

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
RAKUBIOLOOGIA ÕPPETOOL

TARTU ÜLIKOOL
ARSTITEADUSKOND
BIO- JA SIIRDEMEDITSIINI INSTITUUT
MOLEKULAARPATOLOGIA UURIMISRÜHM

Karin Kõnd

Konserveerunud 5' reguleeriva ala mõju *AIRE* geeni ekspressioonile

Magistritöö

Juhendajad: Mario Saare, MSc

Arnold Kristjuhan, PhD

Tartu 2013

Sisukord

Lühendid:.....	4
1. Sissejuhatus:.....	6
2. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
2.1. Autoimmuunhaigused.....	8
2.2. APECED.....	8
2.3. AIRE	9
2.4. NF- κ B signaalirajad.....	11
3. TÖÖ EESMÄRGID	14
4. MATERJAL JA METOODIKA	15
4.1.1. Plasmiidid	15
4.1.2. Transformatsioon.....	15
4.1.3. Plasmidse DNA puhastamine	16
4.2. Koekultuur	16
4.2.1. Eukarüootsete HEK293 ja HeLa rakuliinide kasvatamine	16
4.2.2. Hiire embrüonaalsete tüvirakkude kasvatamine.....	16
4.2.3. Transfektsioon	17
4.2.4. TNF α stimulatsioon	17
4.2.5. Lutsiferaasi aktiivsuse mõõtmine	17
4.2.6. Tuumalüsaatide valmistamine	17
4.2.7. <i>Western blot</i> analüüs.....	18
4.3. Elektroforeetilise liikuvuse nihke analüüs (EMSA- <i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>) 18	
4.3.1. Oligonukleotiidide ettevalmistamine EMSA-ks:.....	18
4.3.2. EMSA seondumisreaktsioon ja geelelektroforees	19
4.4. Totaalse RNA eraldamine.....	20
4.5. cDNA süntees	21
4.6. q-RT-PCR (kvantitatiivne pöördtranskriptaas polümeraasi ahelreaktsioon).....	21
4.7. DNA järjestuse joondamine ja DNA motiiviotsingud	22
5. TULEMUSED.....	23
5.1.1. <i>AIRE</i> geenist 5' suunas asuva konserveerunud mittekodeeriva järjestuse kirjeldus	

5.1.2. Konserveerunud ala mõju uurimine <i>Aire</i> geeni ekspressioole hiire embrüonaalsetes tüvirakkudes kvantitatiivse polümeraasi pöördtranskriptaasi ahelreaktsiooniga (q-RT-PCR).....	24
5.2. Elektroforeetilise liikuvuse nihke analüüs.	26
5.3. Konserveerunud NF-κB järjestuse mõju geeniekspressioonile lutsiferaasi reportersüsteemis	28
6. ARUTELU	31
7. SUMMARY	34
Kasutatud kirjandus	35
TÄNUAVALDUSED.....	39

Lühendid:

AIRE - autoimmuunsuse regulaator, *autoimmune regulator*
ALPS - *autoimmune lymphoproliferative syndrome*
APECED – autoimmuunne polüendokrinopaatia ektodermaalne kandidoosi düstroofia, *autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy*
CARD – CARD domeen, *caspase recruitment domain*
CBP – CREB seoseline valk, *CREB binding protein*
CD40L – differentseerumise klaster 40 ligand, *cluster of differentiation 40*
cDNA – komplementaarne DNA, *complementary DNA*
CIAP – *calf intestinal alkaline phosphatase*
CREB - *cAMP response element*
DMEM – rakukultuuris kasutatav sööde, *Dulbecco`s Modified Eagle Medium*
DTT – ditiotreitool, *dithiothreitol*
EMSA - Elektroforeetilise liikuvuse nihke analüüs, *Electrophoretic Mobility Shift Assay*
ES – embrüonaalsed tüvirakud, *embryonic stem-cells*
ESM – embrüonaalsete tüvirakkude sööde
FBS – veise looteserum, *Fetal Bovine Serum*
GALT - soolestikuga seotud lümfoidne kude, *gut associated lymphoid tissue*
HSR – homogeenelt värvuv regioon, *homogenously stained region*
IL1 – interleukiin 1
IκB – kapa B inhibiitor, *inhibitor of kappa B*
IKK – IκB kinaasid,
IPEX – *Immunoregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked syndrome*
KO – *knock out*
LB – Lurian-Bertani
LT-β – lümfotoksiin *beeta*
MAPK – mitogeneeni poõß aktiveeritud valgu kinaas, *mitogen-activated protein kinase*
MHC – suur koesobivuskompleks, *major histocompatibility complex*
mTEC – medullaarsed tüümuse epiteelirakud, *medullary thymic epithelial cell*
NEMO – *NF-κB essential modulation*
NF-κB – tuumafaktor kapa B, *Nuclear factor kappa B*
NIK - tuumafaktor kapa B indutseeriv kinaas, *NF-kB inducing kinase*
NLS – tuuma lokalisatsiooni signaal, *nuclear localization signal*
PHD –taime homeodomeen, *plant homeodomain*

PML – promüelotsüütilise leukeemia valk, *promyelocytic leukemia protein*

PRR – proliinirikas regioon, *proline rich region*

qRT-PCR – kvantitatiivne pöördtranskriptaasi polümeraasi ahelreaktsioon, *quantitative polymerase chain reaction*

RANK – tuuma faktor kapp B retseptori aktivaator, *Receptor activator of nuclear factor kappa B*

RANKL - tuuma faktor kapp B retseptori aktivaatoriga seonduv ligand, *Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand*

RHD – Rel homologia domeen,

SAND - Sp100, AIRE, NucP41/75, DEAF-1

TLL - *toll-like receptor*

TNF – tuumori nekroosifaktor, *tumor necrosis factor*

TNFR – tuumori nekroosi faktori retseptor, *tumor necrosis factor receptor*

TRAF 3 – TNF retseptoriga seonduv faktor, *TNF receptor associated factor*

WT- metsiktüüpi, *wild-type*

1. Sissejuhatus:

Immuunsüsteemi peamiseks funktsiooniks on kaitsta organismi patogeenide eest. Häired immuunsüsteemi regulatsioonis viivad erinevate haiguste tekkimiseni. Immuunpuudulikkuse korral on immuunsüsteemil raskusi organismi tunginud võõrorganismide kahjutuks teha. Juhul kui organism ei suuda tuvastada enda rakke ja kudesid võõrorganismide hulgast, hävitatakse kas osaliselt või täielikult ka enda kude ning kujuneb välja autoimmuunsus. Sellega kaaneb ka organi/koe funktsiooni kadu. Autoimmuunhaiguste tekkepõhjuste leidmine on komplitseeritud kuna enamasti on haiguse väljakujunemisel mitmeid tegureid/põhjuseid. Seni üheks raskeks monogeenseks autoimmuunhaiguseks on APECED, mida põhjustavad mutatsioonid *AIRE* geenis.

Käesoleva töö kirjanduse osas antakse ülevaade seda rasket autoimmuunhaigust põhjustavast geenist *AIRE* ja tema valgu struktuurist ja funktsioonist. Samuti kirjeldatakse töös geeniekspressiooni regulatsiooni NF- κ B raja kaudu ja selles rajas osalevaid Rel perekonna valke

Eksperimentaalses osa eesmärgiks oli selgitada *AIRE* geeniekspressiooni regulatsiooni ja seda täpsemalt NF- κ B raja vahendusel erinevate katsesüsteemidega.

2. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

Immunsüsteem koosneb erinevatest organitest ja kudedest mida on võimalik jaotada tinglikult funktsionaalsete erinevuste põhjal kahte rühma: primaarsed ja sekundaarsed lümfoidsed organid. Primaarsete lümfoidsete organite hulka kuuluvad tüümus ja luuüdi ning sekundaarsete hulka põrn ja lümfisõlmed. Primaarsed lümfoidsed organid võimaldavad õiget keskkonda lümfotsüütide arenguks, sekundaarsetes seevastu presenteerivad antigeene lümfotsüütidele

Immuunsust on võimalik jaotada kahte alamklassi: kaasasündinud ehk natiivne ja omandatud ehk adaptiivne immuunsus. Kaasasündinud immuunvastus hõlmab anatoomilisi, füsioloogilisi, endotsüütilisi ja fagotsüütilisi barjääre, ning on olemuselt kõige kiirem reaktsioon "võõrorganismi" eest, kuid puudusena ei suudeta kõiki haigustekitajaid ära tunda. Juhul kui sellised mehhanismid ei ole piisavad, on organismil võime võidelda sissetunginud patogeenidega omandatud immuunvastuse abil. Omandatud immuunvastus funktsioneerib spetsiifilisemalt, mida vahendavad lümfotsüüdid, mis on võimelised ära tundma erinevaid patogeene. Erinevalt kaasasündinud immuunsusest, hõlmab adaptiivne immuunsus nelja kriteeriumit: antigeeni spetsiifilisus, varieeruvus, immunoloogiline mälu ja oma/võõra äratundmine. Immuunsüsteemi kontrollmehhanismid võivad osutada vigaseks või ebapiisavaks, et ära tunda võõrast organismi (immuunpuudulikkus), või toimub liigne immuunvastuse vahendamine T rakkude poolt ja hävitatakse lisaks võõrorganismile ka osa omast (autoimmuunhaiguste tekkemehhanism) (Abbas ja Lichtman, 2012).

Immunoloogiliseks tolerantsuseks nimetatakse seisundit kus organism ei reageeri spetsiifilistele antigeenidele, eeskätt organismist endast pärit molekulidele. Tolerantsuse puudus kehaomaste antigeenide suhtes aga viib autoimmuunvastuse tekkimiseni, mille tulemusena rakud ja koed kahjustuvad ning lõpuks avaldub autoimmuunhaigus. Normaalse immuunvastuse korral immunogeenne antigeen stimuleerib antigeenispetsiifiliste lümfotsüütide proliferatsiooni ja diferentseerumist. Eristatakse kahte tüüpi tolerantsust: tsentraalset ja perifeerset. Tsentraalne tolerantsus on seotud varajaste T-rakkudega, nende areng ja selektsioon toimub tüümuses, kus deleteeritakse autoreaktiivsed lümfotsüüdid enne perifeeriasse jõudmist. Tüümus on üks tsentraalsetest lümfoidorganitest omandatud immuunsusüsteemis, kus toimub T-lümfotsüütide areng ja küpsemine. Perifeerne tolerantsus aga areneb väljaspool tüümust ja kontrollib autoreaktiivseid T-rakke, mida pole tsentraalse tolerantsuse käigus tüümuses elimineeritud (Mueller 2010). Antigeeni presenteerivate rakkude (APC) ja lümfotsüütide vahelised seosed on tähtsaimad tolerantsi tekkimise jaoks, mis leiavad aset nii tüümuses (tsentraalne tolerants) kui perifeersetes lümfi kudedes (perifeerne tolerantsus) (Kyewski and Klein 2006).

2.1. Autoimmuunhaigused

Autoimmuunsus on seisund, mille puhul organism ei suuda tuvastada "enda" kudesid ja reageerib seejuures enda rakkude ja kudede vastu. Autoimmuunsusust on seostatud mitmete haigustega, mis võivad olla nii organspetsiifilised kui ka hõlmata korraga paljusid organsüsteeme. Kõige levinumateks organspetsiifilisteks haigusteks on Hashimoto türeoidiit ja Addisoni tõbi. Esimese puhul on sihtmärk organiks kilpnääre ja teise puhul on tegemist neerupealiste puudulikkusega.

Autoimmuunhaigused on jaotatud vastavalt nende geneetilistele taustadele monogeenseteks ja polügeenseteks haigusteks. Nende haiguste molekulaarne mehhanism ja kujunemine omab olulist rolli haiguste ravi leidmisel. Et paremini aru saada autoimmuunhaiguste välja kujunemisest, on kergem uurida monogeenseid autoimmuunhaiguseid, kuna polügeensete haiguste uurimine on raskendatud mitme geeni mõjust haigusele. Autoimmuunhaiguste uurimise teeb samuti keeruliseks nende võimalik koosavaldumine. Ühel indiviidil võib esineda rohkem kui üks haigus. Üheks seni uuritud autoimmuunhaiguseks on APECED.

2.2. APECED

Monogeensete autoimmuunhaiguste hulka kuuluvad erinevad autoimmuunsed polüglandulaarsed sündroomid (IPEX, ALPS, APECED). Need hõlmavad endas erinevaid haigusi ja erinevad üksteisest immunoloogiliste mehhanismide poolest. Nende hulka kuuluvad nii endokriinsed kui ka mitte-endokriinsed autoimmuunhaigused.

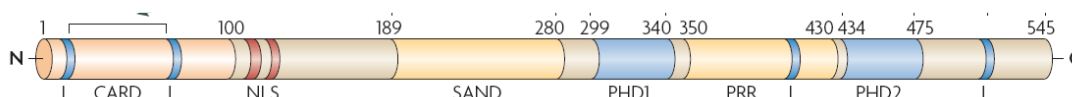
APECED (*Autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy*) on põhjustatud mutatsioonist *AIRE* (autoimmune regulator) geenis, mis viib tsentraalse tolerantsi hääbumiseni (Peterson and Peltonen 2005). APECED on haruldane autosomaalne retsessiivne haigus, mis avaldub tavaliselt juba varajases lapsepõlves. Haigust diagnoositakse juhul kui ilmnevad vähemalt kaks põhilist haigusnähtu kolmest: naha ja limaskestade kandidoos, hüoparatiireoidism või Addisoni haigus. Esmalt ilmnevad naha ja limaskestade kandidoosi sümptomid. Järgemööda lisandub haiguspildile Addisoni haiguse poolt põhjustatud väsimus ja madal vererõhk. Viimasena areneb välja hüoparatiireoidismi tõttu hüpokaltseemia (Michels and Gottlieb 2010). Samuti esinevad patsientidel nii organspetsiifilised (Reimand, Perheentupa et al. 2008) kui ka tsütokiinide vastased autoantikehad (Kärner, Meager et al. 2013) (Kisand, Bøe Wolff et al. 2010, Kisand and Peterson 2011). APECED-i põhjustab 21. kromosoomi pikas õlas paiknev muteerunud *AIRE* geen, (Aaltonen, Björnses et al. 1994) peamiselt arginiini asendus 257. positsioonis (R257X) ja 139. positsioonis (R139X). Selline mutatsioon esineb suuremalt

jaolt Soome populatsioonis (Nagamine, Peterson et al. 1997) (Bjorses, Halonen et al. 2000). APECED esineb kõige rohkem kolmes üksteisest isoleeritud populatsioonis on haruldane haigus, mis esineb kõige rohkem kolmes üksteisest isoleeritud populatsioonis, esinemissagedustega 1/25000 soomlaste, 1/9000 iraani juutide ja 1/14500 sardiinlaste hulgas (Ahonen, Myllärniemi et al. 1990).

