirel vaginaalne limakork.

2.2.2 Embrüonaalse tüümuse organkultuur (FTOC)

Tiined hiired hukati 16. tiinuspäeval enne embrüote eemaldamist tservikaalse dislokatsiooni teel. Embrüonaalsed tüümused võeti embrüotest välja teravatipuliste pintsettidega ning tüümuse sagarad eraldati üksteisest samade pintsettidega. Seejärel pandi tüümuse sagarad kasvama gaasi ja vedeliku piirpinnale MF-Millipore^{TM} membraanfiltritele, mille poori läbimõõt oli 0,8 µm (EMD Millipore). Membraanfiltrid olid asetatud Artiwrap käsna (Medipost Ltd.) peale 2 milliliitris DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; PAA) söötmes, millele oli tootja poolt lisatud 4,5g/L glükoosi, L-glutamiini ja naatriumpüruvaati. Söötmele lisati ka mahu järgi 10% FBSi (Fetal Bovine Serum, veise loote serum; PAA) ning antibiootikumid streptomütsiin (0,1 mg/ml), penitsiliin (100 U/ml) ja amfoteritsiin B (0,25 µg/ml) (kõik PAA).

2.2.3 RNA eraldamine ja cDNA süntees

Eraldamaks tüümuse sagaratest RNA, purustati need mehaaniliselt pisikeste uhmrite abil 500 mikroliitris TRIZOLi (Qiagen) keskkonnas. Kui tüümuse sagarate purustamisele ei järgnenud kohe RNA eraldamist, talletati proovid peale seda etappi -80 °C juures. RNA eraldamiseks aga lisati proovidele 100 mikroliitrit kloroflormi (200 µl kloroformi 1 ml TRIZOLi kohta), segati korralikult ning hoiti 5 minutit toatemperatuuril. Seejärel tsentrifuugiti proove 12000 rpm juures (Eppendorf centrifuge 5415R) 15 minutit ning saadud vesifaas tõsteti ümber uude tuubi. Proovidele lisati nendele võrdses mahus 70% etanooli ning edasi puhastati RNA RNeasy Micro kitiga (Qiagen) vastavalt tootja protokollile. RNA säilitati -80 °C juures.

cDNA sünteesimiseks kasutati SuperScript III 17 pöördtranskriptaasi (Invitrogen). 14 µl reaktsioonisegu kohta võeti 200-500 ng eraldatud RNAd, 1 µl (500 µg/ml) oligo(dT) 18 praimerit (Invitrogen) ja 1 µl 10 mM dNTP segu (Fermentas). Praimerite seondumiseks inkubeeriti proove 5 min 65 °C juures, mille järel pandi tuubid kohe jääle ning hoiti seal vähemalt 1 minut. cDNA sünteesi alustamiseks lisati proovidele ensüümisegu, mis sisaldas 4 µl 5× First Strand puhvrit, 1 µl 0.1 M DTT, 1 µl ribonukleaasi inhibiitorit RiboLock (40 U/µl; Fermentas) ja 1 µl SuperScript III pöördtranskriptaasi (200 U/µl; ThermoFisher Scientific). Proovid suspendeeriti pipetiga korralikult läbib ning inkubeeriti 60 min 50 °C, seejärel reaktsioon peatati, tõstes temperatuuri 15 minutiks 70 °C peale. cDNA säilitati -80° juures edaspidiseks kasutamiseks.

2.2.4 Kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon

Kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon (qPCR) viidi läbi geenispetsiifiliste praimeritega (Tabel 1) ViiA7 Real-Time PCR System masinal (Applied Biosystems), kasutades MaximaTM SYBR Green/ROX qPCR Master Mixi (Fermentas). 10 µl qPCR segu sisaldas 0,5 µl cDNA-d, 5,4 µl 2× MaximaTM SYBR Green/ROX qPCR Master Mix-i (Fermentas), 0,1 µl 5 mM *forward* praimerit ning 0,1 µl 5 mM *reverse* praimerit. Proovid kanti 384 auguga qPCR plaadile (Applied Biosystems) 10 µl kaupa kolme paralleelse kordusena. Tulemused normaliseeriti koduhoidja geenide β2m ja CK2-8 ekspressiooni järgi.

Tabel 1. Töös kasutatud DNA praimerid

Praimer ***(F – forward/R – reverse)***	**Järjestus**
MHCII F	5’-CTCAGAAATAGCAAGTCAGTC-3’
MHCII R	5’-AATCTCAGGTTCCCAGTG-3’
CD80 F	5’-GTCCATCAAAGCTGACTTCTC-3’
CD80 R	5’-ATGCCAGGTAATTCTCTTCCA-3’
KRT10 F	5’-GTTCAATCAGAAGAGCAAGGA-3’
KRT10 R	5’-GTAGTTCAATCTCCAGACCC-3’
FezF2 F	5’-GAAGTGTGCGGCAAGGTGTTCAAT-3’
FezF2 R	5’-CCACAGACTTTGCACACAAACGGT-3’
Aire F	5’-CTTCTCTTCCTGATGACAGGT-3’
Aire R	5’-CCTTGCATCTCTACAAAGATCAG-3’
Ins2 F	5’-CAAGTGGCACAACTGGAG-3’
Ins2 R	5’-CAGCACTGATCTACAATGCC-3’
TFF3 F	5’-CTCTGTCACATCGGAGCAGTGT-3’
TFF3 R	5’-TGAAGCACCAGGGCACATT-3’
Spt1 F	5’-AACTTCTGGAACTGCTGATTCTG-3’
Spt1 R	5’-GAGGCCTCATTAGCAGTGTTG-3’
Csnβ F	5’-GGCACAGGTTGTTCAGGCTT-3’
Csnβ R	5’-AAGGAAGGGTGCTACTTGCTG-3’
CCL19 F	5’-CTGCCTCAGATTATCTGCCAT-3’
CCL19 R	5’-TCATTAGCACCCCCCAGAGT-3’
CCL21 F	5’-CCCTGGACCCAAGGCAGT-3’
CCL21 R	5’-AGGCTTAGAGTGCTTCCGGG-3’
CXCL12 F	5’-CATCAGTGACGGTAAACCAG-3’
CXCL12 R	5’-CACAGTTTGGAGTGTTGAGG-3’
RANK F	5’-CATCGGGTTCCCATAAAGTC-3’
RANK R	5’-AGGTAATAGAAGCCATCTTGGT-3’
CD40 F	5’-GCTATGGGGCTGCTTGTTGA-3’
CD40 R	5’-ATGGGTGGCATTGGGTCTTC-3’

