

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT  
Biotehnoloogia õppetool

ARSTITEADUSKOND  
BIOMEDITSIINI INSTITUUT  
Immunoloogia õppetool

Janika Põder

**Histoon H3 metülatsiooni mustrid *CTLA4* ekspressiooni regulatsioonis  
erinevates T-rakkude alapopulatsioonides**

Magistritöö

Juhendajad  
MD, PhD, Kai Kisand  
MD, PhD, Kalle Kisand  
MD, PhD, Neeme Tõnisson

Tartu 2013

# Sisukord

<b>Sisukord</b> .....	<b>2</b>
<b>Kasutatud lühendid</b> .....	<b>3</b>
<b>Sissejuhatus</b> .....	<b>4</b>
<b>1. Kirjanduse ülevaade</b> .....	<b>5</b>
<b>1.1 CTLA4</b> .....	<b>5</b>
1.1.1 CTLA4 liikumine rakus ja selle seos funktsiooniga.....	8
1.1.2 CTLA4 seos autoimmuunhaigustega.....	9
1.1.3 CTLA4 funktsiooni mehhanismid.....	10
1.1.3.1 CTLA4 rakusised funktsiooni mehhanismid.....	10
1.1.3.2 CTLA4 rakuvälised funktsiooni mehhanismid.....	11
1.1.4 CTLA4 ekspressioon ja selle regulatsioon.....	13
<b>2.1 Geeniekspressiooni epigeneetiline regulatsioon</b> .....	<b>14</b>
2.1.1 Histooside post-translatsioonilised modifikatsioonid.....	16
2.1.1.1 H3K4me1.....	16
2.1.1.2 H3K4me3.....	17
2.1.1.3 H3K27me3.....	17
2.1.1.4 H3K36me3.....	18
2.1.2 <i>CTLA4</i> ekspressiooni epigeneetiline regulatsioon.....	18
<b>2. Eksperimentaalosa</b> .....	<b>19</b>
<b>2.1 Töö eesmärgid</b> .....	<b>19</b>
<b>2.2 Materjalid ja meetodika</b> .....	<b>19</b>
2.2.1 T-rakkude alapopulatsioonide sortimine.....	19
2.2.2 Rakkude fikseerimine.....	21
2.2.3 Kromatiini immunosadestamine (ChIP).....	21
2.2.4 Kromatiini fragmentide pikkuse kontroll.....	22
2.2.5 Rakkude stimuleerimine.....	23
2.2.6 RNA eraldamine ja cDNA süntees.....	23
2.2.7 Kvantitatiivne PCR (qPCR).....	24
2.2.8 ChIP-i varieeruvuse koefitsiendi arvutamine.....	26
2.2.9 Statistiline analüüs.....	26
<b>2.3 Tulemused</b> .....	<b>27</b>
2.3.1 Fragmentide suuruse kontroll.....	27
2.3.2 ChIP-i varieeruvuse koefitsiendi arvutamine.....	27
2.3.3 <i>CTLA4</i> ja <i>FOXP3</i> ekspressioon erinevates T-rakkude alapopulatsioonides.....	28
2.3.4 <i>CTLA4</i> H3K4me1 erinevates T-rakkude alapopulatsioonides.....	29
2.3.5 <i>CTLA4</i> H3K4me3 erinevates T-rakkude alapopulatsioonides.....	30
2.3.6 <i>CTLA4</i> H3K27me3 erinevates T-rakkude alapopulatsioonides.....	32
2.3.7 <i>CTLA4</i> H3K36me3 erinevates T-rakkude alapopulatsioonides.....	33
2.3.8 Stimuleeritud T-rakkude alapopulatsioonide geeniekspressioon.....	35
<b>2.4 Arutelu</b> .....	<b>36</b>
2.4.1 Järeldused.....	41
<b>Kokkuvõte</b> .....	<b>42</b>
<b>Summary</b> .....	<b>43</b>
<b>Tänuavaldused</b> .....	<b>45</b>
<b>Kasutatud kirjandus</b> .....	<b>46</b>
<b>Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks</b> .....	<b>51</b>

## Kasutatud lühendid

ACTB	<i>actin</i> $\beta$ , beeta-aktiin
AP-1	<i>activator protein 1</i> , aktivaatorvalk 1
AP2	<i>adaptor protein 2</i> , adaptorvalk 2
APC	<i>antigen presenting cell</i> , antigeeni presenteeriv rakk
B2M	$\beta 2$ <i>microglobulin</i> , beeta-2 mikroglobuliin
CD	<i>cluster of differentiation</i> , diferentseerumise klaster
ChIP	<i>chromatin immunoprecipitation</i> , kromatiini immunosadestamine
CpG	tsütosiin-guaaniin dinukleotiid
Ct	<i>cycle threshold</i> , tsükli künnisväärtus
CTLA4	<i>cytotoxic T lymphocyte associated antigen 4</i> , tsütotoksilise T-lümfotsüüdiga assotsieeritud antigeen 4
Fc	<i>fragment constant</i> , antikeha konstantse regiooni fragment
flCTLA4	<i>full-length CTLA4</i> , täispikk (membraanseoseline) CTLA4 isovorm
FOXP3	<i>forkhead box P3</i>
GAPDH	<i>glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i> , glütseeraldehüüd-3-fosfaadi dehüdrogenaas
GVYVKM	glütsiin-valiin-türosiin-valiin-lüsiin-metioniin
H3K4me1	histoon H3 4. lüsiini monometülatsioon
H3K4me3	histoon H3 4. lüsiini trimetülatsioon
H3K27me3	histoon H3 27. lüsiini trimetülatsioon
H3K36me3	histoon H3 36. lüsiini trimetülatsioon
HLA	<i>human leukocyte antigen</i> , inimese koosobivusantigeenid
IDO	<i>indoleamine-pyrrole 2, 3 dioxygenase</i> , indoolamiinpürrool-2,3-dioksügenaas
IgG	immunoglobuliin G
IL	interleukiin
liCTLA4	<i>ligand-independent CTLA4</i> , ligand-sõltumatu CTLA4 isovorm
MACS	<i>magnet-activated cell sorting</i> , immunomagneetiline rakkude sortimine
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> , põhiline koosobivuskompleks
MYOD1	<i>myogenic differentiation 1</i>
NFAT	<i>nuclear factor of activated T-cells</i> , aktiveeritud T-rakkude tuumafaktor
NF-kB	<i>nuclear factor kappaB</i> , tuumafaktor kappa B
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i> , perifeerse vere mononukleaarsed rakud
Pol II	polümeraas II
PRC2	<i>polycomb repressive complex 2</i>
Q <sup>2</sup> ChIP	<i>quick and quantitative chromatin immunoprecipitation</i> , kiire ja kvantitatiivne kromatiini immunosadestamine
sCTLA4	<i>soluble CTLA4</i> , lahustuv CTLA4 isovorm
SDYMNM	seriin-asparagiinhape-türosiin-metioniin-asparagiin-metioniin
T1D	<i>type 1 diabetes</i> , 1. tüüpi diabeet e insuliinsõltuv suhkrutõbi
Tconv	konventsionaalne T-rakk
TCR	<i>T cell receptor</i> , T-raku retseptor
TF	transkriptsioonifaktor
TGF $\beta$	<i>transforming growth factor</i> $\beta$ , transformeeriv kasvufaktor $\beta$
Treg	regulatoorne T-rakk

## Sissejuhatus

CTLA4 on T-lümfotsüütides ekspresseeruv erinevate isovormidega valk, mis edastab inhibitoorseid signaale, aidates seeläbi säilitada immuunsüsteemi homöostaasi ja immunoloogilist tolerantsust organismi enda kudede suhtes. CTLA4 on erinevates T-rakkude alapopulatsioonides erinevalt ekspresseeritud: teisi immuunsüsteemi rakke supresseerivates regulatoorsetes T-rakkudes (Treg) avaldub CTLA4 konstitutiivselt, kuid konventsionaalsetes T-rakkudes ekspresseeritakse CTLA4 alles pärast rakkude aktiveerumist. Häired CTLA4 ekspressioonis võivad viia perifeerse immuuntolerantsi häirumisele. *CTLA4* geenis on teada mitmed polümorfismid, mis on seotud erinevate autoimmuunhaigustega. Omades keskset rolli T-rakulise immuunvastuse regulatsioonis, on CTLA4 tugev kandidaat autoimmuunsete haiguste ja vähivastaste ravimite väljatöötamiseks.

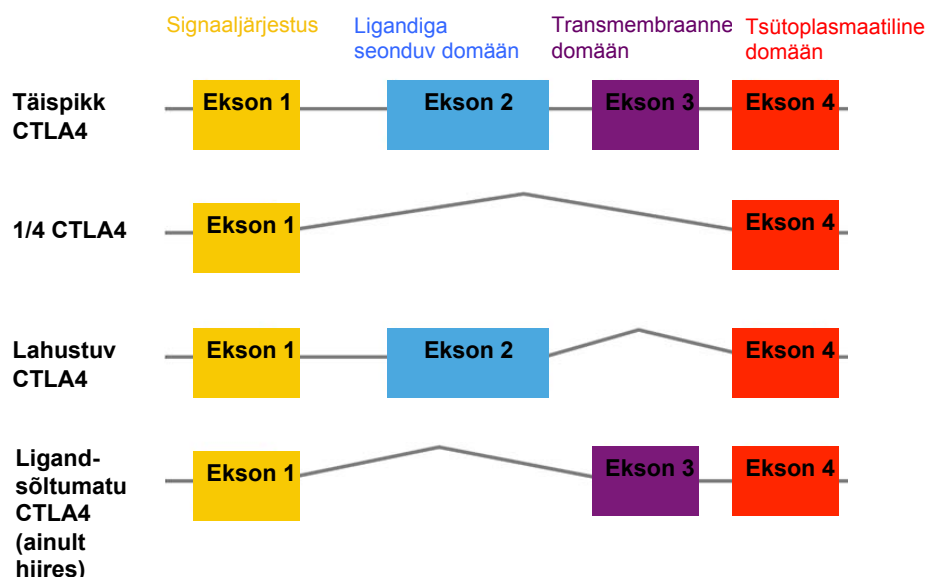
Lisaks CTLA4 funktsioonide mehhanismidele pole selge ka *CTLA4* ekspressiooni regulatsioon. Geeniekspressioon on reguleeritud mitmel tasemel. Histonide post-translatsioonilised modifikatsioonid mõjutavad kromatiini struktuuri ja on platvormiks kromatiiniga interakteeruvatele geenide avaldumist reguleerivatele valkudele. Käesoleva töö eesmärgiks on uurida, kuidas on histoon H3 metülatsioon seotud *CTLA4* ekspressiooniga värskelt isoleeritud Treg ja naiivsete ning rahulolekus CD4<sup>+</sup> ja CD8<sup>+</sup> Tconv rakupopulatsioonides ning eri populatsioonide võimega vastusena *in vitro* stimulatsioonile *CTLA4* mRNA ekspressiooni üles reguleerida.

# 1. Kirjanduse ülevaade

## 1.1 CTLA4

CTLA4 (CD152) on immunoglobuliinide superperekonda kuuluv T-lümfotsüütides ekspresseeruv valk (Lindsten jt., 1993). *CTLA4* geen paikneb inimesel 2. ja hiirel 1. kromosoomil (Ling jt., 1999). Nelja eksoniga geenist saadakse alternatiivse splaisinguga neli erinevat isovormi. 223 aminohappest koosnev täispikk (fICTLA4) vorm moodustub neljast erinevast domäänist: nn liiderpeptiid, rakuväline ligandiga seonduv domään, transmembraanne ja rakusisene signaali ülekandev domään (Harper jt., 1991; Teft jt., 2006). Funktsionaalne fICTLA4 on 43 kDa suurustest monomeeridest disulfiidsidemete abil moodustunud homodimeer (Lindsten jt., 1993; Linsley jt., 1995). Eksonitest 1, 2 ja 4 splaisitud transkriptist transleeritakse lahustuv CTLA4 vorm (sCTLA4) (Magistrelli jt., 1999; Oaks jt., 2000). Samuti on teada produkt (1/4CTLA4), mis koosneb ainult nn liiderpeptiidist (ekson 1) ja rakusisesest domäänist (ekson 4) (Ueda jt., 2003). Hiirtel ekspresseerub lisaks ka ligand-sõltumatu vorm (liCTLA4), millel puudub ligandiga seondumise domään (ekson 2) (Ueda jt., 2003; Vijayakrishnan jt., 2004). *CTLA4* erinevad produktid ja nende domäänide paigutused on näha joonisel 1. Esineb kõrge homoloogia hiire ja inimese CTLA4 vahel, nt on valgu tasemel signaalpeptiidi kodeerivas 1. eksonis identsus 62% ja tsütoplasmaatilist domääni kodeerivas eksonis koguni 100% (Harper jt., 1991) ning 71 % identsus esineb kogu geeni ulatuses DNA tasemel (Ling jt., 1999).