2.3. AIRE

Inimese *AIRE* geen kodeerib 545 aminohappe pikkust valku molekulmassiga 58 kDa. Inimese *AIRE* geen on jaotatud 14 eksoniks 13 kb ulatuses. Hiire *Aire* kodeerib 522 aminohappe pikkust valku. Inimese ja hiire *Aire* valgud on 71% ulatuses identsed (Murumägi, Vähämurto et al. 2003).

AIRE omab unikaalseid transkriptsioonifaktorite ja kromatiiniga seonduvate valkudega sarnaseid domeene (Joonis 1).



Joonis 1. Aire valgu funktsionaalsed domeenid. Tuumaretseptoritega seonduv LXXLL motiivid, CARD (*caspase recruitment domain*), NLS (*nuclear localization signal*), SAND (Sp100, AIRE, NucP41/75, DEAF-1), PHD (*Plant homeodomain*), PRR (*proline rich region*) (Peterson, Org et al. 2008).

Kõige rohkem sarnaneb Sp100 perekonna valkudele (Bloch, Nakajima et al. 2000). Kolm Sp100 perekonnaga sarnast domeeni on HSR/CARD (*homogeneously stained region/Caspase recruitment domain*), SAND (Sp100, Aire-1, NucP41/75 ja DEAF-1) ja PHD (*Plant homeodomain*) domeen. SAND domeeni funktsiooniks on siduda DNA-d (Gibson, Ramu et al. 1998), kuigi AIRE SAND domeeni puhul ei ole seda näidatud. HSR/CARD domeen moodustab valgu N-terminaalses regioonis 6 heeliksilise struktuuri, mis on väga sarnane apoptoosiradade valkude CARD domeeniga ja osaleb AIRE oligomerisatsioonil (Sanchez-Pulido, Valencia et al. 2007). See domeen vahendab ka muid valk-valk interaktsioone ja lokaliseeritakse tuumakehakestesse. Arvatakse, et CARD domeen interakteerub PIAS-1-ga (*protein inhibitor of activated STAT1*). PIAS-1 seondumine p65 valgule inhibeerib NF-κB vahendatud geeni aktivatsiooni. (Liu, Yang et al. 2005). Kahekomponentne NLS (*nuclear localization signal*) paikneb 110-114 ja 131-133 positsioonis, millest vaid viimane osa funktsioneerib tuumalokalisatsioonisignaalina (Ilmarinen, Eskelin et al. 2005). C-terminuses paikneb kaks PHD tsinksõrme domeeni, mis vastutavad valk-valk interaktsioonide eest. PHD tsinksõrmed on umbes 60 aminohapest koosnevad domeenid, mis seovad kahte tsinkiooni, ning seda

iseloomustab C4HC3 struktuur (4 tsüsteiini, 1 histidiin, 3 tsüsteiini). Viimased avastused kinnitavad, et PHD tsinksõrmed seonduvad kas modifitseeritud või modifitseerimata histoon H3-ga (Org, Chignola et al. 2008). PHD1 tsinksõrmel arvatakse olevat ubikvitiini E3 ligaasi aktiivsus (Uchida, Hatakeyama et al. 2004). Lisaks eelnimetatud domeenidele, on AIRE-1 neli tuumaretseptoritega seonduvat LXXLL motiivi sarnaselt teistele transkriptsiooni koaktivaatorvalkudele nagu CBP/p300 (*CREB binding protein/p300*) ja SRC1 (*steroid receptor coactivator 1*) (Savkur and Burris 2004). Sarnaselt teistele transkriptsiooni aktiveerivatele valkudele omab ka AIRE proliinirikast piirkonda (PRR), mis on vajalik transkriptsiooni aktiveerimiseks ja apoptoosi käivitamiseks (Helton, Zhang et al. 2008).

AIRE ekspresseerub põhiliselt tuumuse medullaarse epiteeli rakkudes (mTEC), vähem lümfisõlmedes, põrnas ja loote maksas (Nagamine, Peterson et al. 1997, Björnses, Aaltonen et al. 1998, Heino, Peterson et al. 1999). On näidatud, et AIRE reguleerib niinimetatud avatud geeniekspressiooni tuumuse medullaarsetes epiteelirakkudes, mille käigus ekspresseeritakse geeniprodukte, mis on iseloomulikud spetsiifilistele rakutüüpidele väljaspool tuumust. On näidatud, et Aire-puudulikel hiirtel, kelle tuumuse medullaarsed epiteelirakud ei ekspresseeri koetsiifilisi valke, esineb autoimmuunne fenotüüp, kuna negatiivsest selektsioonist pääsenud autoreaktiivsed tümotsüüdid ründavad organismi (Anderson 2002). Hiire Aire ekspressioon tuumuses sõltub hematopoeetilist päritolu LTi (*lymphoid tissue inducer*) rakkudest, kes reageerivad RANKL (*receptor activator of nuclear factor kappa B ligand*) abil RANK retseptoriga mTEC-de pinnal (Rossi, Kim et al. 2007). Viimaste andmete kohaselt on leitud ka AIRE ekspressiooni inimese perifeersetes lümfoidkudedes, mandlites ja soolestikuga seotud lümfoidsest koest (*GALT*), kus sarnaselt tuumuse medullaarsetele epiteelirakkudele AIRE reguleerib koetsiifiliste geenide avaldumist, mõjutades perifeerse immuuntolerantsuse olemasolu (Poliani, Kisand et al. 2010) (Ballarini and Lee-Kirsch 2007) (Gardner, Devoss et al. 2008). Teadaolevalt on leitud, et embrüonaalsed tüvirakud on samuti võimelised AIREt ekspresseerima, kus arvatakse AIRE-1 olevat roll pluripotentsuse säilitajana (Nishikawa, Hirota et al. 2010).

Rakutuumas paikneb AIRE tuumakehakestes, mis sarnanevad PML (*promyelocytic leukaemia protein*) tuumakehakestele, kuid samades rakkudes ekspresseerudes need valgud ei kolokaliseeru (Björnses, Peltö-Huikko et al. 1999, Björnses, Halonen et al. 2000). Põhjused, miks need valgud moodustavad tuumakehakesi, on senini lõpuni välja selgitamata. Vähemalt PML tuumakehakeste puhul on täheldatud, et neist sõltub rakkude apoptoos, proliferatsioon ja

genoomne stabiilsus (Borden 2002). AIRE tuumakehade puhul on näidatud, et nende mõõtmel suurenevad juhul, kui proteasoom on inhibeeritud (Akiyoshi, Hatakeyama et al. 2004), lubades oletada, et AIRE tuumakehad võivad toimida kui hoidlad, mis vabastavad või akumulerevad valke vastavalt raku vajadustele.

2.4. NF- κ B signaalirajad

Tuumafaktor kapa B (NF- κ B) omab kesksel rollil mitmetes immunoloogilistes reaktsioonides ja reguleerib rakkude jagunemist, eluiga ja onkogeensust. Lisaks reguleerib mitmete immuunsüsteemi komponentide ekspressiooni, mis omakorda reguleerivad spetsiifilisi immuunvastuseid (kemokiinid, MHC, interferoonid ja tsütokiinid (näiteks IL-2)) (Li and Verma 2002).

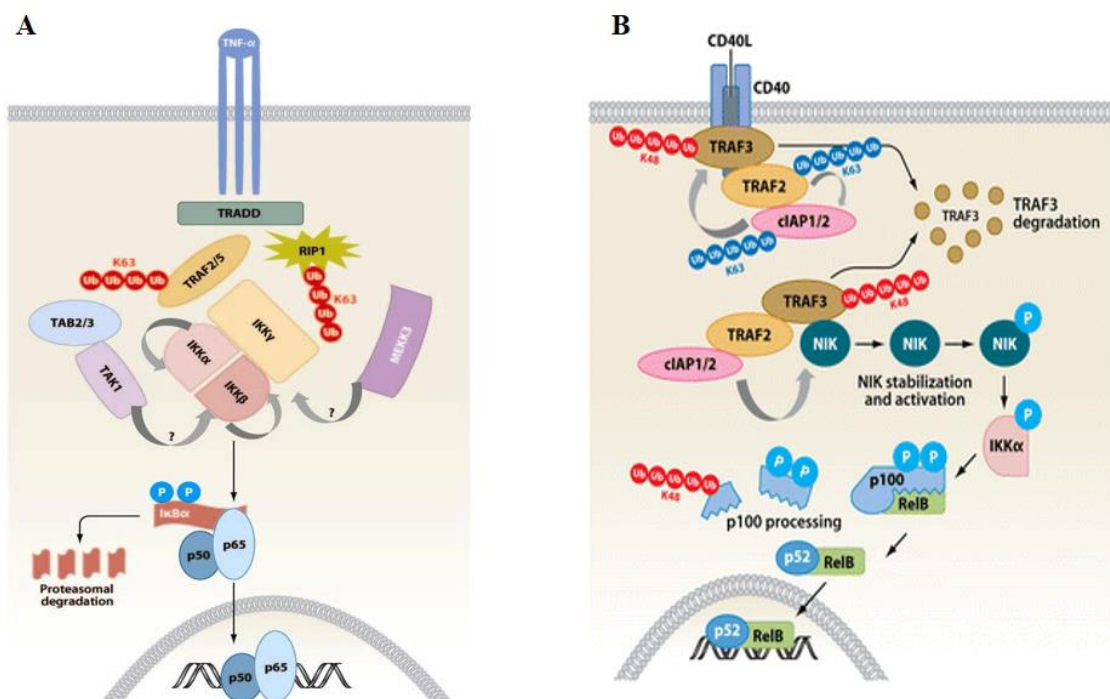
NF- κ B on valkude kompleks, mis on võimeline transkriptsiooni aktiveerima. Funktsionaalne NF κ B transkriptsioonifaktor on dimeer kas identsetest või struktuurselt homoloogsetest valkudest molekulmassiga 50-70 kDa (Ghosh, May et al. 1998). Kokku koosneb imetajate NF- κ B perekond viiest liikmest: NF- κ B1 (p105/50), NF- κ B2 (p100/52), RelA (p65), RelB, c-Rel. (Chen and Ghosh 1999). Rel valkude levinuim dimeerne kompleks on p50-p65 heterodimeer. NF- κ B valgud sarnanevad üksteisega omades N-terminaalset Rel homoloogia domeeni (RHD), mis vastutab dimeriseerumise, DNA-ga seondumise ja tuuma translokatsiooni eest (Hayden and Ghosh 2012). RelA, RelB and c-Rel omavad ka C-terminaalset transkriptsioonilist aktivatsiooni domeeni (TAD) ning seetõttu on võimelised otseselt aktiveerima transkriptsiooni. Rel/NF- κ B transkriptsiooni faktori valgud on konserveerunud äädikakärbsest (*Drosophila melanogaster*) inimeseni (Friedman and Hughes 2002)

On teada, et NF- κ B valgud nagu p50 and p52 võivad käituda transkriptsiooni repressoritena, kuna neil puudub TAD domeen (Hayden and Ghosh 2012). Selle tõttu p50 või p52 homodimerisatsioon tipneb transkriptsiooniliselt inaktiivse tuumakompleksiga. Nad repressivad transkriptsiooni hõivates DNA seondumiskohti või kaasavad geeniekspressiooni vaigistavaid valke nagu histooni deatsetülaasid (Chen and Greene 2004).

Molekulaarsel tasemel vaadatuna on erinevate NF- κ B dimeeride seondumine DNA-ga erinev. Valgu ja DNA seondumise uurimused jaotavad NF- κ B perekonna liikmed kaheks: p50 ja p52 tunnevad ära 5 bp pikkuse poolsaidi 5'-GGGRN-3' ja c-Rel, RelA (p65) ning RelB tunnevad ära 4 bp pikkuse 5'-GGRR-3' poolsaidi (R tähendab A/G ja N kõiki nukleotiide). Need poolsaidid moodustavad konsensus kB saidi 5'-GGGRN(Y)YYCC-3' (Siggers, Chang et al. 2012). On näidatud, et erinevatel valkudel on erinev DNA-ga seondumiskoha motiivi pikkus.

Näiteks on see 9 bp pikkune c-Rel ja RelA homodimeeridel, 10 bp pikkune heterodimeeride korral ning 11 või 12 bp pikkune p50 ja p52 homodimeeridel (Wong, Teixeira et al. 2011).

Põhiliselt on kirjeldatud kahte erinevat NF- κ B rada: p65/p50 kanooniline rada vahendab proinflammatoorseid vastuseid ja RelB/p50 või RelB/p52 mittekanooniline rada reguleerib omandatud immuunsuse protsesse (Joonis 2) (Senftleben, Cao et al. 2001).



Joonis 2. NF κ B signaalsioonirajad. **A.** Kanoonilise raja aktivatsioon TNF- α mõjul. p50/p65 dimeerid paiknevad tsütoplasmas kompleksis I κ B α molekuliga. Raku pinnal oleva retseptori (TNF-R, TLR) tsütoplasmaatilisele domeenile kinnituvad adaptor valgud. Ligandi seostumise tulemusena aktiveerub koheselt IKK kompleks ja seejärel fosforüleerib IKK kompleks I κ B subühiku, mis degradeeritakse proteasoomis. Vabanenud NF- κ B dimeer liigub rakutuuma ja aktiveerib sihtmärk geenid. **B.** Mittekanooniline rada põhineb peamiselt p100/RelB protsessingust B- ja T-rakkude arengus. Mittekanoonilise raja IKK kompleks koosneb ainult I κ k α subühikutest. Retseptori ja ligandi seondumine aktiveerib NIK-i, mis fosforüleerib ja aktiveerib IKK α kompleksi ja lisaks fosforüleerib kaks p100 C-terminaalse domeeni seriini jääki. Lõpptulemusena toimub osaline proteolüüs ja p52/RelB kompleks vabaneb. Joonis on võetud artiklist (Vallabhapurapu and Karin 2009).