β2m F	5’-TGAGACTGATACATACGCCTGCA-3’
β2m R	5’-GATGCTTGATCACATGTCTCGATC-3’
CK2-8 F	5’-AGGAGCTCATTCCGTAGCTG-3’
CK2-8 R	5’-TCTGGGATGCAGAACATGAG-3’

2.2.5 Voolutsütomeetria

Voolutsütomeetria analüüsi jaoks eemaldati kasvavad tüümuse sagarad kasvutassidelt ning homogeniseeriti need 2 milliliitris PBSis mehaaniliselt surudes läbi 70 mikroliitriste sõelade. Rakud tsentrifuugiti põhja, võeti üles 300 mikroliitris 2.4G2 hübridoomi söötmes ning hoiti 4 kraadi juures 20 minutit. Seejärel pandi proovidele peale CD25, CD45, CD4 ja CD8 antikehade segu ning hoiti 4 kraadi juures 30 minutit. Antikehade segu valmistati 2.4G2 hübridoomi söötmes ning antikehade kogused on toodud tabelis 2. Teostati pesu RBga ning seejärel fikseeriti rakke 40 minutit 4 kraadi juures 300 mikroliitris Fixation/Permeabilization Buffer (eBioscience) ja 100 mikroliitris Fixation/Permeabilization Concentrate’is (eBioscience). Peale rakkude fikseerimist pesti proove 10x Permeabilization Buffer’i lahjendusega (eBioscience) ning kanti neile peale Foxp3 antikeha koos sama puhvri lahjendusega. Proove hoiti sarnaselt teistele antikehadele 30 minutit 4 kraadi juures ning peale seda pesti rakke RBga. Voolutsütomeetria analüüsi jaoks võeti rakud üles 300 mikroliitris RBs. Tüümuse rakupopulatsioonide analüüsimiseks kasutati voolutsütomeetrit FACSCalibur (BD Biosciences).

Tabel 2. Konjugeeritud antikehad

Antikeha	**Kogus**
CD45 – PerCP-Cyanine 5.5 (BioLegend)	1:200
FOXP3 – FITC (eBioscience)	1:100
CD4 – AlexaFluor 700 (BioLegend)	1:200
CD25 – APC (eBioscience)	1:200
CD8 – Brilliant Violet 510 (BioLegend)	1:100

2.2.6 Andmete analüüs

Andmete analüüsimiseks kasutati programme GraphPad Prism 5, Adobe Photoshop CC 2018 ja Microsoft Excel 2013.

2.3 Tulemused ja arutelu

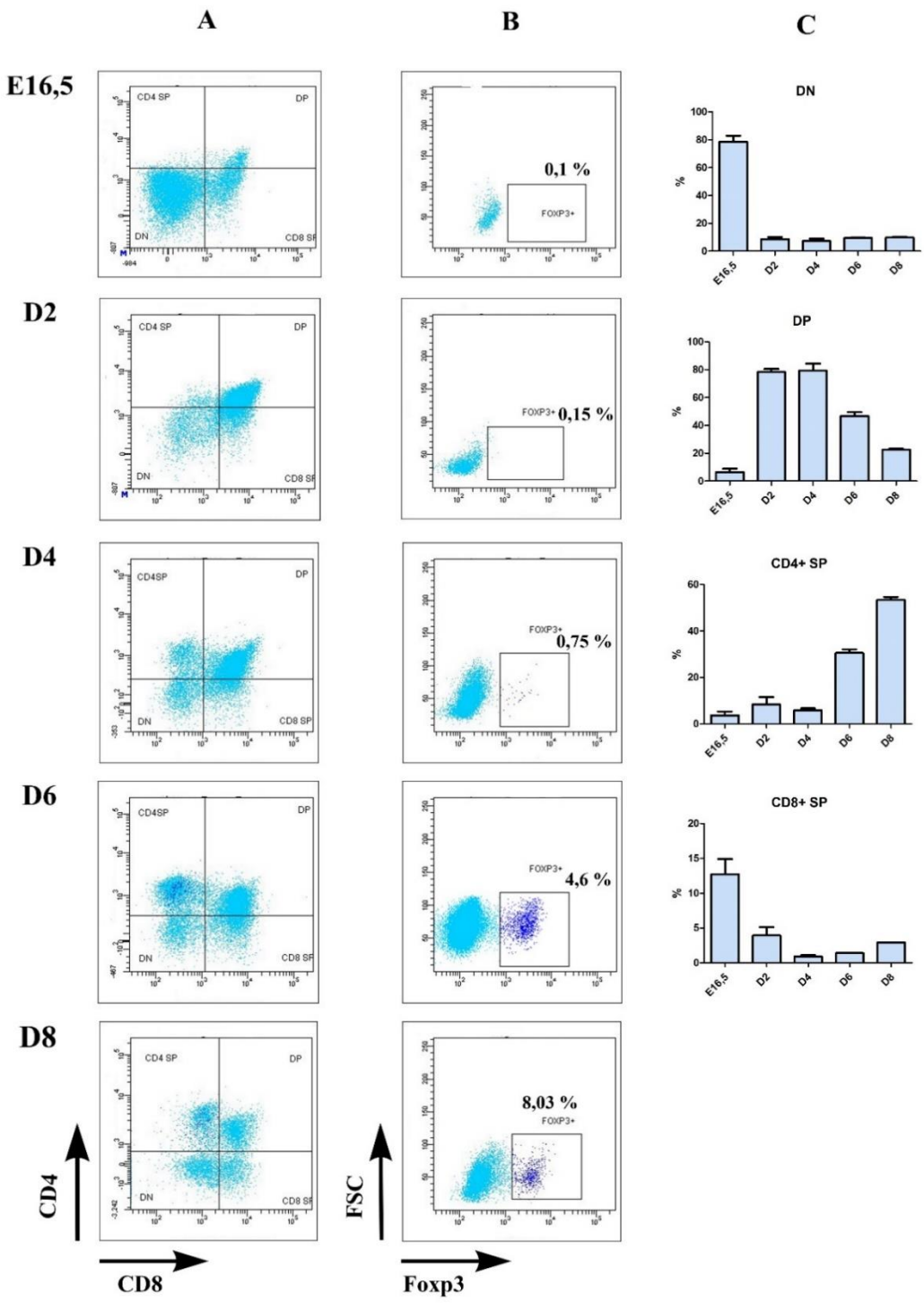
T-raku küpsemise etappe tüümuses võib kirjeldada mitmete pinnamarkerite ja geenide ekspressiooni kaudu, mille avaldumine on ajaliselt eraldatud või vastab kindlatele diferentseerumise etappidele. Selles töös hinnati T-raku korrektse küpsemise põhjal esmalt *ex vivo* tüümuse organkultuuri mudeli adekvaatsust ning seejärel regulatoorse T-raku populatsiooni teket voolutsütomeetrilise analüüsiga. Samuti uuriti T-raku arengu jaoks sobiliku keskkonna teket *ex vivo* organkultuuris erinevate geenide ekspressiooni taseme määramisega.