Lisaks T-raku retseptori (TCR) ning põhilise koesobivuskompleksi (MHC) molekulide kontekstis esitatud antigeeni interaktsioonile vajavad T-lümfotsüüdid aktiveerumiseks ja anergia vältimiseks lisasignaale (Gimmi jt., 1993). Neist kõige olulisem on kostimulatoorse retseptori CD28 ja antigeene presenteerivate rakkude (APC) pinnal ekspresseeruvate CD80 (B7-1) ja CD86 (B7-2) molekulide (Boussiotis jt., 1993) interaktsioon (Linsley jt., 1991; Turka jt., 1992) (Joonis 2). CD28 on samuti immunoglobuliinide superperekonda kuuluv valk, mida kodeeriv geen lokaliseerub koos *CTLA4*-ga kostimulatoorsete retseptorite geeniklastrisse (Harper jt., 1991; Ling jt., 2001).

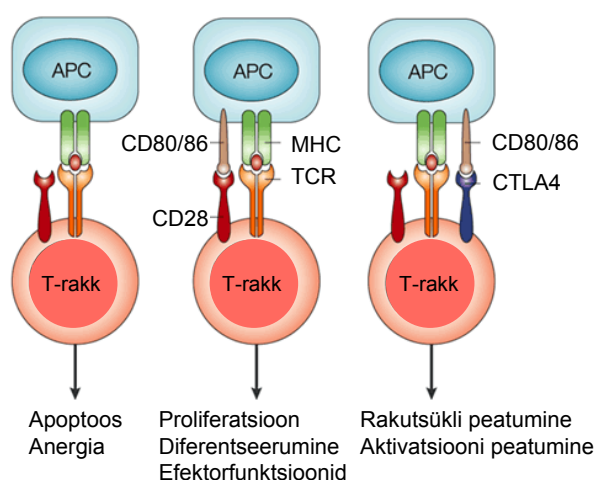


**Joonis 1. CTLA4 isovormid.** *CTLA4* koosneb neljast eksonist, millest saab alternatiivse splaisingu abil neli erinevat produkti. Iga ekson kodeerib ühte kindlat valgudomääni, mis on kirjas skeemi ülemises servas. Inimesel ekspresseerub täispikk CTLA4, eksonist 1 ja 4 koosnev produkt (1/4 CTLA4) ja lahustuv CTLA4 isovorm. Hiires leidub lisaks ligand-sõltumatu isovorm (mugandatud Teft jt., 2006).

Sarnaselt CD28-ga, seondub CTLA4 homodimeer APC-de pinnal olevate CD80 või CD86 molekulidega, kuid see interaktsioon on suurema afiinsusega kui CD28 puhul (Collins jt., 2002). CD28 ja CD80/86 interaktsioon on kostimularoorne signaal, mis on vajalik T-rakkude aktiveerumiseks - proliferatsiooniks ja tsütokiinide, sh IL-2 tootmiseks ning sekreteerimiseks (Gimmi jt., 1991; Jenkins jt., 1991). Kuigi esimesed katsed CTLA4 funktsiooni selgitamiseks näitasid, et CTLA4 on samuti kostimulatoorne retseptor (Linsley jt., 1992), on praeguseks selge, et CD80/86 ja CTLA4 interaktsioon edastab T-rakkudele tugeva inhibitoorse signaali, mis blokeerib rakutsükli progressiooni ja rakkude proliferatsiooniks vajaliku IL-2 tootmise, kutsudes T-rakkudes esile anergia seisundi (Krummel ja Allison, 1996; Blair jt., 1998; Greenwald jt., 2001). CTLA4 ja CD28 vahelise nii struktuuri, järjestuse, ekspressiooni kui genoomse asukoha märkimisväärse homoloogia tõttu arvatakse, et tõenäoliselt tekkisid need geenid kostimulatoorset retseptorit kodeerinud eellasgeeni duplitseerumisel (Harper jt., 1991). CTLA4 muutmiseks T-rakkude aktiveerumist inhibeerivast molekulist kostimulatoorseks molekuliks piisab CTLA4 tsütoplasmaatilises domäänis paikneva GYVVKM motiivi asendamisest CD28 tsütoplasmaatilise domääni motiiviga SDYMNM (Yin jt., 2003).

CTLA4 kriitilist rolli T-rakulise immuunvastuse pärssimisel ja immuuntolerantsi säilitamisel organismi enda kudede suhtes kinnitab ka CTLA4-defektsete hiirte fenotüüp.

Peatselt pärast sündi tekib nendel hiirtel massiivne T-lümfotsüütide proliferatsioon ja mitmeid organeid haarav lümfotsüütide infiltratsioon, mis lõpeb surmaga 3 kuni 4 nädalat pärast sündi (Tivol jt., 1995; Waterhouse jt., 1995). Rekombinantse CTLA4 ja immunoglobuliini liitvalgu (CTLA4-Ig) manustamisega on aga võimalik CTLA4<sup>-/-</sup> hiirte surmavat fenotüüpi alla suruda (Tivol jt., 1997). Lisaks on näidatud, et CTLA4-Ig pärsib efektiivselt autoimmuunseid haigusi nii hiirtel kui inimestel ning indutseerib immunoloogilise tolerantsuse siirdatud kudede suhtes (Lenschow jt., 1992; Finck jt., 1994; Abrams jt., 2000). CTLA4 olulisust immuunvastuse regulaatorina näitavad ka eksperimendid, kus CTLA4 blokeerimine spetsiifilise monoklonaalse antikehaga võimendab kasvajate vastast immuunreaktsiooni (Leach jt., 1996).

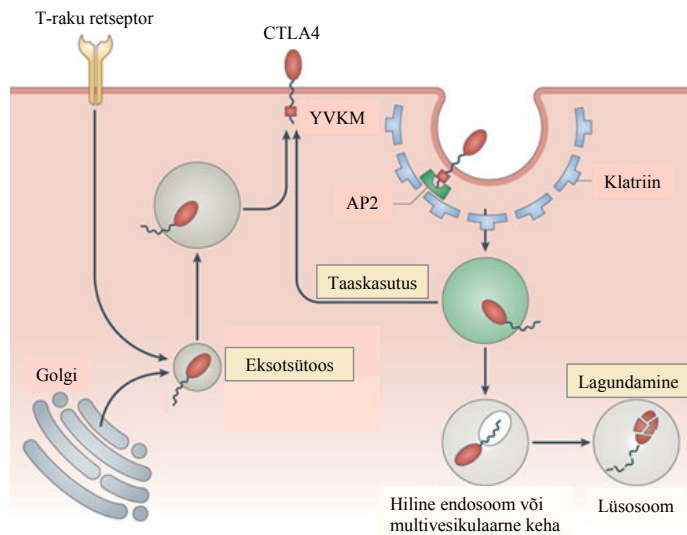


**Joonis 2. T-raku ja APC interaktsioon.** T-rakkude aktiveerumiseks e proliferatsiooniks, tsütokiinide tootmiseks ja diferentseerumiseks on vajalik samaaegne MHC-antigeense peptiidi kompleksi äratundmine T-raku retseptori poolt ning CD28 interaktsioon CD80 või CD86 molekulidega. CD28 kostimulatsiooni puudumisel lähevad T-rakud apoptoosi või muutuvad anergiliseks. T-rakkude aktiveerumise järgselt ekspresseeritava CTLA4 interaktsioon CD80 või CD86 molekulidega peatab rakutsükli ja lõpetab T-rakkude aktivatsiooni (mugandatud Alegre jt., 2001).

Arvestades CTLA4 tähtsust T-rakulise immuunvastuse regulatsioonis, on see molekul paljulubav kandidaat nii autoimmuunhaiguste kui ka vähivastaste preparaatide väljatöötamiseks. Praeguseks on reumatoidartriidi ravis kasutusel CTLA4 rakuvälise domääni ja inimese IgG Fc fragmendi liitvalk *abatacept*, mille arvatav toimemehhanism seisneb CD80/86 ja CD28 interaktsiooni blokeerimises (Cutolo ja Nadler, 2013). Samuti on kasutusel vähivastast T-rakulist immuunvastust võimendavad CTLA4 blokeerivad inimese monoklonaalsed IgG antikehad *ipilimumab* ja *tremelimumab* melanoomi ravis. Need ravimid on kliiniliste katsetuste faasis ka teiste vähivormide raviks (Graziani jt., 2012).

### 1.1.1 CTLA4 liikumine rakus ja selle seos funktsiooniga

Konventsionaalsete T-rakkude aktiveerumisel indutseeritakse kiiresti (1 kuni 2 h jooksul) *CTLA4* mRNA ekspressioon (Lindsten jt., 1993; Gibson jt., 2007) ja valgu maksimaalne lokaliseerumine rakupinnale toimub ca 48 h pärast stimulatsiooni (Linsley jt., 1992). Erinevalt CD28-st on CTLA4 hulk rakupinnal igal ajahetkel väike - enamus CTLA4 molekulidest (~ 80%) paikneb T-rakkudes rakusisestes vesiikulites (Leung jt., 1995). Sünteesijärgselt eksotsüteeritakse CTLA4 Golgi kompleksist klatriiniga kaetud vesiikulites (Walker ja Sansom, 2011). T-raku retseptori stimuleerimine küll mobiliseerib CTLA4 plasmamembraanile, kuid CTLA4 ei jää sinna püsima, vaid endotsüteeritakse ligandist sõltumatult väga kiiresti (5 min jooksul) (Qureshi jt., 2012). Seda protsessi vahendab CTLA4 tsütoplasmaatilises domäänis sisalduva motiivi YVKM interaktsioon plasmamembraani ja klatriiniga assotsieerunud adaptorvalgu kompleksiga AP-2 (Bradshaw jt., 1997; Chuang jt., 1997). Säilitamiseks piisavat CTLA4 hulka, peavad rakud kas valku juurde sünteesima või taaskasutama endotsüteeritud molekule. Qureshi jt (2012) leidsidki, et osa endotsüteeritud CTLA4 molekulidest liigub endosoomidest uuesti rakumembraanile. CTLA4 rakusiseseks hoidlaks on pakutud ka sekretoorset lüsosoomi (Iida jt., 2000), kuid uuemad andmed viitavad sellele, et lüsoosoomides toimub pigem CTLA4 lagundamine mitte pikaajaline säilitamine (Qureshi jt., 2012). Arvestades CTLA4 pidevat liikumist rakusisemuse ja rakumembraani vahel, kerkib esile probleem, kuidas saab tekkida piisavalt püsiv CTLA4 interaktsioon APC-del olevate ligandidega. Ühe võimaliku mehhanismina on pakutud, et raku aktiveerumisel toimub YVKM motiivi türosiini fosforüleerimine T-raku retseptori kompleksiga seondunud Src kinaaside poolt, mis mõjutab endotsütoosi ja aitab stabiliseerida CTLA4 rakupinnal. Kuigi esimesed sellealased tööd näitsid, et CTLA4 fosforüleerimine häirib interaktsiooni AP-2 kompleksiga (Bradshaw jt., 1997), ei olnud selge, kas CTLA4 fosforüleeritakse ka raku aktiveerumisel füsioloogilistes tingimustes ja kuidas see mõjutab endotsütoosi. Uuemates töödes on leitud, et T-lümfotsüütide aktiveerumisel suureneb CTLA4 eksotsütoos, kuid retseptori stabiliseerumist plasmamebraanil ei täheldata - endotsütoos jätkub ka raku aktiveerumisel (Qureshi jt., 2012). Praeguseks pole veel selge, kuidas täpselt CTLA4 keeruline, nii endosoomi kui lüsosoomi kasutatav liikumine rakusisemuse ja -pinna vahel (Joonis 3) on seotud CTLA4 funktsiooniga.



**Joonis 3. CTLA4 rakusisene transport.** Sünteesijärgselt toimub CTLA4 eksotsütoos Golgi kompleksist klatriiniga kaetud vesiikulites. CTLA4 ei ole rakumembraanil stabiilne, vaid endotsüteeritakse kiiresti samuti klatriin-sõltuvalt. Seda protsessi vahendab CTLA4 tsütoplasmaatilise domääni YVKM motiivi ja klatriinvesiikulite moodustumises osaleva adaptorvalgu kompleksi AP-2 interaktsioon. Endotsüteeritud CTLA4 edasiseks saatuseks on kas uuesti liikumine plasmamembraanile või lagundamine lüsoosomides (muudetud Walker ja Sansom, 2011).