Nii kanoonilise kui ka mittekanoonilise raja puhul on peamiseks reguleerivaks üksuseks IKK (I κ B kinaasid), mis koosneb kas IKK α ja/või IKK β subühikutest ja sensoorsest valgust NEMO (*NF- κ B essential modulation*) (Shifera, 2010).

NF- κ B kanoonilise raja aktivatsioon toimub kiirelt erinevate stiimulite nagu TLR (*toll-like receptors*) retseptorite või TNFR-de (*tumor necrosis factor receptors*) ligandide vahendusel (Joonis 2A) (Dempsey, 2003). Raja aktivatsioon sõltub inhibeeriva valguga I κ B degradatsioonist.

I κ B valgud fosforüleeritakse IKK poolt ning seejärel seotakse ubikvitiinligaasi kompleksiga, mis poliubikvitiniseerib I κ B, määrates sellega valgu lagundamisele. Seejärel on võimalik NF- κ B dimeeril rakutuuma siseneda ja aktiveerida sihtmärkgeenide ekspressioon. IKK kompleks peab omakorda olema eelnevalt aktiveeritud MAP kinaaside poolt (Vallabhapurapu and Karin 2009). NF- κ B kanoonilist rada tuleb aga reguleerida, kuna kontrollimatu NF- κ B aktivatsioon võib viia septilise šokini, raku hüperplaasiani või isegi vähi tekkeni. Põletikku reguleerivate geenide transkriptsiooni inhibitsiooniks on I κ B-de süntees, mis sisenevad rakutuuma ja seonduvad NF- κ B dimeeridega ja transpordivad need tagasi tsütoplasmasse (Perkins, 2006)

NF- κ B mitte-kanoonilise raja aktiveerivad mitte-põletikulised stimulandid nagu on LT- β (lümfootoksiin β), CD40L, RANKL (*Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand*) (Joonis 2B) (Weih and Caamaño 2003). Mitte-kanooniline NF- κ B rada omab olulist rolli primaarsete ja sekundaarsete lümfoidsete organite arenemisel vajaminevate geenide ekspressioonil ja raja aktivatsioon sõltub NIK-ist (NF- κ B indutseeriv kinaas), mis on alternatiivse raja kontrollpunkt ja IKK α -st (Ghosh, 1998). NF- κ B alternatiivse raja regulatsioon on korrelatsioonis p100 valgu protsessinguga. NIK reguleerib osaliselt NF- κ B alternatiivset rada ja NIK-i aktiivsust on võimalik kontrollida valgu tasemel. TRAF3 on võimeline indutseerima NIK-i degradatsiooni proteasoomis (Razani, Reichardt et al. 2011).

Viimase aja tulemused viitavad, et NF- κ B alternatiivne rada võib reguleerida tsentraalset tolerantsust ning on vajalik AIRE geeni transkriptsiooni regulatsioonis ning mõjutab Airest sõltuvate koespetsiifiliste geenide avatud ekspressiooni (Zhu, 2006). (Liston, Lesage et al. 2003).

3. TÖÖ EESMÄRGID

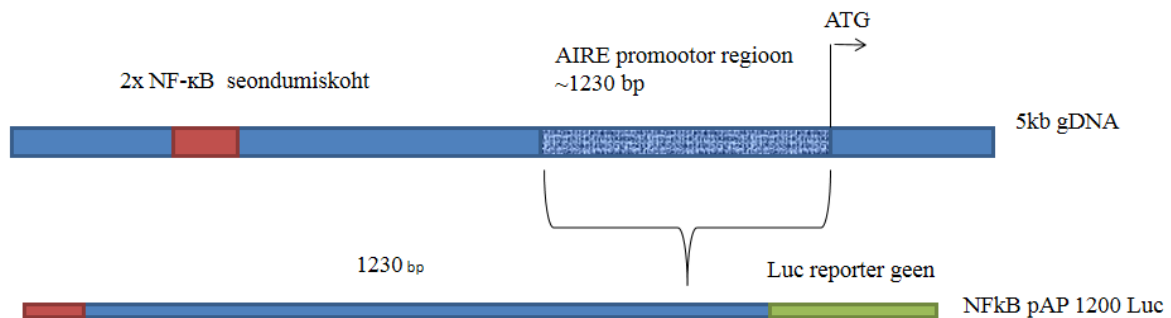
Käesolev uurimistöö on osa laiemast projektist, mille eesmärgiks on analüüsida *AIRE* geeni ekspressiooni mõjutavaid tegureid. *AIRE* geeni ümbritsevate genoomsete alade joondamisel on leitud 5' otsast ~3200 aluspaari ülesvoolu paiknev hästi konserveerunud järjestus, mis sisaldab kahte NF- κ B faktorite seondumismotiivi ning millel võib olla regulatoorne roll. Selle järjestuse funktsiooni leidmiseks on püstitatud järgmised eesmärgid:

- analüüsida *Aire* geeni ekspressiooni hiire embrüonaalsetes tüvirakkudes, milles *Aire* geenist 5' suunas olev konserveerunud ala on ühe konserveerunud järjestuse koopiaga
- leida konserveerunud alaga seonduvaid transkriptsioonifaktoreid, eeskätt NF- κ B perekonnast
- uurida, kas transkriptsioonifaktorite seondumine konserveerunud alaga mõjutab geeniekspressiooni *in vitro* süsteemis

4. MATERJAL JA METOODIKA

4.1.1. Plasmiidid

NF- κ B aktivatsiooni uurimiseks klooreriti inimese AIRE geeni promotoralasse reporterplasmidi promootori ette NF- κ B järjestust sisaldav seondumisjärjestus. Reporterplasmiidid on kingitus Astrid Murumäelt (Helsingi Ülikool). Selle tulemusena saadi NF- κ B 1200 Luc plasmiid (Joonis 3) (Kõnd, 2010)



Joonis 3. Genoomse DNA järjestus 5kb ulatuses enne AIRE geeni kodeerivat ala ja töös kasutatud 2 erineva pikkusega promotoregiooni cis konstrukti.

Saadud promotorkonstrukti kasutati edasises lutsiferaasi aktivatsiooni katsetes. Võrdluseks kasutati täispikka 3,2 kb pikkust AIRE regulatoorse ala plasmidi. Negatiivse kontrollina kasutati lutsiferaasi geeni kodeerivat järjestust sisaldavat, kuid ilma regulatoorsete järjestusteta pBL-KS plasmidi (kingitus professor Kalle Sakselalt, Tampere ülikool). Positiivseks kontrolliks oli kolme järjestikust NF- κ B seondumissaiti ja β -interferooni minimaalset promotorit sisaldav 3x κ B Luc (Wahl, Liptay et al. 1998). p50 ja p65 üleekspressiooniks kasutati plasmide pCDNA-p50 ja pCDNA-p65 (kingitus professor Eric Kalkhovenilt, Utrechti ülikool).

4.1.2. Transformatsioon

Reporterkonstruktid transformeeriti *E.coli* XL-1 BLUE kompetentsetesse rakkudesse. Rakke kasvatati 37°C juures 16 tundi karbenitsilliini (50 μ g/ml) sisaldavas LB (Lurian-Bertani) agarsöötmes (10 g/l, pärmiekstrakt 5 g/l, NaCl 10 g/l, agar 15 g/l). Kasvanud kolooniad külvati paljundamiseks ühekaupa 2 ml LB vedelsöötmesse, kuhu oli lisatud karbenitsilliini 50 μ g/ml, ning jäeti loksutile 37°C juurde üleöö kasvama.

4.1.3. Plasmiidse DNA puhastamine

Üleöö kasvanud bakterid tsentrifugeeriti 15 minutit 4500 rpm (Kendro Laboratories). Rakudsademelt eemaldati supernatant ning plasmiidne DNA eraldati NucleoBond PC100 kitiga (Macherey-Nagel) vastavalt tootja protokollile. Saadud DNA lahustati üles 50ul-s vees ning kontsentratsioon mõõdeti NanoDrop 1000 spektrofotomeetriga.

4.2. Koekultuur

4.2.1. Eukarüootsete HEK293 ja HeLa rakuliinide kasvatamine

Lutsiferaasi aktivatsioonikatsetes kasutati eukarüootseid HEK293 (inimese embrüonaalsed neerurakud) ja tuumalüsaatide valmistamisel HeLa (inimese emakakaela vähirakuliin) rakuliini. Rakke kasvatati 1x DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, PAA Laboratories) söötmes, millele oli lisatud 10% inaktiveeritud FBS-i (*Fetal Bovine Serum*, PAA Laboratories) ning streptomütsiini (100 µg/ml) ja penitsilliini (100 U/ml). Rakke kasvatati 10 cm läbimõõduga koekultuuri tassidel (CELLSTAR, Greiner Bio-One GmbH) 37°C kapis 5% CO₂ keskkonnas. Rakkude jagamiseks pesti rakke PBS puhvriga (*phosphate buffered saline*) (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂PO₄, 2 mM KH₂PO₄) ja trüpsineeriti (PAA Laboratories) 2-3 minutit 37°C juures. Trüpsiin inhibeeriti 1x DMEM söötmega.

4.2.2. Hiire embrüonaalsete tüvirakkude kasvatamine

Rakud valmistati ette Tartu Ülikooli Transsgeense tehnoloogia tuumiklaboris. Rakud sulatati ja suspensioon pandi kasvama 6 cm koekultuuri tassile ESM (embrüonaalsete tüvirakkude) söötmes (DMEM (PAA Laboratories), 15% FBS-i (PAA Laboratories), 1% asendamatuid aminohappeid (PAA Laboratories), 1% 100 x penitsilliin-streptomütsiini segu (PAA Laboratories), 1% beeta-merkaptotetanooli ja 0,01% leukeemia inhibiitor faktor LIF (Chemicon)). Peale sulatamist kasvatati rakud konfluentseks ning jaotati rakud 6 cm tassilt 10 cm tassile, mille põhja olid kinnitatud eelnevalt mitomütsiiniga arestitud toiterakud (hiire embrüonaalsed fibroblastid, Millipore Inc). Rakkudel lasti kasvada järgnevat 24 tundi. Seejärel pesti rakke 2 korda PBS-ga ning trüpsiinitati nad tassi küljest lahti üksikute rakkude suspensiooniks. Trüpsiini reaktsiooni blokeeriti 10 ml ESM-ga, ning asetati rakud kümneks minutiks inkubaatorisse. Selle aja jooksul vajuvad toiterakud tassi põhja ning tüvirakud jäävad rakuksuspensiooni. Peale inkubeerimist eemaldati tassilt ettevaatlikult suspensiooni, tõsteti ümber 15 ml tsentrifugeerimis- ja fuugimistubis ja fuugiti rakud põhja (5 minutit 190 g). Seejärel aspireeriti sööde, ning suspendeeriti rakud üles 1 ml Trizol reagentis edasiseks RNA eraldamiseks (vt. peatükk 4.4).

4.2.3. Transfektsioon

DNA transfekkeerimiseks eukarüootsetesse rakkudesse kasutati TurboFect™ *in vitro Transfection Reagent*'i (MBI Fermentas). Rakud jagati 50 000 kaupa 24-kannulisele plaadile ja lasti kinnituda. *Turbofect* reagenti transfektsioonisegu sisaldas 1,05 µg plasmiidset DNA-d (0,5 µg lutsiferaasi reporterkonstrukte, 0,5 µg p50 või p65 ekspresiooniplasmiidi (koekspresiooni jaoks 0,25 µg kumbagi ekspresiooniplasmiidi) ja 0,05 µg pRL-CMV (*Renilla* lutsiferaasi ekspresiooniplasmiidi transfektsiooni sisemiseks kontrolliks). Vahetult enne transfektsiooni pesti rakke PBS-ga ja sööde asendati seerumivaese söötmega (1x DMEM, mis sisaldas 0,5% inaktiveeritud FBS-i ning streptomütsiini 100 µg/ml ja pennitsilliini 100 U/ml segu), kuna FBS-i juuresolek takistab transfekkeerimise efektiivsust. Transfekteeritud rakke inkubeeriti 24 tundi 37°C ja 5% CO₂ juures.

4.2.4. TNFα stimulatsioon

24 tundi peale transfekkeerimist stimuleeriti rakke inimese rekombinantse TNFα-ga (*tumor necrosis factor alpha*) (10 ng/µl, R&D Systems) 6 tundi, et uurida NF-κB raja ja promootorikonstruktsioonide aktiveerimist TNFα poolt. Rakud koguti 1,5 ml reaktsioonituubi ning lüüsi *Cell Culture Lysis Reagent*'iga (Promega).

4.2.5. Lutsiferaasi aktiivsuse mõõtmine

Luminesentsi reaktsiooniks kasutati 20 µl rakulüsaati ja 90 µl *Luciferase Assay Reagent*'i (Promega). *Renilla* lutsiferaasi aktiivsuse mõõtmiseks lisati igale proovile 90 µl Stop and Glo puhvrit (Promega). Saadud tulemust mõõdeti Perkin-Elmer luminomeetriga *Wallac 1420 Victor Multilabel/Plate Reader*.

4.2.6. Tuumalüsaatide valmistamine

Tuumalüsaadid valmistati HeLa rakkudest. Selleks kasvatati rakke 10 cm läbimõõduga koekultuuri tassidel (CELLSTAR®, Greiner Bio-One GmbH) 37°C kapis 5% CO₂ keskkonnas eelpoolmainitud meetodil. Rakud koguti 50 ml tuubi, tsentrifuugiti 300 g ja 4°C juures ja pesti 1ml-s jääkülmas PBS puhvris. Korrati tsentrifuugimist, supernatant aspireeriti ning rakkude mass resuspendeeriti puhvris A (20 mM HEPES (pH 7,9), 1,5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 0,5 mM PMSF, 0,5 DTT) 2/3 rakumassi ruumalas. Seejärel inkubeeriti rakke 15 minutit jääs ja tsentrifuugiti 300 g 5 minutit 4°C juures. Rakutuumade eraldamiseks lõhuti rakumembraanid süstlaga 10 korda läbi 25 G suuruse nõela tõmmates. Seejärel rakususpensioon tsentrifuugiti 3300 g 1 minut ning tsütoplasma fraktsioon aspireeriti, jättes

tuumad rakusademesse. Tuumade lüüsimiseks resuspendeeriti sade puhvris C 2/3 rakumassi ruumalas (20 mM HEPES, 25% glütserool, 1,5 mM MgCl₂, 420 mM NaCl, 0,2 mM EDTA, 0,2 mM PMSF, 1 mM DTT). Lahust inkubeeriti jääl 15-30 minutit aeg-ajalt segades ning seejärel tsentrifuugiti 15 minutit 15 000 g-d 4°C juures. Tuumafraktsioon kanti uude tuubi ning külmutati koheselt vedelas lämmastikus. Valgu kontsentratsioon määrati NanoDrop 1000 spektrofotomeetriga 280 nm lainepikkusel.