2.3.1 T-raku areng embrüonaalse tüümuse organkultuuris

Kõigepealt vaadeldi T-raku küpsemise etappe pinnamarkerite CD4 ja CD8 põhjal, mille analüüsimiseks kasutati voolutsütomeetriat (Joonis 6, tulp A). Kõige esimeses ajapunktis E16,5 ehk tüümuse organkultuuris mittekasvanud rakkudes (otse hiire embrüotest eraldatud tüümustes) oli selgelt eristatav nii CD4 kui ka CD8 suhtes negatiivne rakupopulatsioon. Teises ajapunktis ehk 2 päeva tüümuse organkultuuris kasvanud rakkude seas oli ülekaalus CD4 ja CD8 suhtes positiivne rakupopulatsioon – selline T-raku diferentseerumine kahe päeva jooksul *ex vivo* topelt negatiivsetest rakkudest topelt positiivseteks on vastavuses T-raku arenguga (hiire) tüümuses. Kolmandas ajapunktis ehk 4 päeva organkultuuris kasvanud rakkude seas on näha topelt positiivse rakupopulatsiooni jagunemine kaheks alamgrupiks – CD4+CD8- rakud ja CD8+CD4- rakud ehk vaid ühe pinnamarkeri suhtes positiivsed rakupopulatsioonid. Järgnevas kahes ajapunktis, päevadel 6 ja 8, suurenevad ainult ühe pinnamarkeri suhtes positiivsed rakupopulatsioonid arvuliselt veel. Selline T-rakkude diferentseerumine topelt positiivsetest rakkudest kas ainult CD4 või ainult CD8 suhtes positiivseteks on kooskõlas normaalse T-raku arenguga tüümuses.

Kokkuvõtlikult toimus *ex vivo* tüümuse organkultuuris T-rakkude diferentseerumine topelt negatiivsetest rakkudest topelt positiivseteks ning seejärel topelt positiivsetest kas CD4+CD8- või

CD4-CD8+ rakupopulatsioonideks. See on vastav T-raku arengule *in vivo* tüümuses ning järelikult toimus organkultuuris normaalne T-raku areng. Seega on *ex vivo* tüümuse organkultuuri mudel T-raku arengu hindamiseks sobilik.



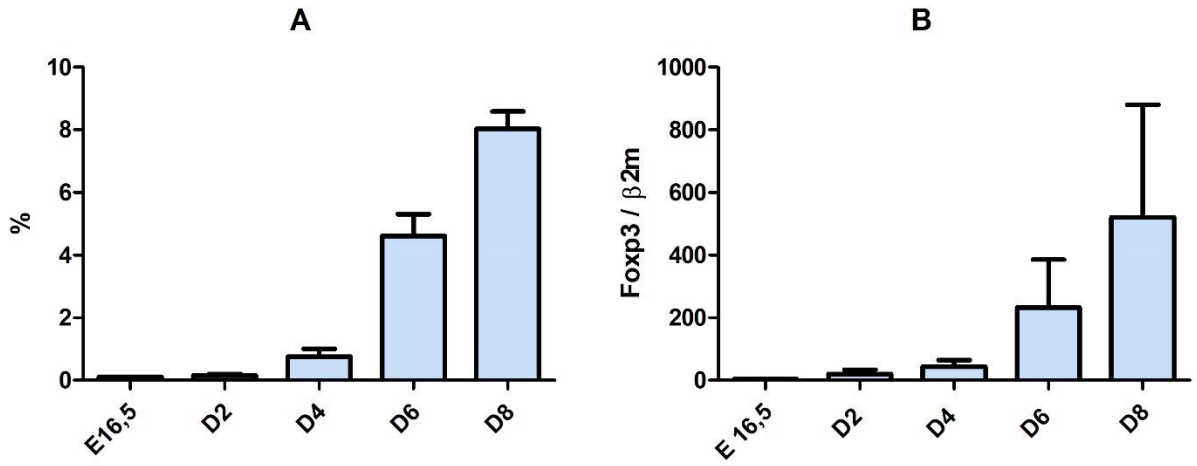
Joonis 6. T-raku areng tüümuse organkultuuris 8 päeva jooksul. Tulbas A on näidatud T-rakkude diferentseerumine 8 päeva jooksul topelt negatiivsetest rakkudest topelt positiivseteks ning seejärel kas CD4+ või CD8+ rakkudeks. Tulbas B on toodud regulatoorsete T-rakkude teke 8 päeva jooksul ning protsentuaalsed numbrid tähistavad Tregide osakaalu CD4+ rakupopulatsioonis. Tulbas C on toodud erinevate rakupopulatsioonide protsentuaalne muutus ajas.

2.3.2 Regulatoorse T-raku areng tüümuse organkultuuris

Lisaks T-raku normaalse arengu jälgimisele ning *ex vivo* organkultuuri mudeli valideerimisele oli üheks töö eesmärgiks vaadelda regulatoorsete T-rakkude teket eelnevas peatükis voolutsütomeetriliselt analüüsitud organkultuuris. Regulatoorse T-raku küpsemist hinnati T-raku pinnamarkeri CD4 – regulatoorsed T-rakud on CD4+ rakkude alampopulatsioon – ning regulatoorsetele T-rakkudele iseloomuliku transkriptsioonifaktori Foxp3 põhjal (Joonis 6, tulp B).

Esimesed Foxp3+ rakud olid detekteeritavad CD4+ rakkude seas kolmandas ajapunktis ehk neljandal kasvupäeval. Samas ajapunktis toimus ka märgatav CD4+ rakkude arvukuse suurenemine, mis on korrelatsioonis Foxp3+ rakkude ilmumisega. Kuuendal ja kaheksandal kasvupäeval tõusis Foxp3+ rakkude arvukus CD4+ rakupopulatsiooni seas veelgi enam. Regulatoorsed T-rakud tekivad tüümuses peale CD4+ tümotsüütide rännet koorest säsisse (Takahama, 2006) ning kuna sellele rändele kulub pisut aega, siis on Foxp3+ rakkude arvukuse märgatav suurenemine *ex vivo* organkultuuris kuuendal ja kaheksandal päeval vastavuses normaalse regulatoorse T-raku tekkega.