### 1.1.2 CTLA4 seos autoimmuunhaigustega

Autoimmunteedi teke on kompleksne protsess, milles on olulised nii geneetiline eelsoodumus kui keskkonnategurid. Peamisteks geneetilisteks faktoriteks on variatsioonid koosobivusantigeene (HLA) kodeerivates geenides. Lisaks on olulised ka mitmed teised immuunsüsteemi funktsioneerimiseks vajalikud geenid, sh *CTLA4*, mille mitmed polümorfismid assotsieeruvad erinevate autoimmuunhaigustega, nt insuliinsõltuva suhkrutõve (T1D), Graves'i tõve, hulgiskleroosi ja reumatoidartriidiga (Kouki jt., 2000; Wandstrat ja Wakeland, 2001; Ueda jt., 2003; Haller jt., 2004). CTLA4 seose erinevate haigustega ja üldiselt selle molekuli täpse funktsiooni väljaselgitamise on teinud keerulisemaks alternatiivse splaisingu produktide olemasolu. Otsides seoseid CTLA4 isovormide, polümorfismide ja autoimmuunhaiguste vahel, leidsid Ueda jt (2003), et T1D ja autoimmuunsete kilpnäärmehaigustega on kõige tugevam assotsiatsioon ühenukleotiidse polümorfismiga (SNP) CT60A/G, mis asub 3' suunas *CTLA4* geeni polüadenülatsiooni signaalist. Kuna leiti erinevus *sCTLA4* mRNA hulgas haigetel ja tervete kontrollgrupil, korreleeriti CTLA4 ja autoimmuunhaiguste seos erinevustega just lahustuva isovormi mRNA ekspressioonis. Arvati, et CT60A/G võib mõjutada splaisingu efektiivsust, mis muudab erinevate CTLA4 isovormide osakaalu. Samas ei valitse üksmeel CT60A/G, *sCTLA4* ja autoimmuunhaiguste seose osas. Esiteks, pole hilisemad uurimustööd leidnud CT60A/G mõju *sCTLA4* ekspressioonile (Anjos jt., 2005). Teiseks, *sCTLA4* roll autoimmuunhaiguste tekkes ja arengus pole üheselt selge:

T1D patsientidel on leitud vähem sCTLA4 nii mRNA kui valgu tasemel, kuid Graves'i tõve põdejal on sCTLA4 leitud rohkem kui tervetel kontrollidel (Oaks jt., 2000; Rydén jt., 2012). Leidmaks seost *CTLA4* polümorfismide ja funktsiooni vahel, on pakutud kandidaadiks ka 1. eksonis olevat mittesünonüümset SNP-d (+49A/G), mis muudab signaalpeptiidi aminohappelist järjestust ja võiks seega potentsiaalselt mõjutada CTLA4 membraanile lokaliseerimist ja rakupinna ekspressiooni. Uurides Graves'i tõve patsiente, täheldati küll +49A/G eri genotüüpide mõningat efekti CTLA4 võimele inhibeerida T-rakkude proliferatsiooni, kuid ei nähtud häireid CTLA4 rakusiseses transpordis. Seega on sellegi SNP seos autoimmuunhaigustega ebaselge (Kouki jt., 2000; Ueda jt., 2003).

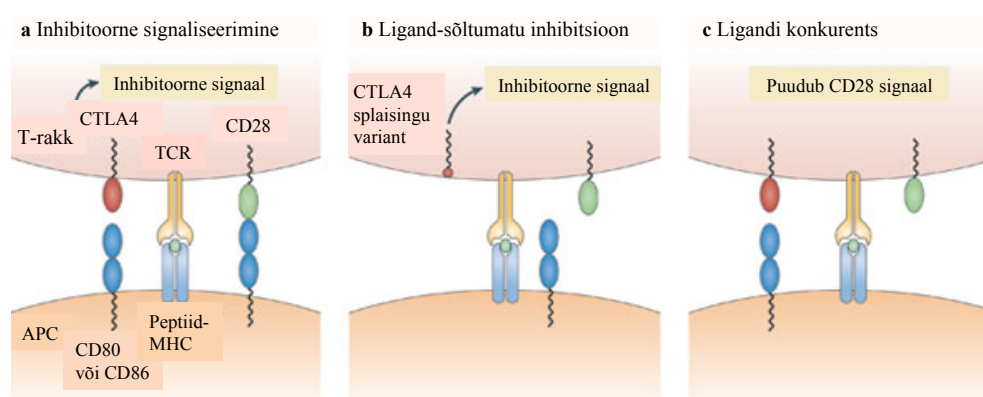
### **1.1.3 CTLA4 funktsiooni mehhanismid**

Kuigi CTLA4 olulisus immuunsüsteemi regulatsioonis on hästi tõendatud, on CTLA4 täpse funktsiooni väljaselgitamine olnud äärmiselt keeruline. Välja on pakutud mitmeid erinevaid CTLA4 funktsioneerimise mudeleid, mida võib jagada üldjoontes kaheks: rakusisesed (*cell-intrinsic*) mehhanismid (Joonis 4), mille korral CTLA4 mõjutab sama raku, kus CTLA4 ekspresseerub, ning rakuvälised (*cell-extrinsic*) mehhanismid (Joonis 5), mis tähendab, et CTLA4 mõju avaldub teistele rakkudele (Walker ja Sansom, 2011; Wing jt., 2011).

#### **1.1.3.1 CTLA4 rakusisesed funktsiooni mehhanismid**

On teada, et CTLA4 ligeerimine kas spetsiifilise agonistliku antikehaga või CD80/86 molekulidega inhibeerib T-rakkude proliferatsiooni ja aktivatsiooni (Krummel ja Allison, 1996; Greenwald jt., 2001). Kuigi on identifitseeritud mitmeid potentsiaalseid CTLA4 negatiivse signaalraja komponenti, pole praeguseks täpne CTLA4 poolt vahendatud signaalrada teada. Näiteks on leitud, et T-raku retseptori kompleksi signaali ülekandes osalevad Src perekonna proteiinkinaasid fosforüleerivad CTLA4 tsütoplasmaatilise domääni YVKM motiivi, mis arvatakse olevat üks CTLA4 rakusisest liikumist ja signaliseerimist reguleerivatest mehhanismidest (Chuang jt., 1999). Lisaks on näidatud, et CTLA4 assotsieerub fosfataasidega (Chuang jt., 2000; Madrenas jt., 2004), mis põhjustab mitmete T-raku retseptori kompleksi signaalraja komponentide defosforüleerimise (Lee jt., 1998). On teada, et hiires ekspresseeruv ligand-sõltumatu CTLA4 isovorm on samuti võimeline edastama T-rakkudele inhibitoorseid signaale, kuid liCTLA4 täpne funktsioon ja toimemehhanism pole selge (Vijayakrishnan jt., 2004; Walker ja Sansom, 2011).

Kuna CTLA4 ja CD28 seonduvad APC-de pinnal samade molekulidega, saab CTLA4 inhibeerida T-lümfotsüütide kostimulatsiooni konkureerides CD28-ga CD80/86 molekulidega seondumise pärast (Joonis 4c). On teada, et CTLA4 interaktsioon CD80/86 molekulidega on tugevam võrreldes CD28-ga (Collins jt., 2002). Kasutades lipiidse kaksikkihi mudelsüsteemi, visualiseerid Yokosuka jt (2010) aktiveeritud T-rakkudes CTLA4 akumulereerumise ja CD28-ga ligandide pärast konkureerimise immunoloogilises sünapsis. Sellegipoolest pole ka CTLA4 ja CD28 konkurentsitudel puudusteta. Nimelt ei seleta see mudel naiivsete T-rakkude aktivatsiooni inhibeerimist, kuna naiivsed konventsionaalsed T-rakud hakkavad CTLA4 ekspresseerima alles aktivatsioonijärgselt (Harper jt., 1991; Lindsten jt., 1993).



**Joonis 4. CTLA4 rakusisesed funktsioonimudelid.** CTLA4 arvatavaks rakusiseseks funktsiooniks on otseselt inhibeerida sama raku, mis CTLA4 ekspresseerib. Neid mõjusid vaadeldakse üldiselt kui inhibitoorseid signaale, kuid välja on pakutud erinevaid mudeleid. **a** CTLA4 genereerib signaali, mis segab T-raku retseptorilt või CD28-lt tulenevat aktiveerivat signaali, mis omakorda inhibeerib T-raku proliferatsiooni või IL-2 tootmist. **b** CTLA4 splaisvariant, mis ei saa seonduda ligandiga, inhibeerib T-raku aktiveerumist CTLA4 täispika vormiga seotud sarnase signaalraja kaudu. **c** CTLA4 ei signaalseeri, kuid olles kõrge afiinsusega CD28 ligandide konkurent, takistab CTLA4 CD28-st tulenevat aktiveeriva signaali teket (muudetud Walker ja Sansom, 2011).

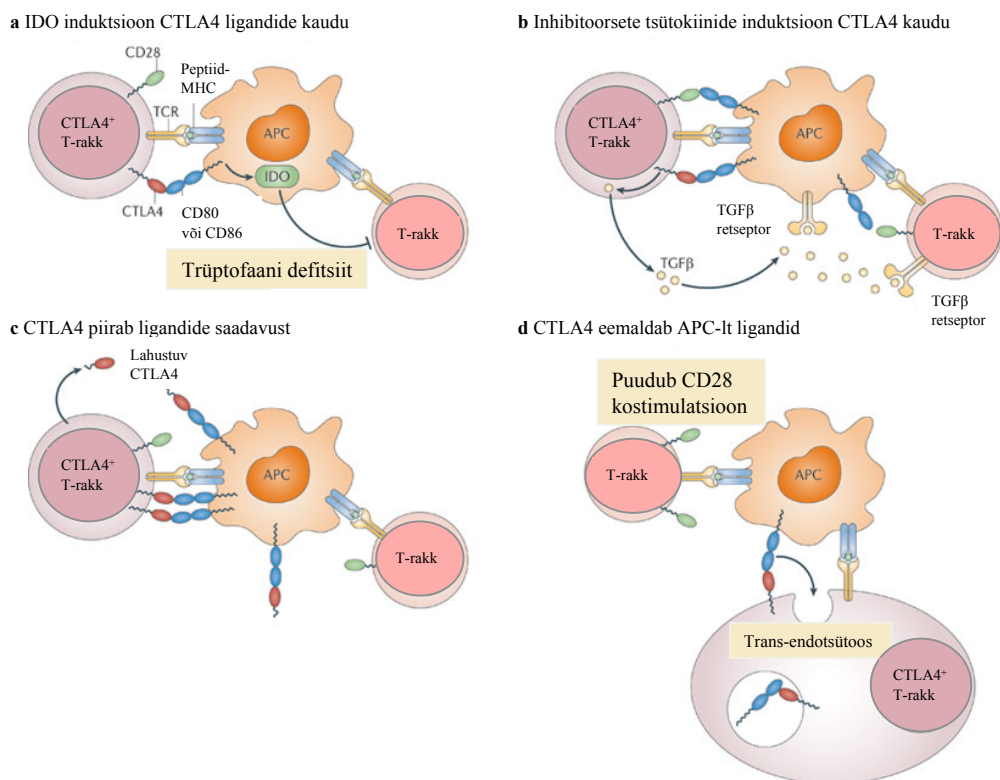
### 1.1.3.2 CTLA4 rakuvälised funktsiooni mehhanismid

Esimesed märgid CTLA4 võimalikust rakuvälisest funktsioonist tulid Bachmann'i jt (1999) poolt tehtud katsest, kus kasutati hiiri kimäärse luuüdiga, mis sisaldab CTLA4-defektseid ja metsiktüüpi rakke. Sellise luuüdiga hiirtel ei teki surmavat lümfoproliferatiivset sündroomi nagu CTLA4 *knockout* hiirtel, mis viitas normaalsete T-rakkude poolt produtseeritud haigust ärahoidvate faktorite olemasolule. Seda teooriat kinnitasid mitmed hilisemad uurimustööd. Bachmann jt (2001) leidsid, et luuüdi kimäärdes metsiktüüpi rakkude olemasolul funktsioneerivad antigeen-spetsiifilised CTLA4-defektsed T-rakud vastusena erinevatele patogeenidele normaalselt. Kasutades CTLA4-puudulike ja metsiktüüpi T-rakkude adoptiivset ülekannet kinnitasid Tivol ja Gorski (2002) Bachmann'i jt (1999) tulemusi, et

metsiktüüpi rakkude juuresolekul olid autoreaktiivsed perifeersed T-rakud efektiivselt supresseeritud.