4.2.7. Western blot analüüs

Tuuma- ja lutsiferaasi katse lüsaatide proovidele lisati samas mahus 2x Laemmli puhvrit ja kuumutati 3 minutit 95°C juures selleks, et lõhkuda ahelatevahelised disulfiidsillad. Kuumutatud proovid lahutati 8%-lises polüakrüülamiidgeelis 1x SDS PAGE puhvris (25 mM Tris-HCl, 200 mM glütsiin, 0,1% SDS (naatrium dodetsüülsulfaat)) vertikaalsel elektroforeesi aparatuuril 160V juures (Mini-PROTEAN 3 Cell, Bio-Rad). Markerina kasutati Pageruler™ *Prestained Protein Ladder*'it (Thermo Scientific). Valgud kanti Immobilon PVDF filtrile (Sigma-Aldrich) kasutades ülekandepuhvrit (192 mM glütsiin, 24 mM Tris, 20 % metanool) ning *Trans-Blot SD semidry electrophoretic transfer cell* masinat (Bio-Rad) vastavalt valmistaja protokollile Järgnevalt blokeeriti filtrit tundi aega toatemperatuuril 5% lõssi TTBS (100 mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20) lahuses. Seejärel inkubeeriti filtrit p50-vastase primaarse antikehaga (sc-7178X, Santa Cruz Biotechnology) (lahjendus 1:1000) 1 tund toatemperatuuril blokeerimispuhvris (5% lõssi sisaldavas TTBS), pesti 3 x 10 min TTBS puhvriga, inkubeeriti sekundaarse antikehaga toatemperatuuril (*swine α-rabbit-IgG-HRP*, Dako) (lahjendus 1:10000) ja tehti viimane pesuetapp (3 x 10 min TTBS). Visualiseerimiseks inkubeeriti filtrit 4 minutit substraadiga (*ECL Advance Western Blotting Detection Kit*, GE Healthcare) ning luminesents detekteeriti ImageQuant RT-ECL (GE Healthcare) abil.

4.3. Elektroforeetilise liikuvuse nihke analüüs (EMSA-*Electrophoretic Mobility Shift Assay*)

4.3.1. Oligonukleotiidide ettevalmistamine EMSA-ks:

Seondumiseks võeti 20 µl 100µM teineteise suhtes komplementaarseid oligonukleotiide (Tabel 1).

Tabel 1. Töös kasutatud oligonukleotiidid disainiti vastavalt NFκB enhanser järjestusele. Rõhutatud on NF-κB seondumisjärjestus, mis on positiivse kontrolli puhul võetud Promega Gel Shift Assay Systems kiti protokollist (E3292) ja WT järjestuse puhul AIRE regulatoorses piirkonnas asuvast NF-κB järjestuselt. Allajoonitud on muteeritud nukleotiidid.

Nimi (<i>F</i> – forward/ <i>R</i> – reverse)	Järjestus
pos. kntrl <i>F</i>	5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3'
pos. kntrl <i>R</i>	5'-GCCTGGGAAAGTCCCCTCAACT-3'
mut pos kntrl <i>F</i>	5'-AGTTGAGG <u>AA</u> ACTGGCCAGGC-3'
mut pos kntrl <i>R</i>	5'-GCCTGGG <u>CC</u> AGTTT <u>TC</u> CTCAACT-3'
NF-κB sait 1 <i>F</i>	5'-GTGTGGAAAGCCCCACGGC-3'
NF-κB sait 1 <i>R</i>	5'-GCCGTGGGGCTTTCCACAC-3'
NF-κB sait 2 <i>F</i>	5'-ATGGTGGAAAGTCCGAAATT-3'
NF-κB sait 2 <i>R</i>	5'-AATTTCCGACTTTCCACCAT-3'
mut NF-κB sait 1 <i>F</i>	5'-GTGT <u>TTCA</u> AGCCCCACGGC-3'
mut NF-κB sait 1 <i>R</i>	5'-GCCGTGGGGCTT <u>GAA</u> ACAC-3'
mut NF-κB sait 2 <i>F</i>	5'-TGGT <u>TTCA</u> AGTCCGAAATT-3'
mut NF-κB sait 2 <i>R</i>	5'-AATTTCCGACTT <u>GAA</u> ACCAT-3'

Reaktsioonisegusse lisati 1x T4 polinukleotiid kinaas (PNK) puhvrit A (500mM Tris-HCl pH7,6 100mM MgCl₂, 50mM DTT, 1mM spermidine) (Fermentas) ja 0,1M NaCl. Proove kuumutati 95°C juures 5 minutit ja jahutati seejärel aeglaselt toatemperatuurini.

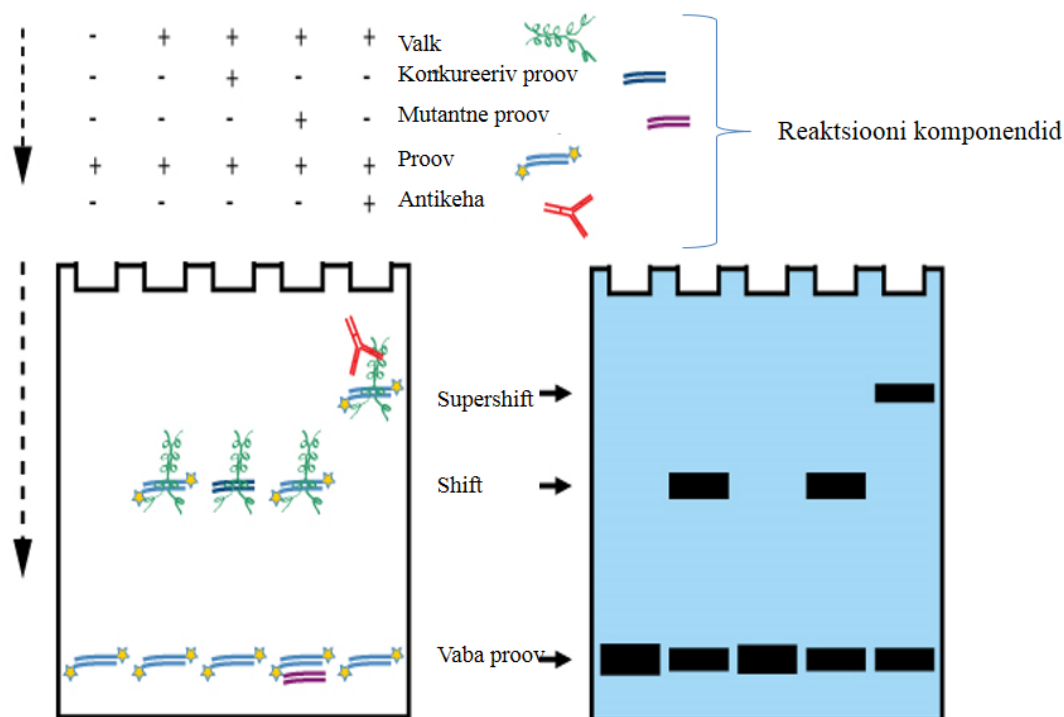
Kaheahelalised oligonukleotiidid märgistati [³²P]dATP-ga, kasutades T4 polinukleotiid kinaasi. Selle jaoks võeti 50 ng kaheahelalist oligot ja lisati 1x T4 PNK puhvrit A, 1U T4 kinaasi (Fermentas) ja [³²P]dATP-d. Reaktsioonimaht viidi veega 10 µl-ni. Proove inkubeeriti 30 minutit 37°C juures.

Märkunud oligonukleotiidid sadestati -20°C juures 150 µl etanoolis, kuhu oli lisatud 1x TE puhvrit ja 1M NH₄Ac-d. Oligonukleotiidid jäeti sadenema üleöö. Järgmisel päeval tsentrifugeeriti neid 4°C juures 20 minutit 9050 g-d, sademelt eemaldati supernatant ja resuspendeeriti 100 µl vees.

4.3.2. EMSA seondumisreaktsioon ja geelelektroforees

EMSA analüüsis kasutatud p50-DNA komplekside moodustamise reaktsioonid teostati 10µl ruumalas. Reaktsioonisegu sisaldas 1x seondumispuhvrit [5mM MgCl₂, 2,5 mM EDTA, 2,5 mM ditiotreitooli (DTT), 125 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10% glütserool]; 5µg TNF α -ga (20 ng/ml) stimuleeritud HeLa tuumalüsaati (vt. peatükk 4.2.6); polü dI-dC (deoksüinosiin-deoksütsütidüülhape 1mg/ml) ja 1µl 20µM oligonukleotiide, mis olid 5' otsast märgistatud kasutades [³²P]dATP-d. Konkureeriva katse korral lisati reaktsioonisegusse kaheahelalisi oligonukleotiide 200 kordses ülehulgas ja *supershifti* korral p50 (H-119) antikeha lõppkontsentratsioon 1µg/µl (Santa Cruz Biotechnology; sc7178 X). Antikehaga inkorporeeritud proove inkubeeriti 1 tunni jooksul jääl ning seejärel lisati juurde vastavad

[$\gamma^{32}\text{P}$]dATP-ga märgistatud oligonukleotiidid ja inkubeeriti veel 30 minutit jääl. Inkubatsiooni lõpus proovid lahutati elektroforeesiga 4°C juures, esmalt pingel 70 V 45 minuti 0,5x TBE puhvris ja seejärel pingel 175 V 2,5 tunni jooksul 5% mittedenatureerivas polüakrüülamiidgeelis. Geeli kuivatati 45 minutit geelikuivatis 80°C juures (*GelDryer*, BioRad) ja eksponeeriti 16 tunni jooksul ekraanile. Geelid visualiseeriti kasutades Typhoon Trio-t (GE Healthcare) (Joonis 4).



Joonis 4. EMSA seondumisreaktsiooni põhimõte: ^{32}P märgistatud kaheahelaline DNA järjestus inkubeeritakse koos tuumalüsaadiga. Spetsiifilise seondumise tuvastamiseks lisatakse reaktsioonisegusse antikeha, mis selgitab valk-DNA seondumisele kindla NF- κB perekonna valguga. Tekkinud kompleksid lahutatakse mittedenatureerivas polüakrüülamiid geelis.

4.4. Totaalse RNA eraldamine

RNA eraldamiseks rakkudest kasutati Trizol reagenti (Invitrogen) ja Rneasy Micro Kit-i (Qiagen) vastavalt tootja instruktsioonidele. Rakud suspendeeriti 1 ml Trizol reagensis ja inkubeeriti 5 minutit toatemperatuuril. Seejärel lisati 200 μl kloroformi ning inkubeeriti veel 5 minutit toatemperatuuril. Proovid tsentrifugeeriti 13400 g 15 minutit 4°C juures. Edasi kasutati Rneasy Micro Kit-i (Qiagen). RNA-d sisaldav vesifaas tõsteti ümber uude tuubi ja lisati samas mahus 70% etanooli ja kanti Rneasy MinElute kolonnile. RNA elueeriti 14 μl -s RNAasi-vabas vees ja kontsentratsioonid mõõdeti NanoDrop 1000 spektrofotomeetriga.

4.5. cDNA süntees

cDNA sünteesiks kasutati SuperScript III pöördtranskriptaasi (Invitrogen). Ühe reaktsiooni kohta võeti 5 µg embrüonaalsetest rakkudest eraldatud RNA-d, 0,5 µg oligo(dT)₁₈ praimerit (Invitrogen) ja 1 µl 10 mM dNTP segu (Fermentas). Praimerite seondumiseks inkubeeriti proove 5 minutit 65°C juures ja jahutati koheselt 1 min jääle. Reaktsioon viidi läbi 20 µl-s, mis sisaldas 1× *First Strand* puhvrit, 1 µl 0.1 M DTT, 40 U-ribonukleaasi inhibiitorit RiboLock (Fermentas) ja 200 U SuperScript III pöördtranskriptaasi. Proove inkubeeriti 1 tund 50°C juures, seejärel reaktsioon peatati, tõstes temperatuur 15 minutiks 70°C peale. cDNA säilitati -70°C juures.

4.6. q-RT-PCR (kvantitatiivne pöördtranskriptaas polümeraasi ahelreaktsioon)

q-RT-PCR viidi läbi geenispetsiifiliste praimeritega (Tabel 2) ViiA7 Real-Time PCR System masinal (Life Technologies).

Tabel 2. q-RT-PCR-s kasutatud praimerid

Nimi (<i>F</i> – forward/ <i>R</i> – reverse)	Järjestus
QmAIRE3/4 5 <i>F</i>	5'-CCTCAAAGAGCGTCTCCAG-3'
QmAIRE3/4 5 <i>R</i>	5'-TGGTCTGAATTCCGTTTCCA-3'
QmAIRE13 14/14 <i>F</i>	5'-TCCTCAATGAGCACTCATTGA-3'
QmAIRE13 14/14 <i>R</i>	5'-CCACCTGTCATCAGGAAGAG-3'
mHPRT <i>F</i>	5'-CTCTCGAAGTGTGGATACAG-3'
mHPRT <i>R</i>	5'-ACAAACGTGATTCAAATCCC-3'
Oct4 <i>F</i>	5'-GACAACAATGAGAACCTTCAGGAGA-3'
Oct4 <i>R</i>	5'-TTCTGGCGCCGGTTACAGAACCA-3'

Töös kasutatud praimerid disainiti programmidega Primer-BLAST ja MPrimer3 ning valmistati firmas TAG Copenhagen. Reaktsiooni läbiviimiseks kasutati MaximaTM SYBR Green/ROX qPCR Master Mixi (Fermentas). Reaktsioon viidi läbi 10 µl-s mahus, mis sisaldas 0,5 µl cDNA-d, 9 µl 2× MaximaTM SYBR Green/ROX qPCR Master Mix-i (Fermentas), 0,25 µl 5 mM *forward* praimerit ning 0,25 µl 5 mM *reverse* praimerit. Proovid kanti 384 auguga qPCR plaadile (BIOplastics) 10 µl kaupa kolme kordusena. Kontaminatsiooni detekteerimiseks kasutati kõikide praimerite suhtes kontrollproovina 0,5 µl MQ vett cDNA asemel. Tulemused normaliseeriti koduhoidja geenide *Hprt* ja tüvirakuspetsiifilise *Oct4* suhtes.