Samuti määrati *ex vivo* tüümuse organkultuuris kasvanud rakkude Foxp3 geenieksprессiooni tase kvantitatiivse polümeraasi ahelreaktsiooni meetodil (Joonis 7). Foxp3 ekspressiooni tase tõusis alates neljandast kasvupäevast märgatavalt ning oli vastavuses voolutsütomeetria analüüsi tulemustega. Seega võimaldab *ex vivo* tüümuse organkultuur normaalset regulatoorse T-raku küpsemist.

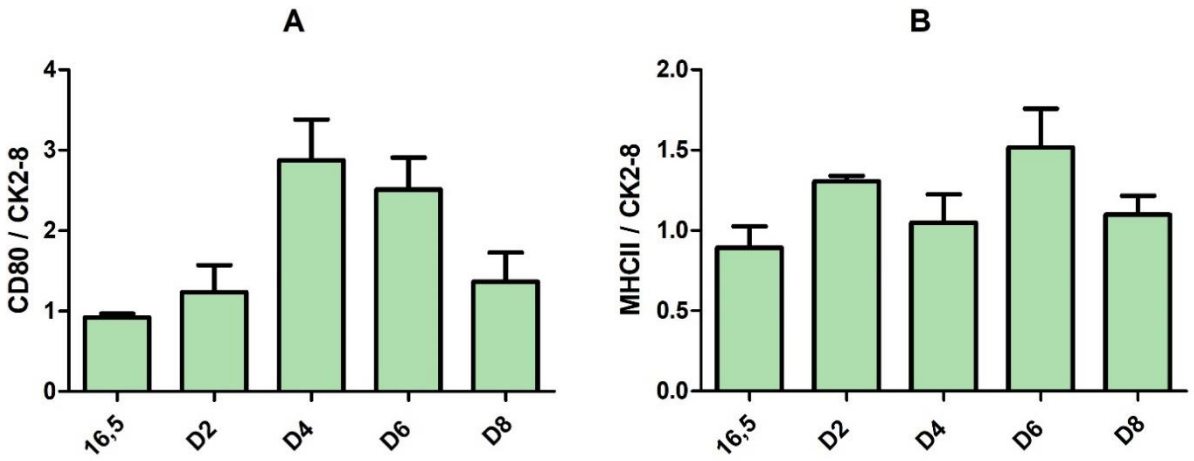


Joonis 7. Foxp3+ rakkude protsentuaalne tõus CD4+ rakkude hulgas (A) ning *Foxp3* geenieksprессiooni (B) võrdlus 8 päeva jooksul. Näha on selge FOXP3+ rakkude arvu ja *Foxp3* geenieksprессiooni taseme tõus aja jooksul ning kahe erineva analüüsi tulemuste vastavus. Tulemused on vähemalt kolme paralleelse iseseisva katse keskmised, märgitud on standardviga.

2.3.3 Normaalse kasvukeskkonna teke tüümuses

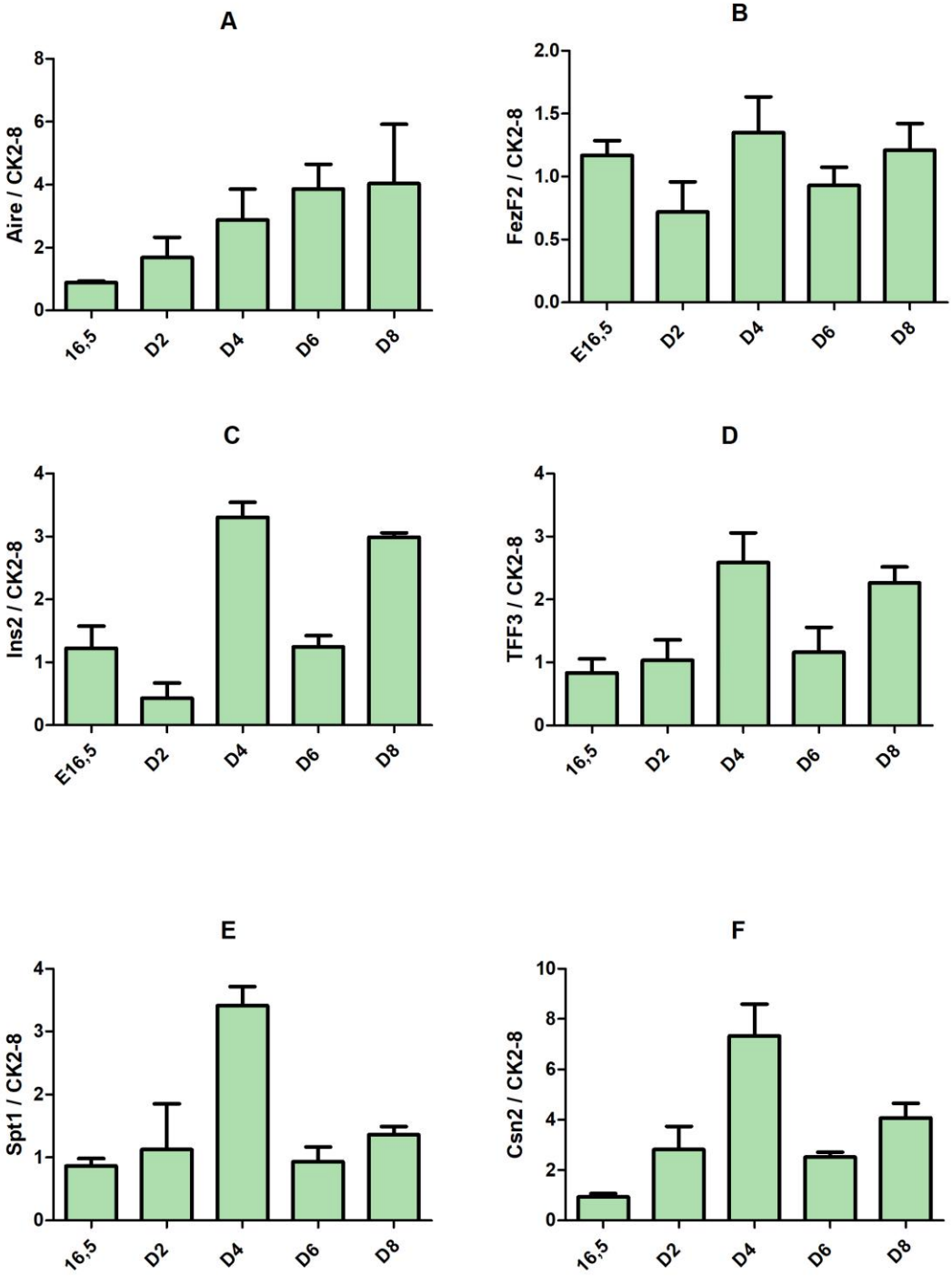
Peale üldise T-raku arengu ning regulatoorse T-raku arengu hinnati veel *ex vivo* tüümuse organkultuuris normaalset tümotsüüdi arengut soodustava keskkonna tekkimist mitmete geenide ekspressiooni põhjal. Selleks määrati nende geenide mRNA tase kvanitatiivse polümeraasi ahelreaktsiooni meetodil.