CTLA4 rakuvälise funktsiooni molekulaarsed mehhanismid pole täielikult selged, kuid välja on pakutud mitmeid mudeleid. Üks lihtsamaid seletusi CTLA4 rakuvälisele rollile on olukord, kus CTLA4 interaktsioon CD80/86 molekulidega käivitab Treg-de suppressorfunktsiooni, mis mh tähendab ka immuunvastust inhibeeritavate molekulide, nt TGF $\beta$  sekreteerimist (Joonis 5b) (Walker ja Sansom, 2011). Kuigi on teada, et TGF $\beta$  on vajalik Treg-de funktsiooniks *in vivo* (Huber et al., 2004), ei pea Treg-d ise olema selle tsütokiini allikaks (Fahlén jt., 2005). Lisaks on näidatud, et CTLA4 ei reguleeri TGF $\beta$  produktsiooni, seega saab CTLA4 poolt vahendatud inhibitsioon toimuda TGF $\beta$ -st sõltumatult (Sullivan jt., 2001). Kuna T-rakud toodavad ja sekreteerivad ka CTLA4 lahustuvat vormi (Magistrelli jt., 1999; Oaks jt., 2000), mis sarnaselt flCTLA4-le seondub CD80/86 molekulidega, siis CD28 kostimulatoorse raja inhibeerimine on võimalik ka *in trans* (Joonis 5c). Samas on sCTLA4 roll immuunsüsteemi homöostaasi säilitamisel ja selle isovormi tootmise regulatsioon ebaselge (Walker ja Sansom, 2011).

Huvitav on Friedline'i jt (2009) poolt pakutud hüpotees, et Treg-d ei avalda oma mõju otseselt teistele T-rakkudele, vaid pigem moduleerivad APC-de aktiivsust. Seda hüpoteesi toetab fakt, et Treg-d võivad indutseerida APC-del trüptofaani kataboliseeriva ensüümiIDO aktiivsuse, põhjustades lokaalse trüptofaani defitsiidi ja seeläbi T-rakkude proliferatsiooni inhibitsiooni (Fallarino jt., 2003) (Joonis 5a). Teine mehhanism, mille kaudu Treg-d võivad APC-de fenotüüpi muuta, on T-raku retseptorite ligandide füüsiline eemaldamine APC-de pinnalt. Qureshi jt (2011) näitasid, et T-rakud on võimelised eemaldama APC-de pinnalt CTLA4-ga interakteeruvaid kostimulatoorseid CD80/86 molekule trans-endotsütoosi nimelise protsessiga nii *in vitro* kui *in vivo* (Joonis 5d). CD80/86 molekulid liiguvad kompleksis CTLA4-ga T-raku sisemusse, kus kostimulatoorsed molekulid lagundatakse lüsoosoomis. Ka teised uurimisgrupid olid varem näidanud, et Treg-d suudavad muuta CD80 ja CD86 molekulide ekspressiooni APC-de pinnal (Onishi jt., 2008; Wing jt., 2008). Arvestades CTLA4 suuremat afiinsust CD80/86 molekulide suhtes võrreldes CD28-ga ja CTLA4 pidevat transporti raku sisemuse ja plasmamembraani vahel, sobib trans-endotsütoosi hüpotees hästi CTLA4 rakuvälise rolli seletuseks. Kuigi CTLA4 funktsiooni seletamiseks on välja pakutud mitmeid erinevaid mehhanisme, on praeguseks kogunenud rohkem tõendeid teooria kasuks, et *in vivo* on CTLA4 immuunreaktsioone inhibeeriv mõju suunatud eelkõige teistele rakkudele. Samas, arvestades asjaolu, et CTLA4 ja CD28 konkureerivad CD80/86 molekulidega seondumise pärast, on tõenäoline, et vähemalt osaliselt funktsioneerib CTLA4 ka rakusiseselt.



**Joonis 5. CTLA4 rakuvälised funktsioonimudelid.** CTLA4 rakuvälised funktsioonid on seotud T-rakkude kaudse inhibeerimisega kas APC-de või teiste T-rakkude kaudu. **a** CTLA4 ja CD80/86 interaktsioon aktiveerib APC-des trüptofaani lagundava ensüümi IDO. T-rakkude inhibitsioon võib olla võimalik lokaalse trüptofaani defitsiidi või inhibitoorsete metaboliitide kogunemise tõttu. **b** CTLA4 signaalid stimuleerivad reguloorsete tsütokiinide, nt TGFβ, mis võib inhibeerida T-rakkude või APC-de funktsioone. **c** CTLA4 piirab CD80/86 kättesaadavust, mis takistab teistel T-rakkudel saada CD28 signaale. Selline efekt võib olla saavutatav kas reguloorsete T-rakkude pinnal oleva CTLA4 või lahustuva CTLA4 kaudu. **d** CTLA4 ekspressioon võib põhjustada ligandide trans-endotsütoosi. CTLA4 endotsütoosi tagajärjeks on terve ligandi eemaldamine APC-lt. Ligandide eemaldamine vähendab CD28 signaliseerimise võimalust ja seeläbi APC-de stimuloorset võimekust ning inhibeerib T-rakkude aktivatsiooni. Seda CTLA4 funktsiooni saavad vahendada reguloorsed T-rakud või CTLA4 ekspresseerivad aktiveeritud T-rakud (mugandatud Walker ja Sansom, 2011).

### 1.1.4 CTLA4 ekspressioon ja selle regulatsioon

Erinevalt CD28-st pole CTLA4 ekspressioon erinevates T-raku alapopulatsioonides ühesugune. Kui CD28 avaldub nii naiivsetes, puhkeseisundis kui aktiveeritud CD4<sup>+</sup> ja CD8<sup>+</sup> T-rakkudes, siis üldjuhul *CTLA4* mRNA ekspressioon indutseeritakse alles nende rakkude aktiveerumisel (Harper jt., 1991; Lindsten jt., 1993; Gibson jt., 2007). Maksimalne valgu lokaliseerumine rakupinnale toimub ca 48 h pärast stimulatsiooni (Linsley jt., 1992). CTLA4 ekspresseerib püsivalt ja suures hulgas immuunvastust supresseeriva toimega Treg-de alapopulatsioon (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>) (Sakaguchi jt., 1995; Hoffmann jt., 2006), mida on inimese perifeerse vere mononukleaarsetest rakkudest (PBMC-d) vaid ~ 1 kuni 3% (Takahashi jt., 2000). On näidatud, et Treg-del on suured rakusisesed CTLA4 varud, mis võimaldab CTLA4 kiiret (2 h jooksul) rakupinna ekspressiooni (Jago jt., 2004; Mead jt.,

2005). Ka CTLA4 isovormide ekspressioonis esinevad erinevused: puhkavates T-rakkudes on peamiseks detekteeritavaks transkriptiks sCTLA4 vorm, mille hulk väheneb rakkude aktiveerumisel erinevalt flCTLA4 vormist, mille hulk suureneb rakkude aktiveerumisel (Magistrelli jt., 1999; Oaks jt., 2000).

CTLA4 ekspressiooni kontroll, mis hõlmab CTLA4 avaldumise regulatsiooni erinevates T-rakkude alapopulatsioonides ja erinevate isovormide ekspressiooni regulatsiooni, on kompleksne protsess, mille mehhanismid pole täielikult selged. *CTLA4* 5' ülesvoolu paikneva järjestuse nii bioinformaatilise kui lutsiferaasi aktiivsuse analüüsiga on näidatud mitmete potentsiaalsete transkriptsiooni reguleerivate elementide olemasolu, sh AP-1, NF-κB jpt transkriptsioonifaktorite (TF) seondumiskohad (Ling jt., 1999). Kasutades kromatiini immunosadestamist (ChIP) on praeguseks kindlaks tehtud, et TF NFAT seondub T-lümfotsüütides *CTLA4* promooterile ja on oluline *CTLA4* ekspressiooni indutseerimise kontrollis (Gibson jt., 2007). *CTLA4* konstitutiivselt ekspresseerivates Treg-des koopereerub NFAT FOXP3-ga, mis on Treg-de diferentseerumise ja funktsiooni peamine regulaator. NFAT ja FOXP3 kompleks on vajalik Treg-de supressorfunktsiooni avaldumiseks, mis mh tähendab *IL2* ekspressiooni repressioonist ja *CTLA4* ekspressiooni indutseerimist (Wu jt., 2006).

Lisaks TF-te poolt vahendatud regulatsioonile, on oluline geeniekspressiooni regulatsioonimehhanism mRNA lagundamine. On näidatud, et *CTLA4* mRNA-l on suhteliselt lühike poolestusaeg ja mRNA stabiilsus sõltub kostimulaatorsete signaalide olemasolust. Ainult T-raku retseptori stimuleerimisel on mRNA poolestusaeg ca 4,6 h, kuid koos anti-CD28 stimulatsiooniga ca 8,9 h (Finn jt., 1997). Finn jt (1997) pakkusid välja hüpoteesi, et *CTLA4* mRNA stabiilsust mõjutab 3' mittetransleeritavas regioonis asuv (AT)<sup>n</sup> dinukleotiidne kordus, kuid see teooria pole hilisemates uurimustöodes kinnitust leidnud (Anjos ja Polychronakos, 2006). *CTLA4* geeni regulatsiooni täpsete mehhanismide väljaselgitamine on oluline, kuna võib pakkuda uusi lähenemisi immuunvastuses CTLA4 ekspressiooni ja funktsiooni moduleerimiseks.

## 2.1 Geeniekspressiooni epigeneetiline regulatsioon

Transkriptsiooni tasandil on geeniekspressioon reguleeritud aktivaatorite ja repressorite seondumisega spetsiifilistele DNA järjestustele ja neid interaktsioone võimaldava kromatiini struktuuri moduleerimisega, mis toimub epigeneetiliste modifikatsioonide vahendusel. Epigeneetika on õpetus geeniekspressiooni pärilikest muutustest, mis ei tulene



rakkudel, kuid metüleeritud *in vitro* TGF $\beta$  juuresolekul indutseeritud Treg-des. See võib olla põhjuseks, miks *in vitro* indutseeritud Treg-des pole *FOXP3* ekspressioon stabiilne. Samas on näidatud, et *in vivo* perifeerias indutseeritud Treg-des toimuvad ka stabiilse *FOXP3* ekspressiooni jaoks vajalikud epigeneetilised muudatused (Polansky jt., 2008). Ka *IL-2* ekspressiooni regulatsioonis on olulised epigeneetilised modifikatsioonid. Nimelt indutseerib *CD28* kostimulatsioon *IL2* promooteri ja võimendaja histoonide atsetülatsiooni, DNA demetüleerimise, kromatiini remodelleerimise ja spetsiifiliste TF-te mobiliseerimise (Murayama jt., 2006).

### **2.1.1 Histoonide post-translatsioonilised modifikatsioonid**

On kirjeldatud mitmeid erinevaid histoonide modifikatsioone, nt lüsiinide (K) atsetülatsioon, K ja arginiinide (R) metülatsioon, seriini (S) ning treoniini (T) fosforülatsioon (Joonis 6B). Histoonide modifikatsioonid mõjutavad kromatiini struktuuri ja on platvormiks spetsiifiliste valkude seondumisele, reguleerides sel moel mitmeid rakulisi protsesse, k.a geeniekspressiooni. Atsetülatsioonid neutraliseerivad histoonide positiivset laengut, nõrgestades seeläbi DNA ja histoonide interaktsioone. Nii histoon H3 kui H4 atsetülatsiooni seostatakse avatud kromatiini ja aktiivse transkriptsiooniga. Seda modifikatsiooni katalüüsivad histoonide atsetültransferaasid ja tunnevad ära bromodomääni sisaldavad valgud. Histoonide metüleerimine ei muuda nende laengut, kuid on seondumise platvormiks kromodomääni ja muid struktuurseid motiive sisaldavatele valkudele. Erinevalt histoonide atsetültransferaasidest on histoonide metülatsiooni katalüüsivad ensüümid kõrge spetsiifikaga (Kouzarides, 2007; Li jt., 2007; Shahbazian ja Grunstein, 2007).

#### **2.1.1.1 H3K4me1**

Histoon H3 4. lüsiini monometülatsioon (H3K4me1) on peamiselt assotsieeritud promooterist eemal asuvate *cis*-regulatoorsete elementide, võimendajatega (Heintzman jt., 2007; Heintzman jt., 2009). Ülegenoomsed analüüsid on aga näidanud, et H3K4me1 on väga levinud histooni modifikatsioon genoomis ja paikneb enamasti alal, mis on laiem kui seal paiknev regulatoorne element (Barski jt., 2007). Lisaks ei piisa H3K4me1 olemasolust vastava regulatoorse elemendi aktiivsuse hindamiseks (Creyghton jt., 2010). Uurides T-raku eellasrakkude diferentseerumises osalevaid varem defineeritud võimendajaid, leidsid Pekowska jt (2011), et aktiivsetel regulatoorsetel elementidel paiknes lisaks monometülatsioonile ka H3K4 di- ja trimetülatsioon ning RNA polümeraas II (Pol II). Kuna

H3K4me1 märgistas ka mitteaktiivseid võimendajaid, pakuti välja hüpotees, et vähemalt osade reguleerivate elementide kirjeldamiseks ei piisa ainult H3K4 monometülatiooni uurimisest.