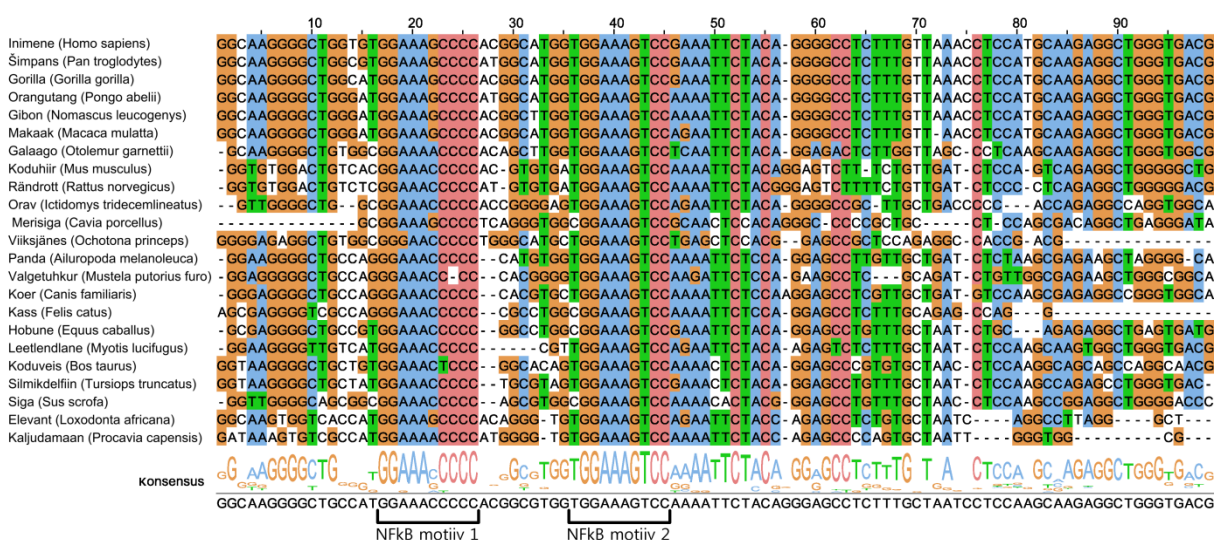
4.7. DNA järjestuse joondamine ja DNA motiivotsingud

Joonduseks kasutati Ensembl (<http://www.ensembl.org/>) andmebaasis leiduva inimese *AIRE* geenist 5' suunas paiknevat ala koordinaatidega 21:45702428-45702525 ning sellele vastavaid homoloogseid alasid teistes imetajaliikides. Kokku oli võimalik joondada 23 liigi genoomsed alad. Joonduse toimetamiseks ja visualiseerimiseks kasutati Jalview programmi (Waterhouse, Procter et al. 2009). Motiivotsinguks MEME programmiga (Bailey, Boden et al. 2009) kasutati joondatud järjestusi ning programmi parameetrid, mida muudeti, olid järgmised: 1) iga motiivi esinemissagedus: miinimum 2, maksimum 46 korda; 2) motiivi pikkus: miinimum 6, maksimum 11 alupaari, 3) maksimaalne leitavate motiivide arv: 5. MatInspector programmiga (Cartharius, Frech et al. 2005) analüüsiti igat järjestust eraldi vaikimisi sätetega. NF-κB faktorite ja DNA motiivide vahelise seondumise tugevuse hindamiseks kasutati DNA-valk interaktsioonikatsete tulemusi, mis on kättesaadavad veebiaadressil <http://thebrain.bwh.harvard.edu/nfkb/index.php> (Siggers, Chang et al. 2012).

5. TULEMUSED

5.1.1. *AIRE* geenist 5' suunas asuva konserveerunud mittekodeeriva järjestuse kirjeldus

AIRE valgu funktsionaalseid domeene kodeerivad genoomsed alad on imetajate klassis hästi konserveerunud (Saltis, Criscitiello et al. 2008). Veel on leitud väga tugevalt konserveerunud ala umbes 3200 aluspaari inimese *AIRE* geeni algusest 5' suunas, mis hiire ja inimese võrdluses on 40 aluspaari ulatuses 80% identne (Blechsmidt, Schweiger et al. 1999). Kokku on konserveerunud umbes 100 aluspaari pikkune ala ning sellele vastavaid homoloogseid järjestusi võib leida ka inimesele fülogeneetiliselt palju kaugemates imetajaliikides (Joonis 5).



Joonis 5. *AIRE* geenist 5' suunas distaalselt paikneva oletusliku reguleeriva ala mitmene joondus. Joonduseks on kasutatud Ensembl andmebaasis leiduvate liikide *AIRE* geeni 5' alasid. Joonduse all on toodud konsensusjärjestus, millest on näha ka NF-κB faktoritele omased äratundmisjärjestused.

Joondusest ilmneb, et kõikidel analüüsitud liikidel on kaks täielikult identset ala järjestusega GGAAA, millele esimesel juhul järgneb C/GCCCC, teisel juhul GTCC. Samuti on suhteliselt hästi konserveerunud nende kahe ala vaheline distants, jäädes vahemikku 7-9 aluspaari (kolm aluspaari leetlendlasel). Motiiviotsingud nii MEME (Bailey, Boden et al. 2009) kui ka MatInspector (Cartharius, Frech et al. 2005) programmidega leidsid, et kõige paremini vastavad need järjestused erinevate NF-κB perekonna faktorite seondumismotiividele. NF-κB faktorite ja DNA motiivide vahelise afiinsuse hindamiseks oli võimalik kasutada varasemalt avaldatud andmekogu (Siggers, Chang et al. 2012). Selle alusel võib oletada, et esimene järjestus seob kõige paremini dimeeri, mille üheks komponendiks on p50 ning teise motiivi puhul oli afiinsuskoor kõrgeim c-Rel homodimeeri korral (Tabel 3).

Tabel 3. NF-κB faktorite DNA motiividele seondumise tugevuse ennustamine

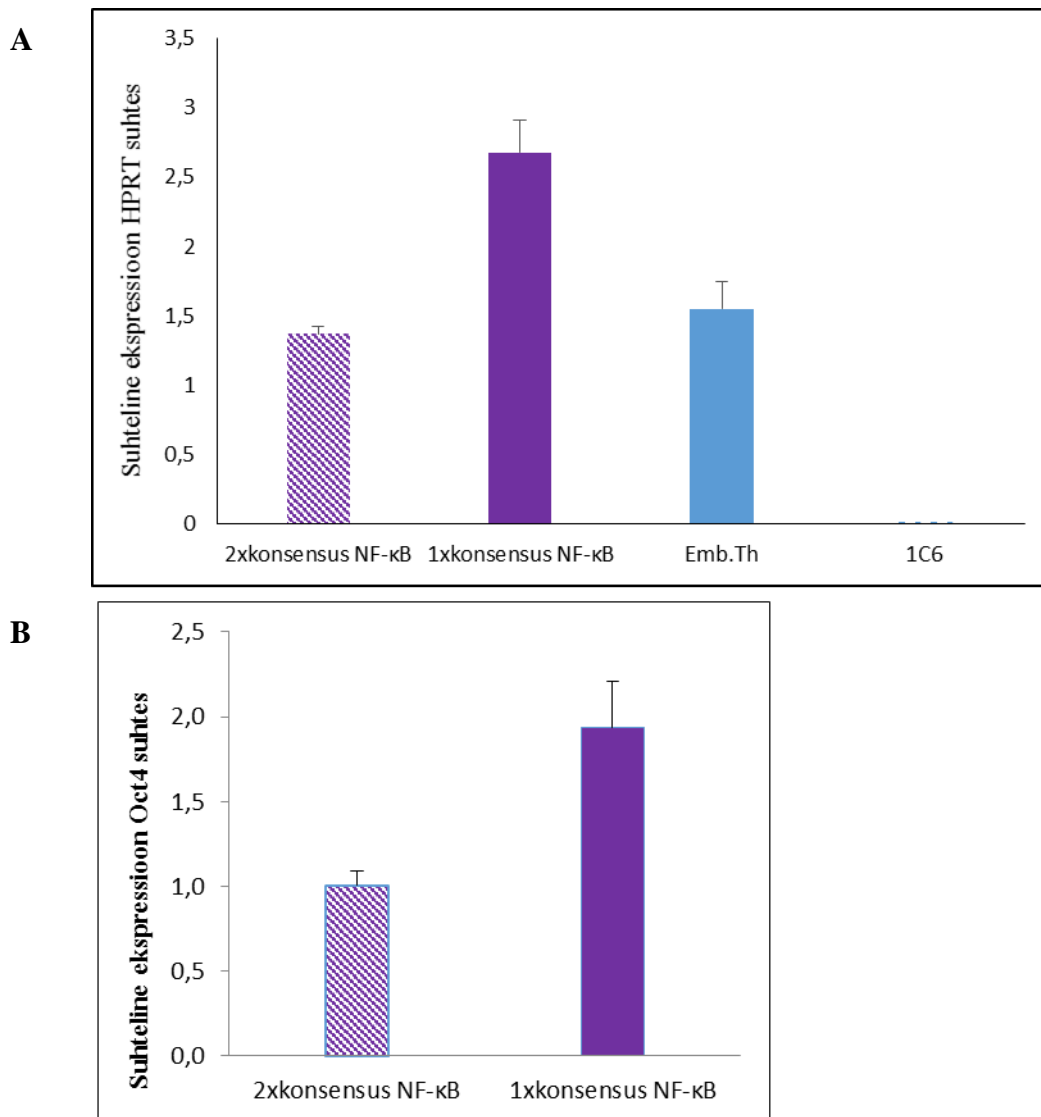
NF-κB motiiv	Algus	c-Rel- c-Rel mM	c-Rel- p50 Hs	p50- p50 mM	p52- p52 Hs	p65- p50 Hs	p65- p50 mM	p65- p65 Hs	p65- p65 mM	relb- p50 Hs	relb- p50 mM	relb- p52 Hs
TGGAAAGCCC	16	9,54	< 4	< 4	< 4	< 4	< 4	< 4	< 4	< 4	4,65	< 4
GGAAAGCCCC	17	8,3	12,54	5,57	4,37	10,2	7,34	5,07	5,04	5,24	13,58	9,3
TGGAAAGTCC	36	13,19	< 4	< 4	< 4	< 4	< 4	7,45	7,73	< 4	6,71	< 4
GGAAAGTCCG	37	13,12	< 4	< 4	< 4	< 4	< 4	7,7	8,94	< 4	5,87	< 4

Ennustused põhinevad kas inimese (Hs) või hiire (Mm) NF-κB faktorite afiinsusel motiive sisaldavate oligonukleotiidide suhtes, kasutades PBM (*protein binding micrarray*) tehnoloogiat (Siggers, Chang et al. 2012). Kõrgem skoor näitab tugevamat seondumist.

Lähtudes neist arvutuslikest tulemustest, uuriti edasi, mil määral mõjutab selle konserveerunud järjestuse olemasolu AIRE geeni ekspressiooni *in vivo*, kas NF-κB faktorid tõepoolest tunnevad ära ennustatud seondumismotiive ning kas sellest seondumisest sõltub geeniekspressioon *in vitro* süsteemis.

5.1.2. Konserveerunud ala mõju uurimine Aire geeni ekspressioole hiire embrüonaalsetes tüvirakkudes kvantitatiivse polümeraasi pöördtranskriptaasi ahelreaktsiooniga (q-RT-PCR)

Olles veendunud konserveerunud NF-κB järjestuse olulisuses, otsustasime uurida kas *Aire* ekspressioon on mõjutatud sellest kindlast järjestusest. Selle jaoks kasutati Tartu Ülikooli Transgeense Tehnoloogia Tuumiklaboris loodud hiire embrüonaalset tüvirakuliini W4/129SVEV S6 kus NF-κB motiive sisaldav järjestus on ühelt homoloogsest kromosoomilt eemaldatud. Kasutati W4/129SVEV S6 geneetilise taustaga rakuliini just tänu oma heale võimele säilitada pluripotentsust. Varasemalt on teada, et *Aire* geen on hiire embrüonaalsetes tüvirakkudes tugevalt ekspresseerunud, kuigi *Aire* funktsioon selles arenguetapis on senini selgusetu (Nishikawa, Hirota et al. 2010). *Aire* ekspressiooni, analüüsiti lisaks tüvirakkudele ka hiire embrüonaalses tuumuses (positiivne kontroll) ja hiire tuumuse epiteelist loodud 1C6 rakuliinis, kus *Aire* ekspressioon puudub (negatiivne kontroll) (Joonis 6).