Esmalt vaadeldi MHC klass II ja CD80 mRNA ekspressiooni, mille funktsioonideks tüümuses on vastavalt organismi enda antigeenide presenteerimine arenevatele tümotsüütidele ning T-rakkude aktivatsiooniks ja ellujäämiseks vajaliku kostimulatoorse signaali pakkumine (Joonis 8). CD80 puhul on jälgitav ekspressiooni taseme tõus kuni neljanda kasvupäevani, peale mida toimub langus. MCH klass II puhul püsis geenieksprессiooni tase suhteliselt ühtlasena ning tõusis ajas vaid veidi. Sellegi poolest saab järeldada, et toimunud on korrektne tüümuse ja tümotsüütide küpsemine ning aktiivne antigeenide presenteerimine (MHC klass II) ja T-raku aktivatsiooni abistamine (CD80).



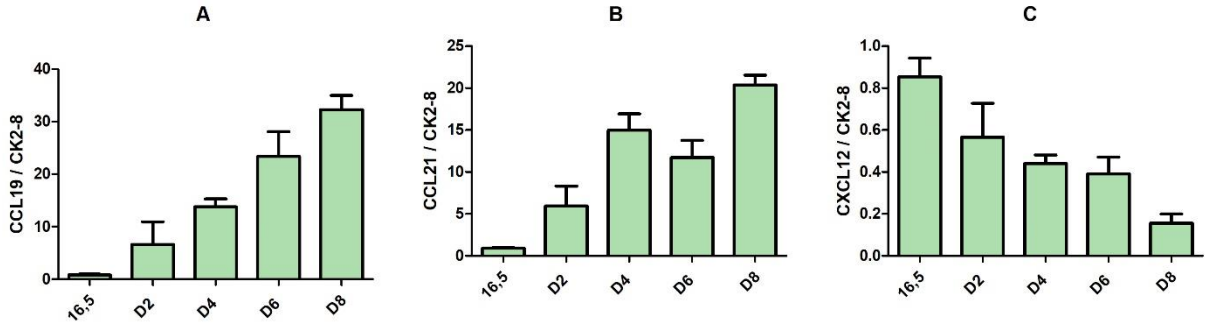
Joonis 8. CD80 (A) ning MHC klass II (B) geeniekspressiooni taseme muutus 8 päeva jooksul. Näha on CD80 taseme tõus kuni neljanda päevani ning MHC klass II sujuv tõus kõigi viie ajapunkti vältel. Tulemused on vähemalt kolme paralleelse iseseisva katse keskmised, märgitud on standardviga.

Seejärel hinnati *ex vivo* tüümuse organkultuuris *Aire* ja *Fezf2* taset (Joonis 9), mis mõlemad vastutavad koespetsiifiliste antigeenide ehk TRAde ekspresseerimise eest tüümuse säsi epiteeli rakkudes ja seega ka korrektse tümotsüütide negatiivse selektsiooni eest (Takaba et al., 2015). *Aire* puhul oli vaadeldav geeniekspressiooni taseme ühtlane tõus ning *Fezf2* puhul püsis tase suhteliselt ühtlasena kõigis vaadeldud ajapunktides. Aire ekspressiooni taseme kõrval hinnati ka kahte autoantigeenide gruppi: Aire-sõltuvad (*Ins2, Tff3* ja *Spt1* näitel) ja Aire-sõltumatud (*Csnβ* näitel). (Joonis 9). Kõigi vaadeldud autoantigeenide puhul oli täheldatav tõus neljanda kasvupäevani ning seejärel toimus langus. *Ins2* ekspressioon tüümuses on seotud autoreaktiivsete tümotsüütide negatiivse selektsiooniga tüümuse säsis (Fan et al., 2009) ning seega on selle taseme tõus vastavuses Aire omaga. *Spt1* on samuti seotud negatiivse selektsiooniga tüümuse säsis ja seega korrelatsioonis Aire ekspressiooniga (Akiyama et al., 2014). *Csnβ* ekspressiooni taseme tõus näitab normaalset tüümuse säsi epiteeli rakkude küpsemist (Gray et al., 2007; Rossi et al., 2007). *Aire* ja *Fezf2* ning kõigi autoantigeenide ekspressioonitaseme ajas muutumise põhjal saab öelda, et tüümuse säsi epiteel on normaalselt küpsenud ning tüümuses on toimunud tümotsüütide arengu seisukohast oluline negatiivne selektsioon. FTOCis on püsinud negatiivset selektsiooni soodustav keskkond.



JOONIS 9. *Aire* (A), *Fezf2* (B), *Ins2* (C), *TFF3* (D), *Spt1* (E) ning *Csn2* (F) geeniekspressiooni taseme muutus 8 päeva jooksul. Vaadeldav on *Aire* tõus 5 ajapunkti jooksul ning Fezf2 taseme suhteline püsivus ajas. Kõigi autoantigeenide puhul on vaadeldav tõus kuni neljanda päevani ning peale seda toimub geeniekspressiooni taseme langus. Tulemused on vähemalt kolme paralleelse iseseisva katse keskmised, märgitud on standardviga.