#### **2.1.1.2 H3K4me3**

Histoon H3 4. lüsiini trimetülatiooni (H3K4me3) on tüüpiliselt seostatud aktiivsete promooteritega (Heintzman jt., 2007; Heintzman jt., 2009), kuid see modifikatsioon iseloomustab ka aktiivsete geenide kodeeriva ala 5' osa (Li jt., 2007), aktiivseid võimendajaid (Barski jt., 2007; Ernst jt., 2011; Pekowska jt., 2011) ning vaigistatud geenide promootereid (Mikkelsen jt., 2007; Ernst jt., 2011). H3K4me3 katalüüsivad metülaasid kuuluvad *trithorax*-grupi valkude hulka (Schuettengruber jt., 2007). Otsides seost histoonide modifikatsioonide ja transkriptsiooni masinavärgi vahel leidsid Ng jt (2003), et histooni metüültransferaasi Set1 assotsiatsioon Pol II varajase elongeeriva vormiga toob Set1 geenide 5' ossa, mis tekitab lokaalse H3K4me3 taseme tõusu. Lisaks on näidatud, et üldine TF TFIID seondub trimetüleeritud H3K4-ga nii *in vitro* kui *in vivo* (Vermeulen jt., 2007).

#### **2.1.1.3 H3K27me3**

Histoon H3 27. lüsiini trimetülatioon on geenide vaigistamisega assotsieeritud histooni modifikatsioon, märgistades nii represseritud geenide promootereid kui kodeerivat ala (Barski jt., 2007; Mikkelsen jt., 2007; Ernst jt., 2011). Peamiselt arengut reguleerivatel geenidel embrüonaalsetes tüvirakkudes, kuid ka diferentseerunud rakkudes, sh T-rakkudes esinevad geenide promooteritel kahevalentsed domäänid, mis sisaldavad nii aktiveerivat H3K4me3 kui represserivat H3K27me3 modifikatsiooni. Sellised bivalentsete promooterid on nõ stardivalmis, olles võimelised kiiresti reageerima keskkonnast tulevatele signaalidele (Roh jt., 2006; Barski jt., 2007; Mikkelsen jt., 2007). Uurides mononukleosoomi mass-spektromeetrilise analüüsiga leidsid Voigt jt (2012), et bivalentsetes domäänides saavad H3K4me3 ja H3K27me3 esineda sama nukleosoomi erinevatel H3 sabadel *in vivo*. Seda, kas need modifikatsioonid esinevad ka ühel ja samal histooni sabal, ei suudetud selle analüüsiga tuvastada. H3K27 trimetülatiooni katalüüsib *polycomb*-grupi valkude hulka kuuluv PRC2 (Schuettengruber jt., 2007). Seda protsessi inhibeervad aktiivsetele geenidele iseloomulikud histoonide modifikatsioonid, sh H3K4me3 (Voigt jt., 2012).

#### **2.1.1.4 H3K36me3**

Histoon H3 36. lüsiini trimetülatsioon on modifikatsioon, mis iseloomustab aktiivselt ekspresseeritavaid geene, täpsemalt transkriptsioonilist elongatsiooni (Barski jt., 2007; Mikkelsen jt., 2007; Ernst jt., 2011). H3K36 metüleeriv ensüüm assotsieerub Pol II elongeeriva vormiga, olles seeläbi üheks H3K36 trimetülatsiooni ja transkriptsiooni elongatsiooni ühendustülaks (Krogan jt., 2003). H3K36me3 modifikatsiooni tunnevad ära histoonide deatsetülaasikompleksid, mis hoiavad geenide kodeeriva regiooni hüpoatsetüleeritud vormis, takistades sellega transkriptsiooni initsiatsiooni geeni kodeerivas regioonis (Lee ja Shilatifard, 2007). H3K36me3 on leitud rohkem eksonites võrreldes intronitega, kusjuures geeni 3'-poolsetes eksonites rohkem kui geeni alguses. Seetõttu on selle modifikatsiooni funktsioonideks veel peetud ekson-intron piiride märgistamist ja splaisingu regulatsiooni (Kolasinska-Zwierz jt., 2009).

#### **2.1.2 CTLA4 ekspressiooni epigeneetiline regulatsioon**

*CTLA4* ekspressiooni epigeneetilisest regulatsioonist on teadmisi vähe. Iseloomustades *CTLA4* promooteri regiooni ja TF-i NFAT rolli *CTLA4* regulatsioonis leidsid Gibson jt (2007), et aktiveeritud inimese PBMC-des sisaldab *CTLA4* promooter atsetüleeritud histoon H3, mida seostatakse aktiivse geeni ekspressiooniga (Shahbazian ja Grunstein, 2007; Ernst jt., 2011). Uurides inimese aktiveeritud Tconv-de ja Treg-de DNA metülatsiooni leidsid Schmidl jt (2009) üle 100 erinevalt metüleeritud regiooni, mis peamiselt iseloomustavad rakutüübispetsiifilisi geene ja ei paikne promooteri vahetus läheduses. Arvati, et tegemist võib olla potentsiaalsete regulatoorsete elementidega, millest osad osutusidki juba varem kirjeldatud võimendajateks. Ka *CTLA4* lookuses leiti kaks sellist regiooni ca 13 ja 34 kb geenist ülesvoolu. Nagu enamusele teistele leitud erinevalt metüleeritud DNA regioonile, oli ka *CTLA4* puhul nendele aladele iseloomulik kahe rakutüübi vahel erinev H3K4 metülatsiooni muster. Viiteid epigeneetiliste modifikatsioonide olulisusele *CTLA4* ekspressiooni regulatsioonis võib leida ka Tian jt (2011) poolt tehtud uurimustööst, milles kaardistati ülegenoomne H3K4 mono- ja trimetülatsioon *in vitro* aktiveeritud ning kasvatatud Treg ja Tconv rakkudes. Ka siin leiti erinevusi mitmete T-rakkude spetsiifiliste geenide, sh *CTLA4* ja promooteritest eemal paiknevate regioonide modifikatsioonide muustris kahe T-raku alapopulatsiooni vahel.

## 2. Eksperimentaalosa

### 2.1 Töö eesmärgid

Käesoleva töö eksperimentaalse osa eesmärgiks on kontrollida hüpoteesi, et erinev *CTLA4* geeniekspressiooni dünaamika T-rakkude alapopulatsioonides on seotud *CTLA4* lookuse histoon H3 metülatsiooni mustritega. Selleks püstitati järgmised tööülesanded:

1. Analüüsida CD4+CD25+ Treg ja CD8+ ning CD4+ Tconv rakkudes histooni modifikatsioonide mustreid (H3K4 mono- ja trimetülatsioon ning H3K27 ja H3K36 trimetülatsioon) *CTLA4* geeni promooteril, kodeerivas alas ja geenist 5' ja 3' suunas asuvatel aladel.
2. Võrrelda *CTLA4* transkriptsiooni dünaamikat histoon H3 metülatsiooni mustritega *CTLA4* lookuses aktiveeritud Treg ja Tconv rakkudes.

### 2.2 Materjalid ja meetodika

#### 2.2.1 T-rakkude alapopulatsioonide sortimine

Kasutati Tartu Ülikooli Kliinikumi Verekeskusest saadud kolme vabatahtliku terve doonori trombotsüütide-leukotsüütide kontsentraati, nn *buffy coat*, millest eraldati Ficoll-Paque gradiendis tsentrifuugimisega perifeerse vere mononukleaarsed rakud (PBMC). *Buffy coat* lahjendati ~ 2 korda PBS-ga (Lonza). ~ 35 ml vere-PBS-i segu pipeteeriti ettevaatlikult, vältides fraktsioonide segunemist 10 ml Ficoll-Paque PLUS lahusele (GE Healthcare Life Sciences). Proove tsentrifuugiti (5810 R, Eppendorf) 35 min pidurduseta 400 g toatemperatuuril. Vereplasma ja Ficoll'i vahepealne mononukleaarseid rakke sisaldav kiht koguti uude 50 ml tuubi. Kogutud rakke pesti lisades PBS-i 50 ml-ni ja tsentrifuugides 15 min pidurdusega 200 g toatemperatuuril. Seejärel eemaldati supernatant ja korrati pesu PBS-ga, tsentrifuugides proove 15 min pidurdusega 300 g jahtuvas tsentrifuugis, olles eelnevalt seadistanud tsentrifuugi temperatuuri 10°C peale. Pärast supernatandi eemaldamist resuspendeeriti rakud 10 ml-s rakkude immunomagneetilise sorteerimise puhvris RB (1x PBS, 0,5% BSA, 2 mM EDTA). Naiivsed CD4+, reguloorsed CD25+CD4+ ja CD8+ T-rakud eraldati immunomagneetilise rakkude sorteerimise meetodil (MACS), kasutades vastavaid Miltenyi Biotec *kit'e*. CD4+ ja reguloorsete T-rakkude eraldamiseks kõigepealt rikastati CD4+ rakud negatiivse selektsiooniga, kasutades *CD4<sup>+</sup> T Cell Isolation Kit'i*

vastavalt tootja ettekirjutustele. Regulaatorsed T-rakud eraldati positiivse selektsiooniga, kasutades *CD25<sup>+</sup>CD49d Regulatory T Cell Isolation Kit*'i vastavalt tootja soovitudele. Naiivsed konventsionaalsed CD4<sup>+</sup> T-rakud eraldati eelnevalt rikastatud CD4<sup>+</sup> rakkude fraktsioonist negatiivse selektsiooniga, kasutades *Naive CD4<sup>+</sup> T Cell Isolation Kit II* ja konventsionaalsed CD8<sup>+</sup> T-rakud eraldati PBMC-dest negatiivse selektsiooniga, kasutades *CD8<sup>+</sup> T Cell Isolation Kit*'i vastavalt tootja soovitudele. Sorteeritud rakud loendati ning ekspressioonianalüüsi jaoks rakusade külmutati ja säilitati -80°C juures. Sorteeritud T-rakkude alapopulatsioonide puhtust kontrolliti voolutsütomeetriga. Selleks märgistati rakud lisades fluorokroomiga konjugeeritud pinnamolekulide vastaseid antikehasid järgmiste antigeenide vastu: Treg-dele CD4 (FITC, BD Biosciences), CD25 (PE, Miltenyi Biotec) ja CD127 (APC, BioLegend), CD4<sup>+</sup> naiivsetele Tconv-dele CD4 (APC, BD Biosciences), CD25 (PE, Miltenyi Biotec) ja CD45RA (FITC, BD Biosciences) ning CD8<sup>+</sup> Tconv-dele CD8 (FITC, BD Biosciences) ja CD4 (PercP-Cy5.5, BD Biosciences) vastavalt tootja juhistele. Rakke ja antikehi inkubeeriti pimedas 15 min toatemperatuuril, lisati 2 ml RB puhvrit ja tsentrifuugiti 300 g (5810 R, Eppendorf) 10 min. Seejärel eemaldati supernatant, resuspendeeriti põhjas olevad rakud vorteksiga, lisati 200 µl RB puhvrit ja analüüsiti voolutsütomeetriga. Sorteeritud alapopulatsioonide puhtused on toodud tabelis 1.

Stimulatsiooni katse tarvis T-rakkude alapopulatsioonide sorteerimiseks märgistati PBMC-d fluorokroomiga antikehadega järgmiste pinnamolekulide vastu: Treg-de sortimiseks CD25 (PE, Miltenyi Biotec), CD127 (APC, BioLegend), CD45RA (FITC, BD Biosciences) ja CD4 (PercP-Cy5.5, BD Biosciences) vastavalt tootja juhistele ning naiivsete ja mälu CD4<sup>+</sup> ja CD8<sup>+</sup> Tconv-de sortimiseks CD4 (PercP-Cy5.5, BD Biosciences), CD8 (APC, BD Biosciences), CD45RA (PE, BD Biosciences) ja CD62L (FITC, BD Biosciences) vastavalt tootja juhistele. Treg-d sorditi kui CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>,CD127<sup>-</sup> rakud, naiivsed T-rakud kui CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> ja CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> ning efektor-mälu T-rakud kui CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> ja CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> rakud.