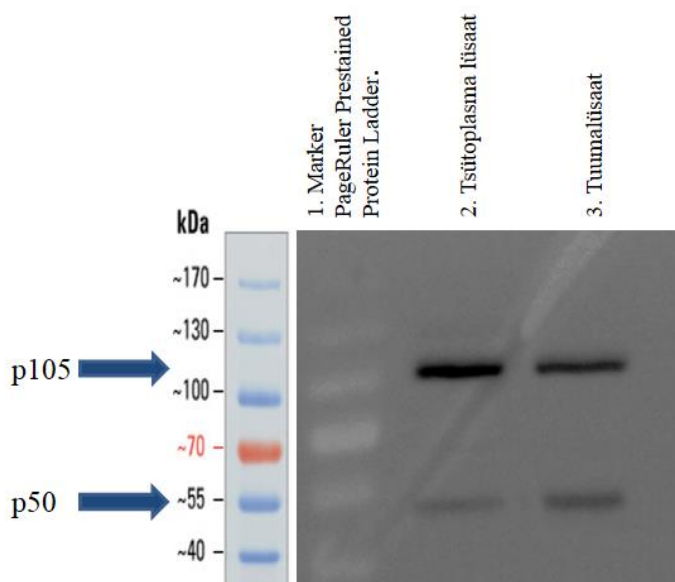
Joonis 6. *Aire* geeni ekspressioon metsiktüüpi (2xKons.NFκB) ja ühe NF-κB järjestusega (1xKons.NFκB) hiire embrüonaalsetes tüvirakkudes. *Aire* ekspressioonitaset hinnati (A) koduhoidjageeni *Hprt* ja (B) tüvirakuspetsiifilise *Oct4* suhtes. *Aire* on tugevalt ekspresseerunud embrüonaalses tuumuses (positiivne kontroll), kuid puudub hiire tuumuse rakuliinis 1C6 (negatiivne kontroll). Kujutatud on kahe sõltumatu katse suhteline ekspressioonitase ± standardhälve

Tulemustest selgub, et kõrvaldades ühelt kromosoomilt NF-κB järjestuse toimub *Aire* geeni ekspressioonitaseme tõus pea kaks korda. Ekspressioonimuutust võrreldi kahe erineva geeni suhtes, mis ei sõltu *Aire*-st: esimeseks oli koduhoidjageen *Hprt*, ja teiseks *Oct4* geen, mis avaldub kõrgel tasemel just tüvirakkudes. Tulemus oli ootamatu, sest eeldati, et tegemist on pigem enhanserjärjestusega, mille kaudu on NF-κB faktoritel aktiveeriv toime geeniekspressioonile ning selle eemaldamine langetab *Aire* geeni avaldumist. Võimalik, et konserveerunud ala mõjutab *Aire* geeni ekspressiooni teiste transkriptsiooniregulaatorite seondumise kaudu, millel on transkriptsiooni inhibeeriv efekt, mis kaob, kui see ala on kõrvaldatud. Samuti on kirjeldatud NF-κB faktorite p50 ja p52 homodimeere, mis seonduvad

DNA-le, kuid geeniekspressiooni ei tõsta, kuna kummalgi faktoril puudub transaktivatsiooni domeeni (Hayden and Ghosh 2012).

5.2. Elektroforeetilise liikuvuse nihke analüüs.

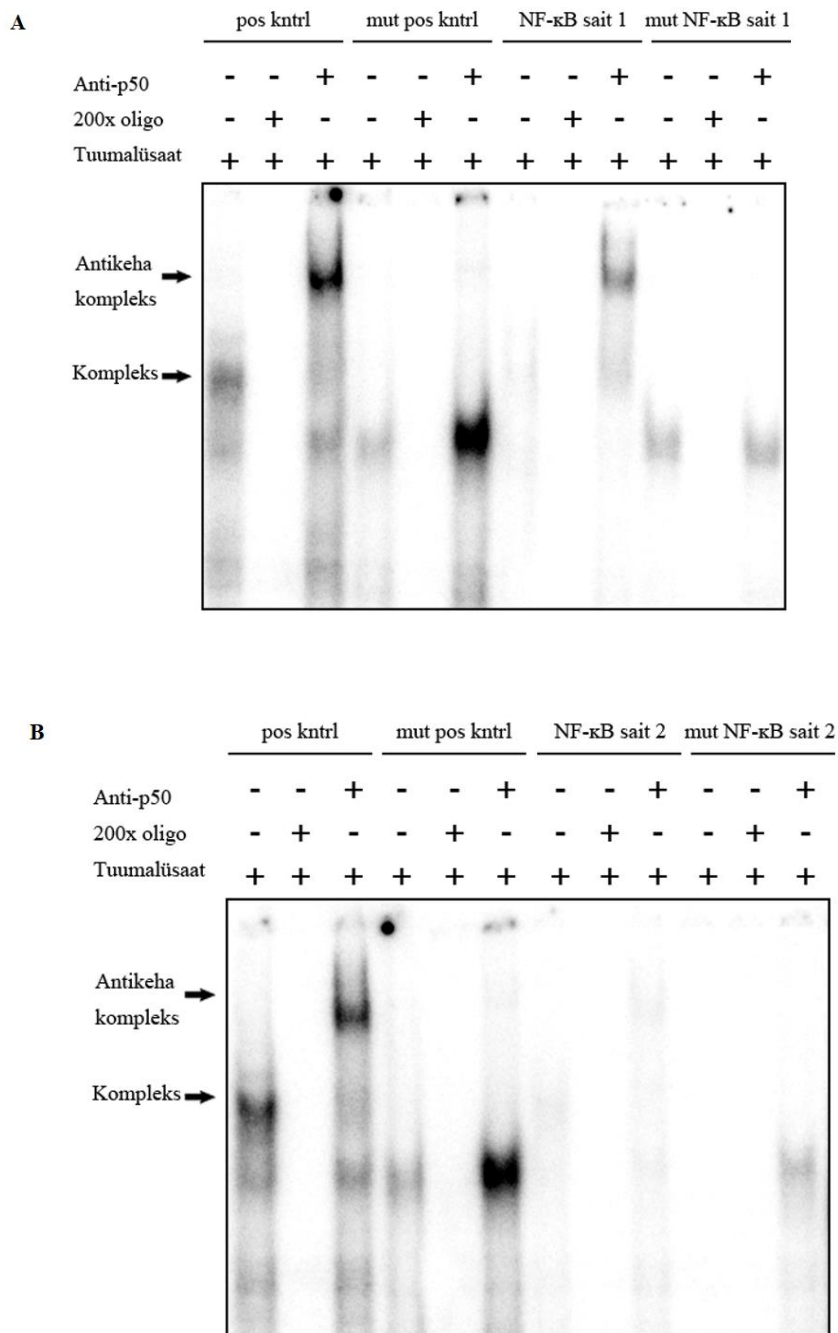
Uurimaks, kas AIRE promootorregiooni ees paiknevale NF- κ B järjestusele seonduvad NF- κ B perekonna valgud teostati EMSA analüüs. Hiire embrüonaalsete tüvirakkudega saadud tulemus viitas võimalusele, et konserveerunud alast lähtub inhibeeriv mõju *Aire* geeni avaldumisele. Testimaks, kas täheldatud inhibitsiooni võiksid vahendada NF- κ B perekonna liikmed, eeskätt p50, teostati EMSA analüüs. Selleks kasutati TNF α -ga stimuleeritud HeLa rakkude tuumalüsaate, milles tsütoplasmas paiknev p105 on protsessitud väiksemaks rakutuuma liikuvaks ja DNA-ga seonduvaks p50 valguks (Joonis 7).



Joonis 7. TNF α -ga stimuleeritud HeLa rakkude tsütoplasma ja tuuma fraktsiooni *western* analüüs. Protsessimata p105 paikneb tsütoplasmas ja protsessimise järel liigub p50 rakutuuma. Tütoplasma ja rakutuuma fraktsioonide eraldamine ei ole täielik, mistõttu esineb p105 rakutuuma ning p50 tsütoplasma lüsaadis.

Tuumalüsaate inkubeeriti radioaktiivse märgisega kaheahelaliste oligonukleotiididega, mis sisaldasid endas konserveerunud alast leitud esimest või teist NF- κ B motiivi ning neile vastavaid muteeritud seonduvissaite (Tabel 1)

EMSA tulemused näitavad, et mõlemad konserveerunud NF- κ B motiivid on võimelised seonduvama spetsiifiliselt p50-ga (Joonis 8).



Joonis 8. EMSA analüüs AIRE regulatoorses piirkonnas paiknevatele NF-κB motiividele. p50 moodustab kompleksi nii (A) esimest (NF-κB sait1) kui ka (B) teist (NF-κB sait2) seondumismotiivi kandva oligonukleotiidiga. DNA-valk kompleks puudub, kui spetsiifilised seondumisaidid on muteeritud. Katses on koos inkubeeritud p50 valku sisaldavat HeLa rakkude tuumalüsaati ning P³² märgisega kaheahelisi oligonukleotide. DNA-valk komplekside spetsiifilisuse hindamiseks on osadele proovidele lisatud ülehulgas märgistamata oligonukleotidi (200X oligo) ning osadele p50-vastast antikeha (1 µg anti-p50)

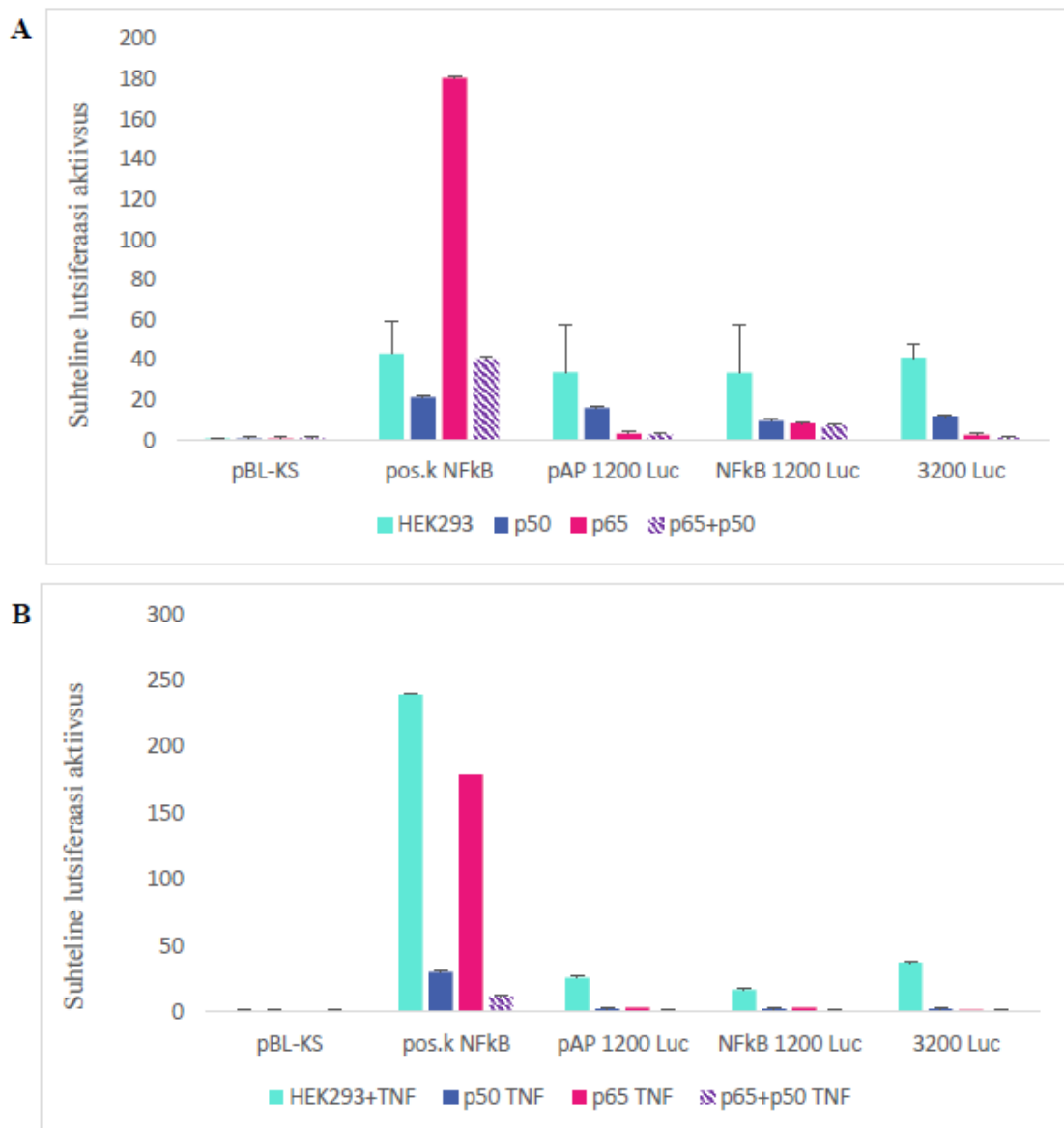
Seondumise spetsiifikat kinnitab asjaolu, et radioaktiivne signaal kaob kui proovidele lisada 200-kordses ülehulgas märgistamata oligonukleotidi. See on märgistatud oligonukleotidi ja märgistamata oligonukleotidi omavahelisest konkureerimisest DNA-valk kompleksi

moodustumisel. Lisaks nihkub DNA-valk kompleks geelirajal kõrgemale, kui proovile on lisatud p50-vastane antikeha, näidates, et kompleks tõepoolest sisaldab p50 valku. Seda põhjustab komplekside suuruse järgi liikumine geelis, kus suuremad osakesed liiguvad aeglasemalt kui seda teevad väiksemad. p50-le spetsiifilist kompleksi ega p50-vastasest antikehast tingitud nihet ei teki juhul, kui seondumismotiivi kriitilised nukleotiidid on muteeritud.

5.3. Konserveerunud NF- κ B järjestuse mõju geeniekspressioonile lutsiferaasi reportersüsteemis

Kuna p50 seondus mõlema konserveerunud DNA motiiviga, uuriti edasi, kas sellel faktoril võib olla otsene toime geeniekspressioonile. Selleks kasutati lutsiferaasi aktivatsioonikatseid. Reporterplasmiid sisaldas lutsiferaasi kodeeriva järjestuse ees ~1200 bp fragmenti inimese *AIRE* geeni promootorist, millele omakorda oli ette kloonitud 100 bp pikkune konserveerunud NF- κ B saitidega järjestus (Kõnd, 2010)(Joonis 5). Üks reporterplasmiid sisaldas 3200 bp pikkust *AIRE* geeni 5' ülesvoolu ala promootorist kuni konserveerunudalani välja. Lisaks reporterplasmiididele kotrasnfekteeriti rakkudesse p50 ja/või p65 ekspresiooniplasmiidid ning osasid rakke stimuleeriti TNF α lisamisega söötmesse, mis aktiveerib NF- κ B kanoonilist rada.

Peale 30h transfektsiooni, mis sisaldas 6h TNF α stimulatsiooni, rakud lüüsi ja mõõdeti helendumispulsside arvu ning koostati suhtelistest tulemustest graafik (Joonis 9).



Joonis 9. Konserveerunud NF-κB järjestus ei mõjuta lutsiferaasi ekspressioonitaset. **A.** Reporterplasmiidid üksinda (HEK293) või kotransfekteerituna p50 ja/või p65 ekspressiooniplasmiididega (p50, p65 ja p65+p50) HEK293 rakkudes ilma TNFα stimulatsioonita. **B.** Sama katseskeem, kuid TNFα stimulatsiooniga. Y-teljel on toodud suhteline aktivatsioon normaliseerituna tühja kloonimisvektori pBL-KS lutsiferaasi aktiivsuse suhtes. X-teljel on näidatud transfekteeritud promotorkonstruktid. Värv ja viirutusega on esitatud NF-κB faktorite üleekspressioon või selle puudumine. Graafikul on kujutatud kahe sõltumatu katse keskmistatud tulemus ± standardhälve.