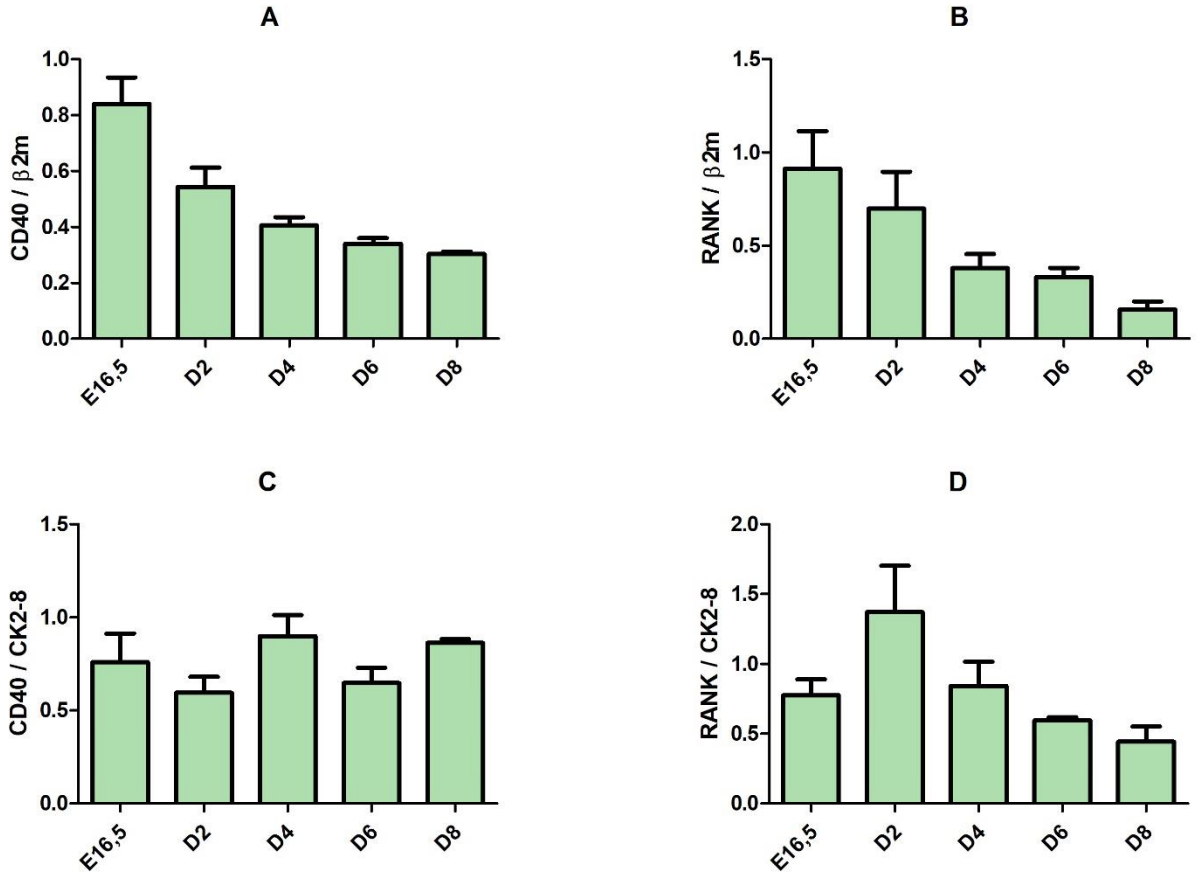
Lisaks vaadeldi *ex vivo* tüümuse organkultuuris *Ccl19, Ccl21* ning *Cxcl12* ekspressioonitasemete muutumist 8 päeva jooksul (Joonis 10). *Ccl19* ja *Ccl21* puhul oli täheldatav sujuv ekspressioonitaseme tõus ning *Cxcl12* puhul langus. CCL19 ja CCL21 on kemokiini retseptori CCR7 ligandid ning nende ekspressioonitaseme tõusud näitavad aktiivset tümotsüütide migratsiooni tüümuse koorest säsisse (Liu et al., 2004). CXCL12 on seotud tümotsüütide eellasrakkude migratsiooniga tüümusesse. CXCL12 on kemokiini retseptori CXCR4 ligand ning teda ekspresseerivad tüümuse koores stroomarakud, mis annavad hematopoeetilistele eellasrakkudele signaali tüümusesse jõudmiseks (Plotkin et al., 2003). Kuna tüümuse organkultuuris ei toimu uute eellasrakkude peale tulekut, siis on *Cxcl12* taseme langus loogiline, sest puuduvad rakud, mis stimuleeriks vastavate signaalide edasist ekspressiooni.



Joonis 10. *Ccl19* (A), *Ccl21* (B) ning *Cxcl12* (C) geeniekspressiooni taseme muutus 8 päeva jooksul. *Ccl19* ning *Ccl21* puhul on vaadeldav sujuv geeniekspressiooni taseme tõus ning *Cxcl12* puhul vastavalt langus. Tulemused on vähemalt kolme paralleelse iseseisva katse keskmised, märgitud on standardviga.

Lõpuks vaadeldi veel CD40 ja RANK geeniekspressiooni (Joonis 11). RANK ja CD40 on tüümuse epiteeli rakkude pinnal olevad retseptorid ning nende ligande, vastavalt RANKL ja CD40L, toodavad tüümuses tümotsüüdid. CD40 on kostimulatoorne valk antigeeni esitlevate rakkude pinnal ning on oluline nende aktivatsioonil T-rakuga seondumisel. RANK on NF-κB retseptori aktivaator, mis kontrollib näiteks tsütokiinide produktsiooni, ning omab väga olulist rolli tüümuse säsi epiteeli rakkude tekkel hiire embrüogeneesis. Sünnijärgse hiire tüümuses, mis klapib ajaliselt ka selles töös uuritud tüümuse küpsemisega, on tüümuse säsi epiteeli rakkude arenguks ja seega ka õige säsi mikrokeskkonna tekkeks vajalik RANKi ning CD40 omavaheline koostöö (Akiyama et al., 2008). Kuna nii RANK kui ka CD40 on mTECde küpsemiseks vajalikud ning positiivse

selektsiooni läbinud tümotsüüdid ekspresseerivad retseptori RANKi ligandi RANKLi (Hikosaka et al., 2008), siis nende retseptorite ekspressiooni püsimine tüümuse stroomas muutumatul tasemel (Joonis 11, graafikud C ja D) viitab *ex vivo* organkultuuris normaalseks küpsemiseks võimelise mTECi säilimisele.



Joonis 11. CD40 (A) ja RANK (B) geeniekspressiooni taseme muutus 8 päeva jooksul β2m suhtes ning CK2-8 suhtes (C ja D). β2m suhtes toimub selge langus ning CK2-8 suhtes püsis tase pigem ühtlasena. Tulemused on vähemalt kolme paralleelse iseseisva katse keskmised, märgitud on standardviga.

Tüümuse normaalse kasvukeskkonna tekkimise hindamiseks *ex vivo* tüümuse organkultuuris hinnati 13 erineva geeni ekspressiooni. Eelnevast tulemuste analüüsist järeldub, et *ex vivo* tüümuse organkultuuris tekib T-raku arengu jaoks sobilik kasvukeskkond. Geeniekspressiooni tulemused olid omavahel vastavuses voolutsütomeetria analüüsi (Joonis 6) tulemustega, milles oli samuti nähtav T-raku normaalne areng tüümuse organkultuuris.