**Tabel 1.** MACS-ga sorteeritud T-rakkude alapopulatsioonide puhtused.

ChIP	T-rakkude alapopulatsioonide puhtused		
	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Treg	CD4 <sup>+</sup> naiivne Tconv	CD8 <sup>+</sup> Tconv
I	80%	90%	80%
II	56%	74%	73%
III	86%	87%	68%

### 2.2.2 Rakkude fikseerimine

Kromatiini immunosadestamise katse jaoks fikseeriti rakud formaldehüüdiga, säilitamiseks valkude ja DNA interaktsioonid. Selleks resuspendeeriti rakud 500 µl-s PBS-s ja lisati 13,5 µl 36,5%-list formaldehüüdi (lõppkontsentratsioonini ~ 1% v/v), proov segati ettevaatlikult ja inkubeeriti toatemperatuuril 8 min. Ristsidemete moodustumise peatamiseks lisati proovidele 57 µl 1,25 M glütsiini lahust (lõppkonts. 125 mM), segati ja inkubeeriti 5 min toatemperatuuril. Inkubatsiooni lõppedes lisati 500 µl PBS-i ja tsentrifuugiti 400 g (5415 R, Eppendorf) 10 min 4°C juures. Pärast supernatandi eemaldamist pesti rakke veelkord 1 ml PBS-ga, tsentrifuugides 400 g 10 min 4°C juures. Pärast supernatandi eemaldamist säilitati rakusadet -80°C juures.

### 2.2.3 Kromatiini immunosadestamine (ChIP)

Kromatiini immunosadestamise katse teostamisel lähtuti Q<sup>2</sup>ChIP protokollist (Dahl ja Collas, 2007). Iga ChIP reaktsiooni jaoks võeti 11 µl proteiin A-ga kaetud magneetilisi kerakesi (*Magna ChIP™ Protein A Magnetic Beads*, Millipore), millelt eemaldati puhver pärast kerakeste magneetilist (*DiaMag02*, Diagenode) kinnipüüdmist ja pesti kaks korda RIPA puhvril (10 mM Tris-HCL, pH 7,5, 1 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 1% Triton X-100, 0,1% SDS, 0,1% Na-deoksükolaat, 140 mM NaCl). Ühe ChIP reaktsiooni jaoks vajalik pestud kerade hulk resuspendeeriti 10,5 µl-s RIPA puhvril. Antikehade seondamiseks magneetilistele kerakestele võeti ühe ChIP reaktsiooni kohta 10 µl RIPA puhvril resuspendeeritud kerakesi, millele lisati 90 µl RIPA puhvrit ja 0,4 µg αH3K4me1 (ab8895, Abcam), 0,5 µg αH3K4me3 (07-473, Millipore), 0,5 µg αH3K36me3 (ab9050, Abcam), 0,5 µg αH3 (ab1791, Abcam), 0,5 µg αIgG (PP64, Millipore) ning 1,1 µg αH3K27me3 (pAB-069-050, Diagenode) antikeha. Kerakeste ja antikeha segu inkubeeriti 2 h rotaatoril (Bio RS-24, Biosan) kiirusel 30 rpm 4°C juures. Inkubatsiooni lõppedes tsentrifuugiti (5415 R, Eppendorf) kerakesi lühidalt ja pärast magnetile asetamist eemaldati puhver.

Ühe ChIP reaktsiooni jaoks kasutati  $2 \times 10^4$  eelnevalt formaldehüüdiga fikseeritud rakku. Selleks lisati  $2 \times 10^5$  rakule 80 µl lüüsipuhvrit [50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA, 1% SDS, 1x laia spektriga proteaaside inhibiitorite segu (*100x ProteoBlock Protease Inhibitor Cocktail #R1321*, Fermentas)], inkubeeriti 5 min jääl ja kromatiini fragmenteerimiseks sonikeeriti Bioruptor® UCD-200 sonikaatoril (Diagenode). 80 µl-s lüüsipuhvril  $2 \times 10^5$  rakku sisaldavad 1,5 ml Eppendorf tuubid asetati jää-vee seguga vanni ja sonikeeriti 16 min 30 sek-liste ON ja OFF tsüklitena kõrgeima võimsuse e 200 W (*High*)

juures. Purustatud kromatiinile lisati 920 µl RIPA puhvrit, mis sisaldab 1x laia spektriga proteaaside inhibiitorite segu (*100x ProteoBlock Protease Inhibitor Cocktail #R1321*, Fermentas). Sellega saavutati rakkude tihedus  $2 \times 10^5$  rakku/ml, mis võimaldas kasutada ühe ChIP-i reaktsiooni jaoks 100 µl e  $2 \times 10^4$  raku purustatud kromatiini. 100 µl purustatud lahjendatud kromatiini lisati antikehaga kaetud kerakestele ja segu inkubeeriti üleöö rotaatoril 30 rpm 4°C juures. 10 µl purustatud lahjendatud kromatiini kasutati ChIP-i katses 10%-lise *input*'ina, mis säilitati vahepeal -24°C juures.

Inkubatsiooni lõppedes pesti kerakesi kõigepealt kolm korda RIPA puhvriga. Selleks eemaldati proovid rotaatorilt, tsentrifuugiti lühidalt, asetati magnetile, eemaldati supernatant, lisati 100 µl-t pesupuhvrit ja inkubeeriti 4 min rotaatoril 30 rpm 4°C juures. Viimane e 4. pesu toimus 100 µl-s TE puhvris (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA). Pärast viimast pesu tõsteti proovid ümber uude tuubi, asetati magnetrestile ning eemaldati puhver. DNA elueerimiseks lisati nii 10 µl-le *input* proovile kui kromatiini fragmentidega magnetkerakestele vastavalt 90 ja 100 µl DNA isoleerimispuhvrit (*DNA Isolation Buffer, LowCell# Chip kit protein Ax16 kch-maglow-A16*, Diagenode), millele lisatud proteinaas K (A3830, Applichem) lõppkontsentratsioon oli 100 µg/ml. Proove inkubeeriti kõigepealt 15 min 55°C (*Dri-Block®*, Techne) juures, seejärel 15 min 100°C juures. Inkubatsiooni lõppedes tsentrifuugiti proove 5 min 14 000 rpm ja 4°C juures ning tõsteti supernatandid uutesse tuubidesse. Elueeritud DNA-d sisaldavad supernatandid säilitati järgmiste etappideni -24°C juures.

#### **2.2.4 Kromatiini fragmentide pikkuse kontroll**

Kasutati formaldehüüdiga fikseeritud (kirjeldatud punktis 2.2.2) PBMC-sid, millest olid eraldatud CD14+ monotsüüdid.  $5 \times 10^5$  rakku lüüsi ja sonikeeriti 16 min punktis 2.2.3 toodud tingimustes. Ristsidemete lõhkumiseks lisati proovile 320 µl elueerimispuhvrit (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 5 mM EDTA, 50 mM NaCl) ja SDS-i lõppkontsentratsioonini 1% ning proteinaas K-d (Applichem A3830) lõppkontsentratsioonini 50 µg/ml. Seejärel inkubeeriti proovi termomikseril (*Thermomixer® comfort*, Eppendorf) 2 h 68°C ja 1300 rpm juures. DNA puhastati fenool-kloroform meetodil. Proovile lisati 400 µl fenooli ja tsentrifuugiti 15 000 g (5415 D, Eppendorf) 5 min toatemperatuuril faaside eraldamiseks. Tekkinud vesifaas tõsteti ümber uude tuubi ja lisati 400 µl kloroformi ning tsentrifuugiti uuesti 15 000 g 5 min toatemperatuuril. Tekkinud vesifaas tõsteti ümber uude tuubi ja lisati 1/10 vesifaasi ruumalast 3M NaAc, 2,5 vesifaasi ruumalat jääkülma 96%-list etanooli ning 20 µg glükogeni

(Fermentas). DNA sadestati  $-80^{\circ}\text{C}$  juures 1,5 h ja seejärel tsentrifugiti proovi 16 000 g (maksimum pööretel) 15 min  $4^{\circ}\text{C}$  juures. Supernatandi eemaldamisel pesti sadet 2 korda 1 ml jääkülma 70%-lise etanooliga, tsentrifugides proovi pesude vahepeal 16 000 g (maksimum pööretel) 10 min  $4^{\circ}\text{C}$  juures. DNA sade lahustati 15  $\mu\text{l}$ -s TE puhvrts (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA). Sonikeeritud proovid analüüsiti geelelektroforeesiga. Selleks pipeteeriti 1,5%-le TBE-agarosgeelile 10  $\mu\text{l}$  sonikeeritud DNA-d, 1  $\mu\text{g}$  DNA markerit [*pUC19 DNA/MspI (HpaII)*, 23, Fermentas] ja kontrolliks 3  $\mu\text{l}$  sonikeerimata DNA-d. Proovidel lasti joosta 30 min 150 V pinge all elektroforeesi aparaadil (*HE 33 Mini Submarine Unit, EPS 301 Power Supply*, GE Healthcare Life Sciences).

### 2.2.5 Rakkude stimuleerimine

Punktis 2.2.1 kirjeldusele vastavalt eraldatud T-rakkude alapopulatsioonid suspendeeriti söötmes RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute medium*), millele oli lisatud 10%-list  $56^{\circ}\text{C}$  juures inaktiveeritud vasikaloote seerumit, 2 mM glutamiini, 100 U/ml penitsilliini ja 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  streptomütsiini (kõik söötme komponendid pärinesid firmast PAA Laboratories), ning jaotati iga ajapunkti jaoks nii, et lõpuks oli ümara põhjaga 96 kannuga mikrotiiterplaadil ühes kannus 150  $\mu\text{l}$ -s söötmes kas  $2 \times 10^5$  Treg rakku,  $1,5 \times 10^5$  naiivset  $\text{CD4}^+$  Tconv,  $9,4 \times 10^4$   $\text{CD4}^+$  mälu Tconv,  $1,5 \times 10^5$  naiivset  $\text{CD8}^+$  Tconv või  $1,5 \times 10^5$  mälu  $\text{CD8}^+$  Tconv rakku. Rakkude stimuleerimiseks kasutati Miltenyi Biotec'i *T Cell Activation/Expansion Kit*'i biotinüleeritud  $\text{CD2}^-$ ,  $\text{CD3}^-$  ja  $\text{CD28}$ -vastaste antikehadega partikleid vastavalt tootja juhiste. Sellised partiklid mimikeerivad antigeene presenteerivaid rakke, aktiveerides naiivseid ja puhkavaid T-rakke. 150  $\mu\text{l}$ -le rakke sisaldavale söötmele lisati 50  $\mu\text{l}$ -s sama söödet, mis sisaldas optimaalseks aktivatsiooniks sobiliku 1:2 partkli-raku suhte saavutamiseks vajaliku arvu partikleid.  $\text{CD8}^+$  T-rakkude alapopulatsioonide stimulatsiooniks lisati ka rekombinantset inimese IL-2 lõppkontsentratsioonini 10 u/ml. Rakke inkubeeriti  $37^{\circ}\text{C}$  ja 5-10%  $\text{CO}_2$  juures 0, 4, 8, 16, 30, 50 ja 72 h. Vastava ajapunkti möödudes suspendeeriti plaadil olevad rakud ja tõsteti ümber uude tuubi. Plaadi kannusid pesti kaks korda PBS-ga. Kogutud rakud tsentrifugiti 400 g (5415 R, Eppendorf) 10 min  $4^{\circ}\text{C}$  juures, eemaldati supernatant ja geeniekspressiooni analüüsi jaoks rakusade säilitati  $-80^{\circ}\text{C}$  juures.

### 2.2.6 RNA eraldamine ja cDNA süntees

RNA eraldamiseks kasutati Qiagen'i *RNeasy Micro Kit*'i vastavalt tootja juhiste ja eraldatud RNA elueeriti 14  $\mu\text{l}$ -s RNAasi- ja DNAasi-vabas vees (Fermentas) ja säilitati  $-80^{\circ}\text{C}$

juures. ChIP-i katses kasutatud rakkudest RNA eraldamisel teostati ka DNase I töötlus. cDNA sünteesimiseks kasutati 11 µl RNAd ja 500 ng oligo(dT)<sub>18</sub> praimerit vastavalt *SuperScript™ Reverse Transcriptase kit*'i (Life Technologies) tootja juhistele. Ribonukleaaside inhibiitoritena kasutati Fermentas'e *RiboLock™ Ribonuclease Inhibitor*'t vastavalt juhendile. Saadud cDNA säilitati -24°C juures.