Katse tulemusest järeldus, et p50 ja/või p65 üleekspressioon langetavad lutsiferaasi aktiivsust AIRE promootorilt algava transkriptsiooni korral, võrreldes ilma kotransfektatsioonita HEK293 rakkudes toimuvaga, kuid konserveerunud ala olemasolu ei mõjuta selle toimumist mitte mingil määral (Joonis 9 A). Samuti ei näi geeniaktivatsioonil oluline olevat kogu 3200 aluspaari pikkune AIRE 5' ülesvoolu järjestus (joonis 9A, 3200Luc). NF-κB kanoonilist signaalrada

aktiveeriv TNF α stimulatsioon küll tõstab positiivses kontrollis lutsiferaasi aktiivsust, kuid ei mõjuta geeniekspressiooni teistelt reporterplasmiididelt (Joonis 9B, võrrelda HEK293+TNF tulpasid). Nii TNF α kui ka p50/p65 üleekspressiooniga saadud tulemus näitavad, et AIRE geeni 5' konserveerunud ala ei vahenda NF- κ B kanoonilist rada. Huvitaval kombel suutis lisaks TNF α stimulatsioonile ainult p65 üleekspressioon aktiveerida lutsiferaasi ekspressiooni positiivse kontrollina kasutatud reporterplasmiidilt. p50 koos p65-ga positiivse kontrolli aktiivsust ei mõjutanud, kuigi p65-p50 on enim kirjeldatud geeniekspressiooni aktiveeriva toimega NF- κ B dimeer (Joonis A ja B). Võib oletada, et vaatamata võrdses koguses transfekteeritud ekspressiooniplasmiididele, avaldub rakus eelistatult p50, mistõttu tekib rohkem p50 homodimeere kui p50-p65 heterodimeere.

6. ARUTELU

Tuumafaktor kapa B (NF- κ B) omab kesksel rollil mitmetes immunoloogilistes reaktsioonides, lisaks reguleerib ta mitmete immuunsüsteemi komponentide ekspressiooni, mis omakorda reguleerivad spetsiifilisi immuunvastuseid (Li and Verma 2002). Inimese *AIRE* ja hiire *Aire* geenil on umbes 3 kb promootorpiirkonnast eespool konserveerunud 100 aluspaari pikkune järjestus, mis on 40 aluspaari ulatuses 80% identne (Blechsmidt, Schweiger et al. 1999). See konserveerunud järjestus sisaldab NF- κ B perekonna valkudele spetsiifilisi seondumisjärjestusi. Meie poolt läbiviidud joondusest ilmsel, et kõikidel analüüsitud liikidel on kaks täielikult identset seondumismotiivi. Sellest lähtuvalt võib spekulatsioonida, et see konserveerunud järjestus võiks omada kindlat rolli ka *AIRE* geeni ekspressioonil. Seni on veel selgusetu, mis on selle konserveerunud järjestuse täpne funktsioon, kuid mitmed tööd on näidanud, et tuumase areng ja funktsioon, sealhulgas *Aire* olemasolu sõltuvad NF- κ B signaalradadesse kuuluvatest valkudest (Zuklys, Balciunaite et al. 2000, Zhu, Chin et al. 2006, Lomada, Liu et al. 2007, Akiyama, Shimo et al. 2008, Shinzawa, Maruyama et al. 2011).

Leitud seondumismotiivid omasid kõige suuremat afiinsust NF- κ B perekonna p50 ja c-Rel valkudele. Kuna NF- κ B perekonna valgud võivad moodustada erinevaid homo- ja heterodimeere, siis võib oletada, et sinna seonduvad eelistatult p50 homodimeerid või heterodimeerid. Homodimeriseerumise korral oleks aga pärsitud geeniekspressioon kuna p50 ei ole funktsionaalne transkriptsiooni aktivaator. Võimalik, et *AIRE* 5' konserveerunud NF- κ B seondumisjärjestuse kaudu toimubki hoopis transkriptsiooni repressioon. Nimelt leidsime, et *Aire* ekspressioon tõusis hiire embrüonaalsetes tüvirakkudes, milles üks NF- κ B konserveerunud järjestuse koopia oli eemaldatud, võrreldes metsiktüüpi tüvirakkudega, See viitab võimaliku repressiivse elemendi kaotamisest tingitud kõrgeks ekspresseeritud tasemele. Samas, ei saa aga täielikult kindel olla, et tegemist on transkriptsiooni inhibeeriva efektiga, kuna selle jaoks oleks vaja analüüsida *Aire* ekspressiooni rakuliinis, kus puudub NF- κ B seondumisjärjestus mõlemalt homoloogiliselt kromosoomilt.

Uurimaks p50 seondumist leitud järjestusele, teostati EMSA analüüs, millest selgus, et p50 tõepoolest osaleb valk-DNA kompleksi moodustamisel. Üllataval kombel seonduvad p50 mõlema NF- κ B seondumiskohaga, vaatamata sellele, et teine seondumisait ei ole tüüpilise p50 äratundmisjärjestusega. Võimalik, et p50 hõivab selle seondumismotiivi heterodimeerina mõne teise NF- κ B faktoriga, millel on kõrgem afiinsus antud järjestuse suhtes, kuid see vajab testimist edaspidistes katsetes.

Eeldades, et *AIRE* 5' konserveerunud alal on inhibeeriv toime ning see tuleneb p50 transkriptsiooniliselt inaktiivsete homodimeeride seondumisest, viidi läbi lutsiferaasi aktivatsioonikatsed NF- κ B seondumismotiive ja *AIRE* promootorit sisaldavate reporterkonstruktiividega. Peale reporterplasmiidide ja p50 transfekteeriti rakkudesse ka p65, mis nii homodimeerina kui ka p50-p65 heterodimeerina on tuntud NF- κ B kanoonilise signaalraja kaudu geeniekspressiooni aktiveeriv transkriptsioonifaktor. Selgus, et p50, p65 ja mõlema faktori koekspressioon langetavad lutsiferaasi ekspressiooni *AIRE* promootoriga reporterplasmiididelt, kuid konserveerunud NF- κ B järjestuste olemasolu ei omanud seejuures tähtsust. Rakke stimuleeriti ka TNF α -ga, mis on oluline NF- κ B kanoonilist signaalrada käivitav ligand, kuid ka antud katsetes ei sõltunud lutsiferaasi aktiivsus konserveerunud NF- κ B saitidest. Tulemused näitavad, et NF- κ B kanoonilise raja faktorid ja stimulandid ei toimi *AIRE* 5' alas oleva konserveerunud järjestuse kaudu. Kuigi p50 üleekspressioon inhibeerib lutsiferaasi ekspressiooni positiivses kontrollis, mis on eriti ilmne peale TNF α stimulatsiooni, ei ole tal spetsiifilist efekti NF- κ B konserveerunud järjestuse vahendusel. Sellest võib järeldada, et EMSA katses nähtud seondumine on artefakt või osaleb p50 DNA-valk kompleksi moodustamisel heterodimeerina teiste valkudega, näiteks RelB ja p52, Samas nende faktorite rakutuuma lokaliseerimine vajab omakorda NF- κ B alternatiivse signaalraja käivitamist. Ei ole välistatud ka p50 kompleks näiteks c-Rel-ga. Selle jaoks on tarvis edasi uurida erinevate NF- κ B perekonna valkude seondumist leitud seondumisjärjestustele

Need asjaolud võivad selgitada, miks ei olnud lutsiferaasikatsetega võimalik määrata konserveerunud NF- κ B seondumismotiividest tulenevat efekti geeniekspressioonile. Alternatiivse raja ja teiste faktorite vajalikkus vajavad edasist uurimist.

KOKKUVÕTE

Immuunsüsteemi normaalse tasakaalu häirimisel võib tekkida olukord, kus organism hakkab ründama iseennast. Keha enda komponentide suhtes immuuntolerantsuse kadumise tulemusena võib organismis välja areneda autoimmuunhaigus. Peamiseks probleemiks autoimmuunhaiguste uurimisel on nende polügeenne taust. Sellest tulenevalt on käsitletud antud töös rasket autoimmuunhaigust APECED, mida põhjustavad paljud mutatsioonid AIRE transkriptsiooni regulatsiooniks tuumuses on vajalik NF- κ B ja selle puudumisel langeb Aire ja Aire-sõltuvate koe-spetsiifiliste antigeenide geeniekspressioon. Samuti on teada, et inimese AIRE ja hiire Aire geenil on umbes 3 kb promootorpiirkonnast eespool konserveerunud NF κ B järjestus. Sellest lähtuvalt sai käesoleva töö eesmärgiks uurida antud konserveerunud järjestuse mõju AIRE geeni regulatsioonile.

Antud töö käigus leidsime, et NF- κ B seondumisjärjestus on spetsiifiline ühele kindlale Rel perekonna valgule p50.

Geeniekspressiooni tulemused näitavad, et kui juba ühelt kromosoomilt on kõrvaldatud NF- κ B seondumisjärjestused, toimub Aire geeni ekspressioonitaseme tõus, viidates konserveerunud ala võimalikule transkriptsiooni inhibeerivale funktsioonile

Antud töö käigus leidsime, et NF- κ B seondumisjärjestustega seondub spetsiifiliselt Rel perekonna valk p50.

Lutsiferaasi aktivatsioonikatsete põhjal ei mõjutanud transkriptsioonifaktor p50 üksinda ega koos NF- κ B kanoonilise raja liikme p65-ga geeniekspressiooni.

Selleks, et selgitada kas AIRE ekspressioon on otseselt reguleeritud NF- κ B raja vahendusel, tuleks järgnevalt uurida ka teiste Rel perekonna valkude seondumist antud konserveerunud NF- κ B järjestusele.

7. SUMMARY

The *AIRE* gene is essential for the establishment of central tolerance in the thymus. Mutations in the *AIRE* gene triggers a rare organ-specific autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED). *AIRE* is involved in the promiscuous gene expression in the thymus. NF- κ B is essential in the transcriptional regulation of *AIRE* gene and the lack of NF- κ B decreases Aire dependent TRA gene expression. Human *AIRE* and mouse *Aire* share a similar conserved sequence 3 kb upstream the promotor region.

The aim of the thesis was to study the influence of the conserved sequence upstream of *AIRE* gene promoter on gene expression. In silico predictions found two highly conserved DNA motifs that are most likely binding sites for NF- κ B family proteins. In order to study the effect of these NF- κ B family members in the activation of *AIRE* promoter several experiments were made. Analysis of *Aire* gene expression in mouse embryonic stem cells with only one intact copy of the conserved region showed that the removal of NF- κ B binding sequence from the promoter in embryonic stem cells had a positive effect on the activation of Aire expression. DNA-protein interaction studies showed that p50 specifically binds to both NF- κ B binding sites. This further pointed to the possibility that the conserved region mediates transcriptional repression due to the fact that p50 homodimers are known as transcriptional repressors because of their lack of TAD domains. However, luciferase assay experiments that involved *AIRE* promoter constructs with and without the conserved regions showed no specific effect of the NF- κ B sites in the regulation of transcription. Also, overexpression of p50 and/or p65 and TNF α stimulation did not change expression level of the luciferase gene. Nevertheless, TNF α stimulation and p50/p65 are part of the canonical NF- κ B signaling pathway, leaving open the question of how does the alternative signaling pathway contribute in the regulation of Aire gene expression via the conserved NF- κ B binding sites. Additionally, the role of c-Rel, which does not belong to either signaling pathway, requires further attention and should be addressed experimentally in the near future.

Kasutatud kirjandus

- Aaltonen, J., P. Björse, L. Sandkuijl, J. Perheentupa and L. Peltonen (1994). "An autosomal locus causing autoimmune disease: autoimmune polyglandular disease type I assigned to chromosome 21." Nat Genet **8**(1): 83-87.
- Ahonen, P., S. Myllärniemi, I. Sipilä and J. Perheentupa (1990). "Clinical variation of autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED) in a series of 68 patients." N Engl J Med **322**(26): 1829-1836.
- Akiyama, T., Y. Shimo, H. Yanai, J. Qin, D. Ohshima, Y. Maruyama, Y. Asami, J. Kitazawa, H. Takayanagi, J. M. Penninger, M. Matsumoto, T. Nitta, Y. Takahama and J. Inoue (2008). "The tumor necrosis factor family receptors RANK and CD40 cooperatively establish the thymic medullary microenvironment and self-tolerance." Immunity **29**(3): 423-437.
- Akiyoshi, H., S. Hatakeyama, J. Pitkänen, Y. Mouri, V. Doucas, J. Kudoh, K. Tsurugaya, D. Uchida, A. Matsushima, K. Oshikawa, K. I. Nakayama, N. Shimizu, P. Peterson and M. Matsumoto (2004). "Subcellular expression of autoimmune regulator is organized in a spatiotemporal manner." J Biol Chem **279**(32): 33984-33991.
- Anderson, M. S. (2002). "Autoimmune endocrine disease." Curr Opin Immunol **14**(6): 760-764.
- Bailey, T. L., M. Boden, F. A. Buske, M. Frith, C. E. Grant, L. Clementi, J. Ren, W. W. Li and W. S. Noble (2009). "MEME SUITE: tools for motif discovery and searching." Nucleic Acids Res **37**(Web Server issue): W202-208.
- Ballarini, A. and M. A. Lee-Kirsch (2007). "Genetic dissection of autoimmune polyendocrine syndrome type 2: common origin of a spectrum of phenotypes." Ann N Y Acad Sci **1110**: 159-165.
- Björse, P., J. Aaltonen, N. Horelli-Kuitunen, M. L. Yaspo and L. Peltonen (1998). "Gene defect behind APECED: a new clue to autoimmunity." Hum Mol Genet **7**(10): 1547-1553.
- Björse, P., M. Halonen, J. J. Palvimo, M. Kolmer, J. Aaltonen, P. Ellonen, J. Perheentupa, I. Ulmanen and L. Peltonen (2000). "Mutations in the AIRE gene: effects on subcellular location and transactivation function of the autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy protein." Am J Hum Genet **66**(2): 378-392.
- Björse, P., M. Peltto-Huikko, J. Kaukonen, J. Aaltonen, L. Peltonen and I. Ulmanen (1999). "Localization of the APECED protein in distinct nuclear structures." Hum Mol Genet **8**(2): 259-266.
- Blechschmidt, K., M. Schweiger, K. Wertz, R. Poulson, H. M. Christensen, A. Rosenthal, H. Lehrach and M. L. Yaspo (1999). "The mouse Aire gene: comparative genomic sequencing, gene organization, and expression." Genome Res **9**(2): 158-166.
- Bloch, D. B., A. Nakajima, T. Gulick, J. D. Chiche, D. Orth, S. M. de La Monte and K. D. Bloch (2000). "Sp110 localizes to the PML-Sp100 nuclear body and may function as a nuclear hormone receptor transcriptional coactivator." Mol Cell Biol **20**(16): 6138-6146.
- Borden, K. L. (2002). "Pondering the promyelocytic leukemia protein (PML) puzzle: possible functions for PML nuclear bodies." Mol Cell Biol **22**(15): 5259-5269.
- Cartharius, K., K. Frech, K. Grote, B. Klocke, M. Haltmeier, A. Klingenhoff, M. Frisch, M. Bayerlein and T. Werner (2005). "MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites." Bioinformatics **21**(13): 2933-2942.
- Chen, F. E. and G. Ghosh (1999). "Regulation of DNA binding by Rel/NF-kappaB transcription factors: structural views." Oncogene **18**(49): 6845-6852.
- Chen, L. F. and W. C. Greene (2004). "Shaping the nuclear action of NF-kappaB." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(5): 392-401.
- Friedman, R. and A. L. Hughes (2002). "Molecular evolution of the NF-kappaB signaling system." Immunogenetics **53**(10-11): 964-974.