Kokkuvõte

Antud töö tulemused näitasid järgnevat:

- Hiire embrüonaalse tüümuse *ex vivo* organkultuuris toimub normaalne tüümuse küpsemine ning see võimaldab T-raku normaalset arengut.
- Selline *ex vivo* organkultuur võimaldas ka regulatoorse T-raku arengut ning selle jälgimist.

Kuna käesolev töö näitas, et sellises tüümuse organkultuuris toimub korrektne T-raku küpsemine, siis võiks uurida ka *ex vivo* organkultuuris kasvanud regulatoorsete T-rakkude funktsionaalsust ning nende supresseerivat võimet.

Samuti võimaldab selline *ex vivo* organkultuur uurida erinevate signaalide mõju regulatoorse T-raku arengule.

The Development of Regulatory T Cells in Murine Thymic Organ Culture

Kerli Reintamm

Summary

The immune system is a complex system designed to protect the host from diseases and pathogen attacks. A correct immune response requires an interaction between many molecules, cells and organs within the organism. Even a slightest mistake in these interactions or a mutation in the development of immune cells might cause the organism to attack itself resulting in autoimmunity. Therefore, it is very important to be able to study the molecular mechanisms in the development of different immune cells and organs.

One model often used to observe the development of the thymus, a primary lymphoid organ required for the development of a lymphocyte subset called T-lymphocytes, is the fetal thymic organ culture (FTOC). FTOC allows us to observe the development of the thymus in *ex vivo* conditions which highly resemble those seen *in vivo*. The aim of this thesis was to assess the suitability of the *ex vivo* thymic organ culture for observing the development of regulatory T cells, which have a crucial role in peripheral tolerance.

Our results show that normal thymus maturation takes place in the fetal thymic organ culture and therefore the normal development of T cells can take place in the fetal thymic organ culture as well. We also show that the *ex vivo* organ culture enables the correct differentiation of regulatory T cells.

Collectively these data show that the *ex vivo* fetal thymic organ culture is a good model to examine the development and differentiation of regulatory T cells. This means that the *ex vivo* fetal thymic organ cultures could allow us to study the effects of different signals on the development of regulatory T cells and thus makes it a good future perspective.

Kasutatud kirjandus

Abbas, A.K., Lichtman, A.H., ja Pillai, S. (2007). Cellular and Molecular Immunology, Sixth Edition.

Abramson, J., ja Anderson, G. (2017). Thymic Epithelial Cells. Annu. Rev. Immunol. 35, 85–118.

Akiyama, N., Shinzawa, M., Miyauchi, M., Yanai, H., Tateishi, R., Shimo, Y., Ohshima, D., Matsuo, K., Sasaki, I., Hoshino, K., et al. (2014). Limitation of immune tolerance–inducing thymic epithelial cell development by Spi-B–mediated negative feedback regulation. J. Exp. Med. 211, 2425–2438.

Akiyama, T., Shimo, Y., Yanai, H., Qin, J., Ohshima, D., Maruyama, Y., Asaumi, Y., Kitazawa, J., Takayanagi, H., Penninger, J.M., et al. (2008). The Tumor Necrosis Factor Family Receptors RANK and CD40 Cooperatively Establish the Thymic Medullary Microenvironment and Self-Tolerance. Immunity 29, 423–437.

Anderson, G., ja Takahama, Y. (2012). Thymic epithelial cells: Working class heroes for T cell development and repertoire selection. Trends Immunol. 33, 256–263.

Anderson, M.S., ja Su, M.A. (2011). Aire and T cell development. Natl. Inst. Heal. 23, 198–206.

Boehm, T., ja Swann, J.B. (2014). Origin and Evolution of Adaptive Immunity. Annu. Rev. Anim. Biosci. 2, 259–283.

Boehm, T., Hess, I., ja Swann, J.B. (2012). Evolution of lymphoid tissues. Trends Immunol. 33, 315–321.

Cosway, E.J., Lucas, B., James, K.D., Parnell, S.M., Gaspar, M.C., White, A.J., Tumanov, A. V, Jenkinson, W.E., ja Anderson, G. (2017). Redefining thymus medulla specialization for central tolerance. J. Exp. Med.

Derbinski, J., Schulte, A., Kyewski, B., ja Klein, L. (2001). Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. J. Immunol. 2, 1032–1039.

Douagi, I., Andre, I., Ferraz, J.C., ja Cumano, A. (2000). Characterization of T cell precursor

activity in the murine fetal thymus: Evidence for an input of T cell precursors between days 12 and 14 of gestation. Eur. J. Immunol. 30, 2201–2210.

Le Douarin, N. (1973). A biological cell labeling technique and its use in experimental embryology. Dev. Biol. 30, 217–222.

Le Douarin, N.M., ja Jotereau, F. V (1975). Tracing of cells of the avian thymus through embryonic life in interspecific chimeras. J. Exp. Med. 142, 17–40.

Fan, Y., Rudert, W.A., Grupillo, M., He, J., Sisino, G., ja Trucco, M. (2009). Thymus-specific deletion of insulin induces autoimmune diabetes. EMBO J. 28, 2812–2824.

Goldschneider, I. (2006). Cyclical mobilization and gated importation of thymocyte progenitors in the adult mouse: Evidence for a thymus-bone marrow feedback loop. Immunol. Rev. 209, 58–75.

Gordon, J., ja Manley, N.R. (2011). Mechanisms of thymus organogenesis and morphogenesis. Development 138, 3865–3878.

Grapin-Botton, A., ja Constam, D. (2007). Evolution of the mechanisms and molecular control of endoderm formation. Mech. Dev. 124, 253–278.

Gray, D., Abramson, J., Benoist, C., ja Mathis, D. (2007). Proliferative arrest and rapid turnover of thymic epithelial cells expressing Aire. J. Exp. Med. 204, 2521–2528.

Gray, D.H.D., Ueno, T., Chidgey, A.P., Malin, M., Goldberg, G.L., Takahama, Y., ja Boyd, R.L. (2005). Controlling the thymic microenvironment. Curr. Opin. Immunol. 17, 137–143.

Hikosaka, Y., Nitta, T., Ohigashi, I., Yano, K., Ishimaru, N., Hayashi, Y., Matsumoto, M., Matsuo, K., Penninger, J.M., Takayanagi, H., et al. (2008). The Cytokine RANKL Produced by Positively Selected Thymocytes Fosters Medullary Thymic Epithelial Cells that Express Autoimmune Regulator. Immunity 29, 438–450.