### 2.2.7 Kvantitatiivne PCR (qPCR)

ChIP-i proovid analüüsiti qPCR-ga 384-kannulisel mikrotiiterplaadil ViiA™ 7 masinaga (Applied Biosystems) kasutades programmi: ensüümi aktivatsioon 95°C juures 10 min, mille järgnes 40 tsüklit denaturatsiooni 95°C juures 15 sek ja praimerite seondumist ning produkti paljundamist 60°C juures 1 min. Reaktsiooni spetsiifilisuse hindamiseks järgnes sellele dissotsiatsioonianalüüsi etapp 95°C juures 15 sek. Histonide modifikatsioonide ChIP-i proovid analüüsiti 4 paralleelil. 46,6 µl qPCR-i segu sisaldas 6,6 µl 5 mM nii *F* kui *R* praimerite lahust (nii *F* kui *R* praimerite lõppkontsentratsioon qPCR-i segus oli 691 nM), 23,2 µl Fermentas'e *2x Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix*'i, 6,6 µl DNA-d ja 10,2 µl RNAasi- ja DNAasi-vaba H<sub>2</sub>O-d (Fermentas), mis jagati 10 µl kaupa neljale paralleelile. Kolmel paralleelil analüüsiti kontroll-IgG ChIP proovid ja võimaliku PCR-i segu kontaminatsiooni detekteerimiseks plaadile lisatud iga praimeripaari kontrollproovid, mis sisaldasid DNA asemel RNAasi- ja DNAasi-vaba H<sub>2</sub>O-d. 35 µl vastavat PCR-i segu sisaldas 5 µl 10 mM praimerite lahust (nii *F* kui *R* praimerite lõppkontsentratsioon oli 691 nM), 17,4 µl Fermentas'e *2x Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix*'i, vastavalt 5 µl DNA-d või H<sub>2</sub>O-d ja 7,6 µl RNAasi- ja DNAasi-vaba H<sub>2</sub>O-d (Fermentas), mis jagati 10 µl kaupa kolmele paralleelile. Tulemusi analüüsiti võrdleva Ct meetodiga, kasutades valemit  $2^{-\Delta Ct}$  ja normaliseeriti esmalt *input*'i ja seejärel nukleosoomide tiheduse e totaalse histoon H3 suhtes.

*CTLA4* ja *FOXP3* ekspressioonianalüüsi ning stimuleeritud rakkude geeniekspressioonianalüüsi 31 µl-ne qPCR-i segu sisaldas 1 µl cDNA-d, 1,45 µl 10 µM praimerite lahust (milles kummagi praimerite kontsentratsioon oli 5 µM ja lõppkontsentratsioon 234 nM), 15,50 µl Fermentas'e *2x Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix*'i ja 13,05 µl 7,6 µl RNAasi- ja DNAasi-vaba H<sub>2</sub>O-d (Fermentas), mis jagati 10 µl kaupa kolmele paralleelile 384-kannulisele mikrotiiterplaadile. Tulemusi analüüsiti võrdleva Ct meetodiga, kasutades valemit  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak ja Schmittgen, 2001). ChIP-i rakkude *CTLA4* ja *FOXP3* ekspressioonianalüüsi tulemused normaliseeriti esmalt koduhoidja *ACTB* suhtes ( $\Delta Ct$ ) ja seejärel vastavalt madalaima  $\Delta Ct$ -ga Treg-i *CTLA4* või *FOXP3* väärtuse suhtes ( $\Delta\Delta Ct$ ).

Stimuleeritud T-rakkude geeniekspressioonianalüüsi tulemused saadi normaliseerides uuritava geeni väärtus esmalt koduhoidja *B2M* suhtes ja seejärel madalaima  $\Delta Ct$  väärtusega rakupopulatsiooni 0 h ajapunkti väärtuse suhtes. Võimaliku kontaminatsiooni detekteerimiseks lisati plaadile ka kontrollproovid, mis sisaldasid cDNA asemel RNAasi- ja DNAasi-vaba vett (Fermentas).

Praimerite disainimisel kasutati programme PerlPrimer (Marshall, 2004) ja Primer3 (Rozen ja Skaletsky, 2000) ning valmistati firmades TAG Copenhagen A/S ja Metabion International AG. Tabelis 2 toodud ekspressioonianalüüsi praimerid disainimisel arvestati, et vähemalt üks praimeritest hõlmaks ekson-ekson piiri. *CTLA4* ChIP-i praimerid (Tabel 3) disainiti Schmidl'i jt (2009) ning Tian'i jt (2011) tööde põhjal katmaks erinevaid regioone nii *CTLA4* geeni sees, geenist 5' ja 3' suunas ning peegeldamaks võimalikke erinevusi histoonide modifikatsioonide tasemetes Tconv ja Treg-de vahel (Joonis 8). ChIP-i kontrollpraimerid disainiti ENCODE-i histoonide modifikatsioonide andmete põhjal katmaks geeniregiooni, kus uuritava modifikatsiooni tase oleks võimalikult kõrge.

**Tabel 2.** T-rakkude aktivatsiooni ja alapopulatsioonide puhtuse kontrollimiseks kasutatud ekspressioonipraimerite järjestused.

Geen	Forward praimer	Reverse praimer
<i>CTLA4</i>	5'-TGAACCTGGCTACCAGGACC-3'	5'-CCACGTGCATTGCTTTGC-3'
<i>FOXP3</i>	5'-TGGAGAAGGAGAAGCTGAGTGC-3'	5'-CCCTTGTCGGATGATGCCA-3'
<i>MYC</i>	5'-CCCTACCCTCTCAACGACAG-3'	5'-TTCTTGTTCTCCTCAGAGTCG-3'
<i>B2M</i>	5'-TGCTCGCGCTACTCTCTCT-3'	5'-TCCATTCTCTGCTGGATGAC-3'
<i>ACTB</i>	5'-CTGGAACGGTGAAGGTGACA-3'	5'-CGGCCACATTGTGAACCTTG-3'

**Tabel 3.** ChIP-i praimerite järjestused.

Geen	Forward praimer	Reverse praimer
<i>CTLA4</i>		
-31308	5'-GTTTATCCATTTCAGTCATCCAC-3'	5'-CTGTCTTTCTCTGCCAACTC-3'
-23277	5'-TGGAAGATTCAAGAGGTGGA-3'	5'-GACCAAAGAACAACAGTGACC-3'
-13664	5'-TGGCCACTGGACTGCCTCCAT-3'	5'-AGGGCTTCTGGCCTCAGCGA-3'
-70	5'-TGGCTTGTTTTGTTTCAGTTGA-3'	5'-ACGAGAAAGGAAGCCGTGGGTTTAG-3'
+199	5'-CTGAACACCGCTCCATAAA-3'	5'-TTGCAGAAGACAGGGATGAA-3'
+3208	5'-TGAGCAAAGCCATTTCAGT-3'	5'-CTTAAAGAGAATGTCCACAGTCC-3'
+3638	5'-AGGGAGGCTCTGCTTTGTTT-3'	5'-CACCACACTCACCATTTTGC-3'
+4905	5'-ACCAGCTAGGGACCCAATATGTGTT-3'	5'-TTCTGGCTCTGTTGGGGCA-3'
+5940	5'-AGCCACAGCTGGTGGTATCTGAGT-3'	5'-TGGGCCCATCGAACTGGAGC-3'
+19468	5'-GTCCCCTTTCCCAAGAGCGGC-3'	5'-AGGGTCCTTGGGCCTACCTGA-3'
<i>GAPDH</i>	5'-CTGCACCACCAACTGCTTAG-3'	5'-TCCCCACCTTGAAAGGAAAT-3'
<i>B2M</i>	5'-CTCTCTCGTCCGTGACTTC-3'	5'-GCCGAAAGGGGCAAGTAG-3'
<i>MYOD1</i>	5'-GTAGGAGAGGCGGGAGAACT-3'	5'-TAGGTCTGCGAGGGTCTCAC-3'

## 2.2.8 ChIP-i varieeruvuse koefitsiendi arvutamine

Viidi läbi kolm iseseisvat ChIP-i katset (nagu punktis 2.2.3 kõikide antikehadega) ühest ja samast algmaterjalist, milleks oli ühe doonori naiivsed CD4+ ja CD8+ Tconv rakud. Kasutatud rakud eraldati doonori verest nagu ChIP-i katse rakud (kirjeldatud punktis 2.2.1). Kasutatud T-rakkude alapopulatsioonide puhtused on toodud tabelis 1, rida I. ChIP-i proovid analüüsiti ühe qPCR-ga (nagu punktis 2.2.7) ühe kuni kahe valitud *CTLA4* praimeripaariga, mis iseloomustab regiooni, kus vastava modifikatsiooni tase on suhteliselt kõrge. Varieeruvuse koefitsient (CV) arvutati valemiga  $CV(\%) = \sigma / \mu * 100$ , kus  $\mu$  on kolme ChIP-i iga modifikatsiooni % H3-st väärtuste keskmine ja  $\sigma$  on kolme ChIP-i % H3-st väärtuste standardhälve.

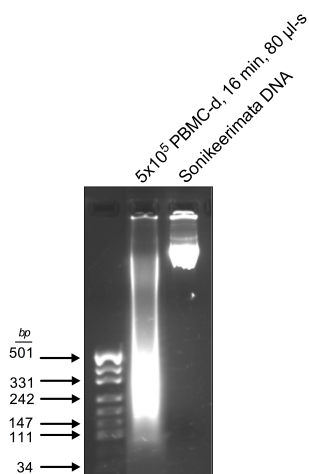
## 2.2.9 Statistiline analüüs

ChIP-i ning *CTLA4* ja *FOXP3* ekspressioonianalüüsi graafikutel on toodud kolme iseseisva katse põhjal saadud tulemuste keskmine  $\pm$  standardviga (SEM). Stimuleeritud T-rakkude geeniekspressiooni graafikutel on toodud ühe katse qPCR-i triplikaatide keskmine. Tulemuste statistiline analüüs viidi läbi programmeerimiskeskonnas R (versioon 2.13.1) (The R Foundation for Statistical Computing, <http://www.r-project.org>). Dispersioonanalüüsiga (ANOVA) uuriti, kas Treg ja kahe Tconv rakupopulatsiooni vahel esineb statistiliselt olulisi erinevusi histoonide modifikatsioonide tasemes. Statistilise olulise leidmisel ( $p \leq 0,05$ ) teostati järgmisena ChIP-i katse tulemustega paardumata kahesuunaline t-test Treg vs CD4+ naiivne Tconv ja Treg vs CD8+ Tconv paaride vahel. *CTLA4* ja *FOXP3* ekspressioonianalüüsi tulemustega teostati paardunud kahesuunaline t-test. Saadud p väärtused korrigeeriti Holm-Bonferroni mitmese testimise korrigeerimisega. Joonistel on esitatud korrigeerimata p väärtused. Graafikute joonistamiseks kasutati programmi GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc).

## 2.3 Tulemused

### 2.3.1 Fragmentide suuruse kontroll

ChIP katseks sobiliku pikkusega, ca 200 kuni 1000 aluspaari pikkuste kromatiini fragmentide saamiseks sonikeeriti rakke 80  $\mu$ l-s lüüsipuhvril 16 min 30 sekundiliste *ON* ja *OFF* tsüklitega kõrgeima võimsuse (200 W) juures ning lühikese proovide tsentrifugimisega iga 4 min järel. Kromatiini fragmentide suuruse kontrolliks sonikeeriti samades tingimustes  $5 \times 10^5$  formaldehüüdiga fikseeritud monotsüütideta PBMC-d. Proovidega teostati ristsidemete lõhkumine ja proteinaas K töötlus ning puhastatud DNA-d analüüsiti geelelektroforeesiga 1.5%-sel agarosgeelil. Joonisel 7 on näha, et ChIP-i proovide puhul kasutatud 16 minutiline sonikeerimine produtseerib ChIP-i analüüsiks sobiliku pikkusega kromatiini fragmendid, millest enamus jääb vahemikku 150 kuni 500 aluspaari.