- Gardner, J. M., J. J. Devoss, R. S. Friedman, D. J. Wong, Y. X. Tan, X. Zhou, K. P. Johannes, M. A. Su, H. Y. Chang, M. F. Krummel and M. S. Anderson (2008). "Deletional tolerance mediated by extrathymic Aire-expressing cells." Science **321**(5890): 843-847.
- Ghosh, S., M. J. May and E. B. Kopp (1998). "NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses." Annu Rev Immunol **16**: 225-260.
- Gibson, T. J., C. Ramu, C. Gemünd and R. Aasland (1998). "The APECED polyglandular autoimmune syndrome protein, AIRE-1, contains the SAND domain and is probably a transcription factor." Trends Biochem Sci **23**(7): 242-244.
- Hayden, M. S. and S. Ghosh (2012). "NF-κB, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions." Genes Dev **26**(3): 203-234.
- Heino, M., P. Peterson, J. Kudoh, K. Nagamine, A. Lagerstedt, V. Ovod, A. Ranki, I. Rantala, M. Nieminen, J. Tuukkanen, H. S. Scott, S. E. Antonarakis, N. Shimizu and K. Krohn (1999). "Autoimmune regulator is expressed in the cells regulating immune tolerance in thymus medulla." Biochem Biophys Res Commun **257**(3): 821-825.
- Helton, E. S., J. Zhang and X. Chen (2008). "The proline-rich domain in p63 is necessary for the transcriptional and apoptosis-inducing activities of TAp63." Oncogene **27**(20): 2843-2850.
- Ilmarinen, T., P. Eskelin, M. Halonen, T. Ruppell, R. Kilpikari, G. D. Torres, H. Kangas and I. Ulmanen (2005). "Functional analysis of SAND mutations in AIRE supports dominant inheritance of the G228W mutation." Hum Mutat **26**(4): 322-331.
- Kisand, K., A. S. Bøe Wolff, K. T. Podkrajsek, L. Tserel, M. Link, K. V. Kisand, E. Ersvaer, J. Perheentupa, M. M. Erichsen, N. Bratanic, A. Meloni, F. Cetani, R. Perniola, B. Ergun-Longmire, N. Maclaren, K. J. Krohn, M. Pura, B. Schalke, P. Ströbel, M. I. Leite, T. Battelino, E. S. Husebye, P. Peterson, N. Willcox and A. Meager (2010). "Chronic mucocutaneous candidiasis in APECED or thymoma patients correlates with autoimmunity to Th17-associated cytokines." J Exp Med **207**(2): 299-308.
- Kisand, K. and P. Peterson (2011). "Autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy: known and novel aspects of the syndrome." Ann N Y Acad Sci **1246**: 77-91.
- Kyewski, B. and L. Klein (2006). "A central role for central tolerance." Annu Rev Immunol **24**: 571-606.
- Kärner, J., A. Meager, M. Laan, J. Maslovskaja, M. Pihlap, A. Remm, E. Juronen, A. S. Wolff, E. S. Husebye, K. T. Podkrajšek, N. Bratanic, T. Battelino, N. Willcox, P. Peterson and K. Kisand (2013). "Anti-cytokine autoantibodies suggest pathogenetic links with autoimmune regulator deficiency in humans and mice." Clin Exp Immunol **171**(3): 263-272.
- Li, Q. and I. M. Verma (2002). "NF-kappaB regulation in the immune system." Nat Rev Immunol **2**(10): 725-734.
- Liston, A., S. Lesage, J. Wilson, L. Peltonen and C. C. Goodnow (2003). "Aire regulates negative selection of organ-specific T cells." Nat Immunol **4**(4): 350-354.
- Liu, B., R. Yang, K. A. Wong, C. Getman, N. Stein, M. A. Teitell, G. Cheng, H. Wu and K. Shuai (2005). "Negative regulation of NF-kappaB signaling by PIAS1." Mol Cell Biol **25**(3): 1113-1123.
- Lomada, D., B. Liu, L. Coghlan, Y. Hu and E. R. Richie (2007). "Thymus medulla formation and central tolerance are restored in IKKalpha^{-/-} mice that express an IKKalpha transgene in keratin 5⁺ thymic epithelial cells." J Immunol **178**(2): 829-837.
- Michels, A. W. and P. A. Gottlieb (2010). "Autoimmune polyglandular syndromes." Nat Rev Endocrinol **6**(5): 270-277.
- Mueller, D. L. (2010). "Mechanisms maintaining peripheral tolerance." Nat Immunol **11**(1): 21-27.
- Murumägi, A., P. Vähämurto and P. Peterson (2003). "Characterization of regulatory elements and methylation pattern of the autoimmune regulator (AIRE) promoter." J Biol Chem **278**(22): 19784-19790.

- Nagamine, K., P. Peterson, H. S. Scott, J. Kudoh, S. Minoshima, M. Heino, K. J. Krohn, M. D. Lalioti, P. E. Mullis, S. E. Antonarakis, K. Kawasaki, S. Asakawa, F. Ito and N. Shimizu (1997). "Positional cloning of the APECED gene." *Nat Genet* **17**(4): 393-398.
- Nishikawa, Y., F. Hirota, M. Yano, H. Kitajima, J. Miyazaki, H. Kawamoto, Y. Mouri and M. Matsumoto (2010). "Biphasic Aire expression in early embryos and in medullary thymic epithelial cells before end-stage terminal differentiation." *J Exp Med* **207**(5): 963-971.
- Org, T., F. Chignola, C. Hetényi, M. Gaetani, A. Rebane, I. Liiv, U. Maran, L. Mollica, M. J. Bottomley, G. Musco and P. Peterson (2008). "The autoimmune regulator PHD finger binds to non-methylated histone H3K4 to activate gene expression." *EMBO Rep* **9**(4): 370-376.
- Peterson, P., T. Org and A. Rebane (2008). "Transcriptional regulation by AIRE: molecular mechanisms of central tolerance." *Nat Rev Immunol* **8**(12): 948-957.
- Peterson, P. and L. Peltonen (2005). "Autoimmune polyendocrinopathy syndrome type 1 (APS1) and AIRE gene: new views on molecular basis of autoimmunity." *J Autoimmun* **25** Suppl: 49-55.
- Poliani, P. L., K. Kisand, V. Marrella, M. Ravanini, L. D. Notarangelo, A. Villa, P. Peterson and F. Facchetti (2010). "Human peripheral lymphoid tissues contain autoimmune regulator-expressing dendritic cells." *Am J Pathol* **176**(3): 1104-1112.
- Razani, B., A. D. Reichardt and G. Cheng (2011). "Non-canonical NF- κ B signaling activation and regulation: principles and perspectives." *Immunol Rev* **244**(1): 44-54.
- Reimand, K., J. Perheentupa, M. Link, K. Krohn, P. Peterson and R. Uibo (2008). "Testis-expressed protein TSGA10 an auto-antigen in autoimmune polyendocrine syndrome type I." *Int Immunol* **20**(1): 39-44.
- Rossi, S. W., M. Y. Kim, A. Leibbrandt, S. M. Parnell, W. E. Jenkinson, S. H. Glanville, F. M. McConnell, H. S. Scott, J. M. Penninger, E. J. Jenkinson, P. J. Lane and G. Anderson (2007). "RANK signals from CD4(+)3(-) inducer cells regulate development of Aire-expressing epithelial cells in the thymic medulla." *J Exp Med* **204**(6): 1267-1272.
- Saltis, M., M. F. Criscitiello, Y. Ohta, M. Keefe, N. S. Trede, R. Goitsuka and M. F. Flajnik (2008). "Evolutionarily conserved and divergent regions of the autoimmune regulator (Aire) gene: a comparative analysis." *Immunogenetics* **60**(2): 105-114.
- Sanchez-Pulido, L., A. Valencia and A. M. Rojas (2007). "Are promyelocytic leukaemia protein nuclear bodies a scaffold for caspase-2 programmed cell death?" *Trends Biochem Sci* **32**(9): 400-406.
- Savkur, R. S. and T. P. Burris (2004). "The coactivator LXXLL nuclear receptor recognition motif." *J Pept Res* **63**(3): 207-212.
- Senftleben, U., Y. Cao, G. Xiao, F. R. Greten, G. Krähn, G. Bonizzi, Y. Chen, Y. Hu, A. Fong, S. C. Sun and M. Karin (2001). "Activation by IKK α of a second, evolutionary conserved, NF- κ B signaling pathway." *Science* **293**(5534): 1495-1499.
- Shinzawa, M., Y. Maruyama, J. Qin, N. Akiyama, M. Miyauchi, H. Yanai, M. Takami, J. Inoue and T. Akiyama (2011). "Splenic extramedullary hemopoiesis caused by a dysfunctional mutation in the NF- κ B-inducing kinase gene." *Biochem Biophys Res Commun* **414**(4): 773-778.
- Siggers, T., A. B. Chang, A. Teixeira, D. Wong, K. J. Williams, B. Ahmed, J. Ragoussis, I. A. Udalova, S. T. Smale and M. L. Bulyk (2012). "Principles of dimer-specific gene regulation revealed by a comprehensive characterization of NF- κ B family DNA binding." *Nat Immunol* **13**(1): 95-102.
- Uchida, D., S. Hatakeyama, A. Matsushima, H. Han, S. Ishido, H. Hotta, J. Kudoh, N. Shimizu, V. Doucas, K. I. Nakayama, N. Kuroda and M. Matsumoto (2004). "AIRE functions as an E3 ubiquitin ligase." *J Exp Med* **199**(2): 167-172.
- Vallabhapurapu, S. and M. Karin (2009). "Regulation and function of NF- κ B transcription factors in the immune system." *Annu Rev Immunol* **27**: 693-733.
- Wahl, C., S. Liptay, G. Adler and R. M. Schmid (1998). "Sulfasalazine: a potent and specific inhibitor of nuclear factor κ B." *J Clin Invest* **101**(5): 1163-1174.

- Waterhouse, A. M., J. B. Procter, D. M. Martin, M. Clamp and G. J. Barton (2009). "Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench." *Bioinformatics* **25**(9): 1189-1191.
- Weih, F. and J. Caamaño (2003). "Regulation of secondary lymphoid organ development by the nuclear factor-kappaB signal transduction pathway." *Immunol Rev* **195**: 91-105.
- Wong, D., A. Teixeira, S. Oikonomopoulos, P. Humburg, I. N. Lone, D. Saliba, T. Siggers, M. Bulyk, D. Angelov, S. Dimitrov, I. A. Udalova and J. Ragoussis (2011). "Extensive characterization of NF- κ B binding uncovers non-canonical motifs and advances the interpretation of genetic functional traits." *Genome Biol* **12**(7): R70.
- Zhu, M., R. K. Chin, P. A. Christiansen, J. C. Lo, X. Liu, C. Ware, U. Siebenlist and Y. X. Fu (2006). "NF-kappaB2 is required for the establishment of central tolerance through an Aire-dependent pathway." *J Clin Invest* **116**(11): 2964-2971.
- Zuklys, S., G. Balciunaite, A. Agarwal, E. Fasler-Kan, E. Palmer and G. A. Holländer (2000). "Normal thymic architecture and negative selection are associated with Aire expression, the gene defective in the autoimmune-polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED)." *J Immunol* **165**(4): 1976-1983.

Abbas, A. K; Lichtman, A ,Pillai S, 2007. **Cellular and Molecular Immunology**; 2012 7th Edition; p2-14.

Kõnd, K; 2010 NF- κ B mõju uurimine AIRE geeni reguloatoores piirkonnas. Bakalaureusetöö, Tartu Ülikool: http://www.ebc.ee/kaitsmised/2010/bakatood_2010/Karin_Kond.pdf

NF- κ B seondumismotiivide afiinsuse andmebaas:
<http://thebrain.bwh.harvard.edu/nfkb/index.php>

TÄNUAVALDUSED

Soovin eelkõige tänada oma juhendajat Mario Saaret, kelle abil ja juhendamisel valmis käesolev töö. Abivalmi suhtumise ja meeldiva koostöö eest soovin aga tänada meie labori kollektiivi Molekulaarpatoloogia uurimusrühmas, Pärt Petersoni juhendamisel.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina Karin Kõnd
(sünnikuupäev: 22. detsember 1987)

annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose:
Konserveerunud 5' regulatoorse ala mõju *AIRE* geeni ekspressioonile

mille juhendaja on Mario Saare

- 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 alates **22.08.2015** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 22.08.2013 (*kuupäev*)