Hsieh, C.S., Lee, H.M., ja Lio, C.W.J. (2012). Selection of regulatory T cells in the thymus. Nat. Rev. Immunol. 12, 157–167.

Josefowicz, S.Z., Lu, L., ja Rudensky, A.Y. (2012). Regulatory T Cells : Mechanisms of Differentiation and Function. Annu. Rev. Immunol.

Kitagawa, Y., ja Sakaguchi, S. (2017). Molecular control of regulatory T cell development and function. Curr. Opin. Immunol. 49, 64–70.

Klein, L., Kyewski, B., Allen, P.M., ja Hogquist, K.A. (2014). Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see and don't see. Nat. Rev. Immunol. 14, 377–391.

Kondo, K., Takada, K., ja Takahama, Y. (2017). Antigen processing and presentation in the thymus: implications for T cell repertoire selection. Curr. Opin. Immunol. 46, 53–57.

Li, Z., Li, D., Tsun, A., ja Li, B. (2015). FOXP3+ regulatory T cells and their functional regulation. Cell. Mol. Immunol. 12, 558–565.

Liu, C., Ueno, T., Kuse, S., Saito, F., Nitta, T., Piali, L., Nakano, H., Kakiuchi, T., Lipp, M., Hollander, G.A., et al. (2004). Role of CCL21 in recruitment of T precursor cells to fetal thymus. Blood 105, 31–39.

Liu, C., Ueno, T., Kuse, S., Saito, F., Nitta, T., Piali, L., Nakano, H., Kakiuchi, T., Lipp, M., Hollander, G.A., et al. (2005). The Role of CCL21 in recruitment of T-precursor cells to fetal thymus. Blood 105, 31–39.

Liu, Z., Yu, S., ja Manley, N.R. (2007). Gcm2 is required for the differentiation and survival of parathyroid precursor cells in the parathyroid/thymus primordia. Dev. Biol. 305, 333–346.

Lucas, B., Mccarthy, N.I., Baik, S., Cosway, E., James, K.D., Parnell, S.M., White, A.J., Jenkinson, W.E., ja Anderson, G. (2016). Control of the thymic medulla and its influence on αβT-cell development. Immunol. Rev. 271, 23–37.

Misslitz, A., Pabst, O., Hintzen, G., Ohl, L., Kremmer, E., Petrie, H.T., ja Förster, R. (2004). Thymic T Cell Development and Progenitor Localization Depend on CCR7. J. Exp. Med. 200.

Morikawa, H., Ohkura, N., Vandenbon, A., Itoh, M., Nagao-Sato, S., Kawaji, H., Lassmann, T., Carninci, P., Hayashizaki, Y., Forrest, A.R.R., et al. (2014). Differential roles of epigenetic changes and Foxp3 expression in regulatory T cell-specific transcriptional regulation. Proc. Natl. Acad. Sci. 111, 5289–5294.

Plotkin, J., Prockop, S.E., Lepique, A., ja Petrie, H.T. (2003). Critical Role for CXCR4 Signaling

in Progenitor Localization and T Cell Differentiation in the Postnatal Thymus. J. Immunol. 171, 4521–4527.

Rossi, S.W., Kim, M.-Y., Leibbrandt, A., Parnell, S.M., Jenkinson, W.E., Glanville, S.H., McConnell, F.M., Scott, H.S., Penninger, J.M., Jenkinson, E.J., et al. (2007). RANK signals from CD4 $^{+}$ 3 $^{-}$ inducer cells regulate development of Aire-expressing epithelial cells in the thymic medulla. J. Exp. Med. 204, 1267–1272.

Sakaguchi, S. (2005). Naturally arising Foxp3-expressing CD25+ CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. Nat. Immunol. 6, 345–352.

Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T., ja Ono, M. (2008). Regulatory T Cells and Immune Tolerance. Cell 133, 775–787.

Samstein, R.M., Arvey, A., Josefowicz, S.Z., Peng, X., Sandstrom, R., Neph, S., Sabo, P., Kim, J.M., Liao, W., Li, M.O., et al. (2012). Foxp3 exploits a preexistent enhancer landscape for regulatory T cell lineage specification. 151, 153–166.

Shinkai, Y., Rathbun, G., Oltz, E.M., Stewart, V., Mendelsohn, M., Charron, J., Datta, M., Young, F., Stall, A.M., ja Alt, F.W. (1992). RAG-2-Deficient Mice Lack Mature Lymphocytes Owing to Inability to Initiate V (D) J Rearrangement. Cell 68, 855–867.

Takaba, H., ja Takayanagi, H. (2017). The Mechanisms of T Cell Selection in the Thymus. Trends Immunol. 38, 805–816.

Takaba, H., Morishita, Y., Tomofuji, Y., Danks, L., Nitta, T., Komatsu, N., Kodama, T., ja Takayanagi, H. (2015). Fezf2 Orchestrates a Thymic Program of Self-Antigen Expression for Immune Tolerance. Cell 163, 975–987.

Takahama, Y. (2006). Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. Nat. Rev. Immunol. 6.

Weist, B.M., Kurd, N., Boussier, J., Chan, S.W., ja Robey, E.A. (2015). Thymic regulatory T cell niche size is dictated by limiting interleukin 2 from antigen-bearing dendritic cells and feedback competition. 16, 635–641.

Xing, Y., ja Hogquist, K.A. (2012). T-Cell Tolerance : Central and Peripheral. Cold Spring Harb. Persepctives Biol. 1–16.

Kasutatud veebiaadressid

- https://www.genscript.com/self-tolerance.html - vaadatud ja kasutatud 14.05.2018

Lihtlitsents

Mina, Kerli Reintamm,

(sünnikuupäev 05.09.1996)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Regulatoorse T-raku areng hiire tüümuse organkultuuris“, mille juhendajad on Rudolf Bichele ja Sulev Kuuse,

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

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

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

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

Tartus, 28.05.2018

Tänusõnad

Soovin tänada oma juhendajat Rudolf Bichelet suurepärase juhendamise, suure vastutulelikkuse ning heade nõuannete eest töö kirjutamisel. Samuti soovin tänada Kai Kisandit abi eest voolutsütomeetria tulemuste vormistamisel. Lisaks lähevad tänusõnad professor Pärt Petersonile ning meeldivatele laborikaaslastele Tartu Ülikooli bio- ja siirdemeditsiini instituudi molekulaarpatoloogia uurimisrühmast.