**Joonis 7. Sonikeerimise efektiivsuse kontroll.**  $5 \times 10^5$  formaldehüüdiga fikseeritud monotsüütideta PBMC-d sonikeeriti 80  $\mu$ l-s lüüsipuhvril kõrgeima võimsuse (200 W) juures 16 min 30 sekundiliste *ON* ja *OFF* tsüklitega, tsentrifugides proove lühidalt iga 4 min järel. Saadud proovidega tehti ristsidemete lõhkumine ja proteinaas K töötlus ning puhastatud DNA-d analüüsiti geelelektroforeesiga 1.5%-lisel agarosgeelil. 1. rajal on näha DNA marker, 2. rajal sonikeeritud proov ja 3. rajal sonikeerimata DNA. *bp* (*basepair*) - aluspaar

### 2.3.2 ChIP-i varieeruvuse koefitsiendi arvutamine

ChIP-i protokollide etappide rohkus ja keerukus võib produtseerida kõrgelt varieeruvaid tulemusi, mille tõlgendamine võib osutuda problemaatiliseks. Hindamiseks ChIP-i tulemuste korratavust, tehti samast algmaterjalist kolm iseseisvat ChIP-i. H3K4me1/me3 ja H3K36me3 modifikatsiooni jaoks kasutati naiivseid CD4<sup>+</sup> Tconv rakke ja H3K27me3 jaoks CD8<sup>+</sup> Tconv

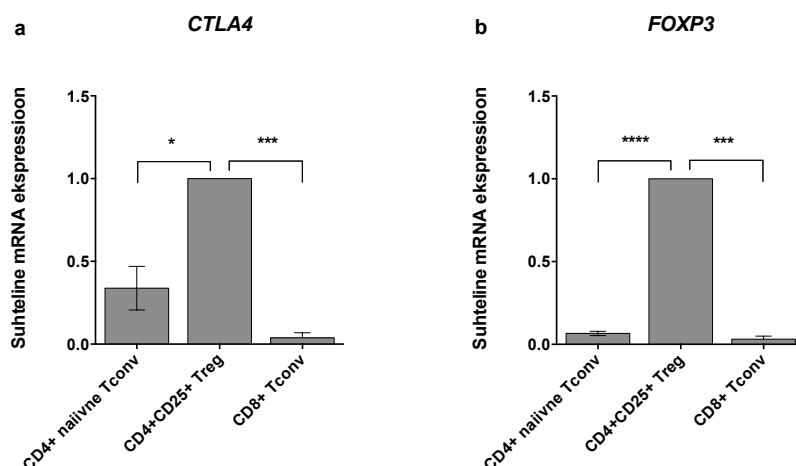
rakke. Iga modifikatsiooni kõik ChIP-i proovid analüüsiti ühe qPCR-ga kasutades ühte kuni kahte valitud *CTLA4* praimeripaari iseloomustamiseks vastava modifikatsiooni suhteliselt kõrgema tasemega regiooni. ChIP-i CV väärtused iga uuritud histooni modifikatsiooni kohta on toodud tabelis 4.

Tabel 4. ChIP-i varieeruvuse koefitsiendid.

Histooni modifikatsioon	Varieeruvuse koefitsiendid	
	Naiivsed CD4+ Tconv	CD8+ Tconv
H3K4me1	2.10 - 4.80%	-
H3K4me3	3.30 - 5.08%	-
H3K27me3	-	7.00 %
H3K36me3	9.12%	-

### 2.3.3 *CTLA4* ja *FOXP3* ekspressioon erinevates T-rakkude alapopulatsioonides

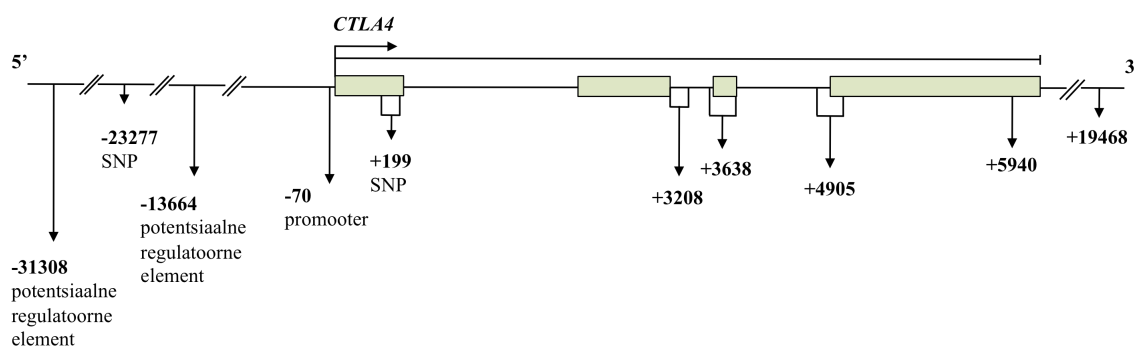
ChIP-i katses kasutatud T-rakkude alapopulatsioonides kontrolliti *CTLA4* ja *FOXP3* ekspressiooni qPCR-ga. Treg-des on *CTLA4* mRNA tase oluliselt kõrgem võrreldes mõlema Tconv rakupopulatsiooniga, kuid CD4+ Tconv-dega on erinevus mõnevõrra väiksem kui CD8+ Tconv-dega (Joonis 8a). *FOXP3* ekspresseerub üldjuhul ainult CD4+CD25+ regulatoorsetes T-rakkudes (Joonis 8b).



Joonis 8. *CTLA4* ja *FOXP3* ekspressioon T-rakkude alapopulatsioonides. **a** *CTLA4* ekspressioon T-rakkude alapopulatsioonides on erinev. CD4+CD25+ regulatoorsetes T-rakkudes on *CTLA4* ekspressioon oluliselt kõrgem kui konventsionaalsetes CD4+ ja CD8+ T-rakkudes. **b** *FOXP3* ekspresseerub üldjuhul ainult CD4+CD25+ regulatoorsetes T-rakkudes. Geeniekspressiooni qPCR-i tulemused normaliseeriti kõigepealt koduhoidja *ACTB* suhtes ( $\Delta Ct$ ) ja seejärel madalaima  $\Delta Ct$  väärtusega Treg-i suhtes ( $\Delta\Delta Ct$ ). Graafikutele on esitatud kolmest erinevast doonorist eraldatud, ChIP-i katses kasutatud T-rakkude alapopulatsioonide keskmine ekspressioon  $\pm$  SEM. Keskmiste väärtuste erinevuste statistilise olulisuse hindamiseks tehti paardunud kahe-suunaline t-test Treg vs CD4+ Tconv ja Treg vs CD8+ Tconv paaridega. Saadud p väärtused korrigeeriti Holm-Bonferroni mitmese testimise meetodiga. Esitatud on korrigeerimata p väärtused: \*p < 0,05, \*\*\*p < 0,001, \*\*\*\*p < 0,0001.

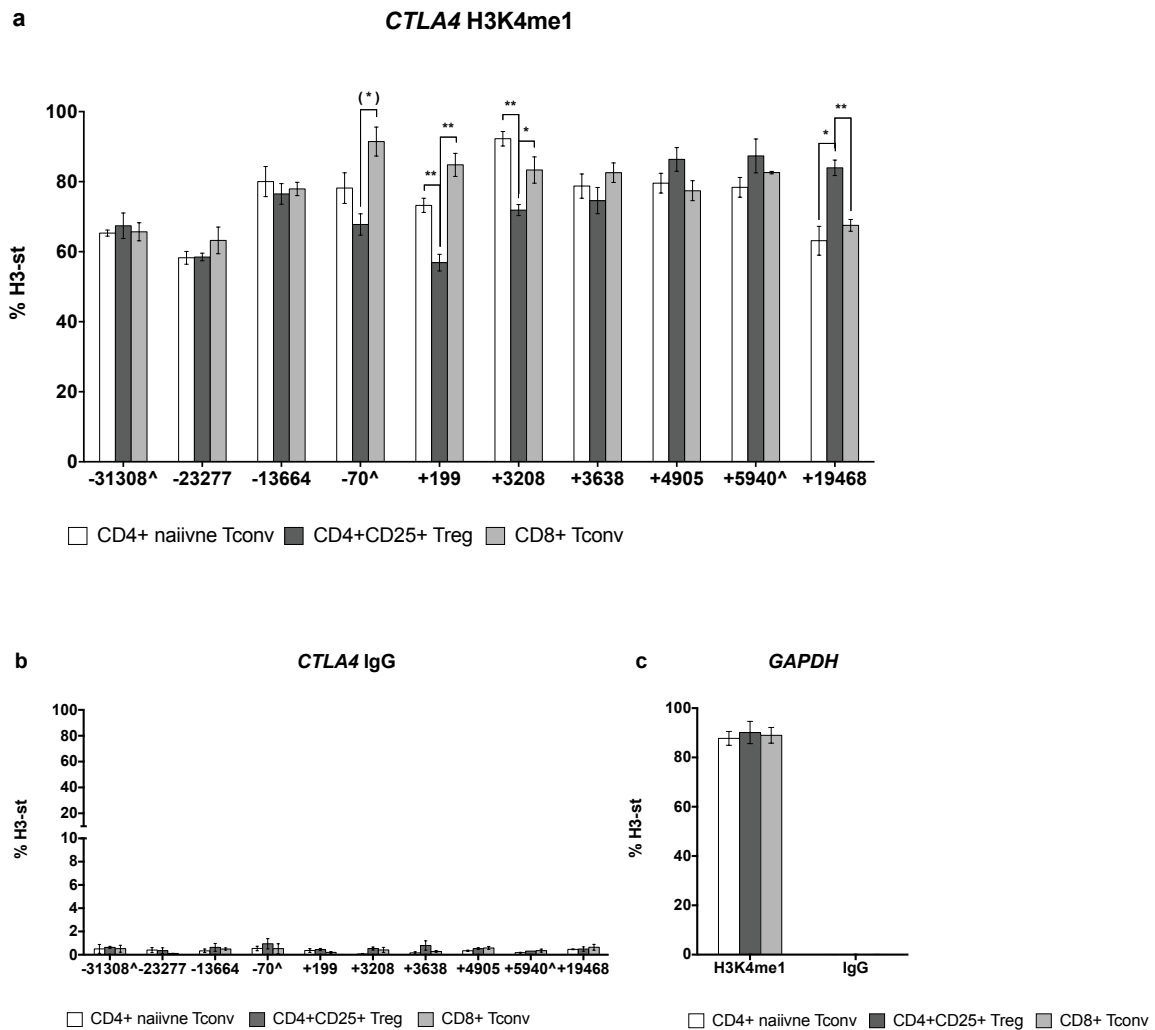
### 2.3.4 *CTLA4* H3K4me1 erinevates T-rakkude alapopulatsioonides

Uurimaks epigeneetilise regulatsiooni rolli *CTLA4* ekspressioonis erinevates T-rakkude alapopulatsioonides, viidi läbi kromatiini immunosadestamine modifitseeritud histoonide vastaste antikehadega kolme erineva doonori verest eraldatud T-rakkudes, kasutades  $2 \times 10^4$  raku ühe sadestamise reaktsiooni kohta. CHIP-i proovidega teostati qPCR praimeritega, mis iseloomustavad erinevaid regioone *CTLA4* geeni sees ja geenist üles- ning allavoolu (Joonis 9). CHIP-i kontrollpraimerid disainiti iseloomustamiseks geeniregioone, kus on kõrge uuritava modifikatsiooni tase.



**Joonis 9. *CTLA4* praimerite asetus.** *CTLA4* histoonide modifikatsioonide profiili uurimiseks analüüsiti CHIP-i proovid qPCR-ga praimeritega, mis disainiti iseloomustamiseks *CTLA4* promooterit, geeni kodeerivat ala ja potentsiaalseid regulatoorseid regioone geenist 5' ja 3' suunas.

Statistiliselt olulisi erinevusi H3K4me1 tasemes kõigis kolmes rakupopulatsioonis ei leitud *CTLA4* geenist ülesvoolu paiknevatel aladel, k.a potentsiaalsetes regulatoorsetes regioonides (-31308, -13664). Promooteril (-70) leiti oluline erinevus Treg ja CD8+ Tconv populatsioonide vahel, kuid mitmese testimise korrektsiooni tagajärjel muutus erinevus H4K4me1 tasemes nendes kahes populatsioonis statistiliselt ebaoluliseks. Promooteril ja 1. eksonis (+199) on Treg-des täheldatav selle modifikatsiooni hulga langus, kusjuures 1. eksonis on H3K4me1 tase Treg-des oluliselt madalam võrreldes konventsionaalsete T-rakkudega. *CTLA4* 2. intronist (+3208) alates hakkab Treg-des H3K4 monometülatsiooni hulk tõusma, kuid on endiselt madalam võrreldes Tconv-de tasemega. 3. eksonist (+3638) kuni geeni lõpuni ei leitud kolme rakupopulatsiooni vahel olulisi erinevusi H3K4me1 hulgas. *CTLA4* geenist allavoolu langeb Tconv-des selle modifikatsiooni tase oluliselt madalamale võrreldes Treg-dega (Joonis 10a). Jooniselt 10b on näha, et kromatiini ebaspetsiifiline sadestumine on madal ning Jooniselt 10c, et positiivse kontrollgeeninena kasutatud *GAPDH* H3K4 monometülatsiooni hulk ei erine oluliselt uuritud rakupopulatsioonides.

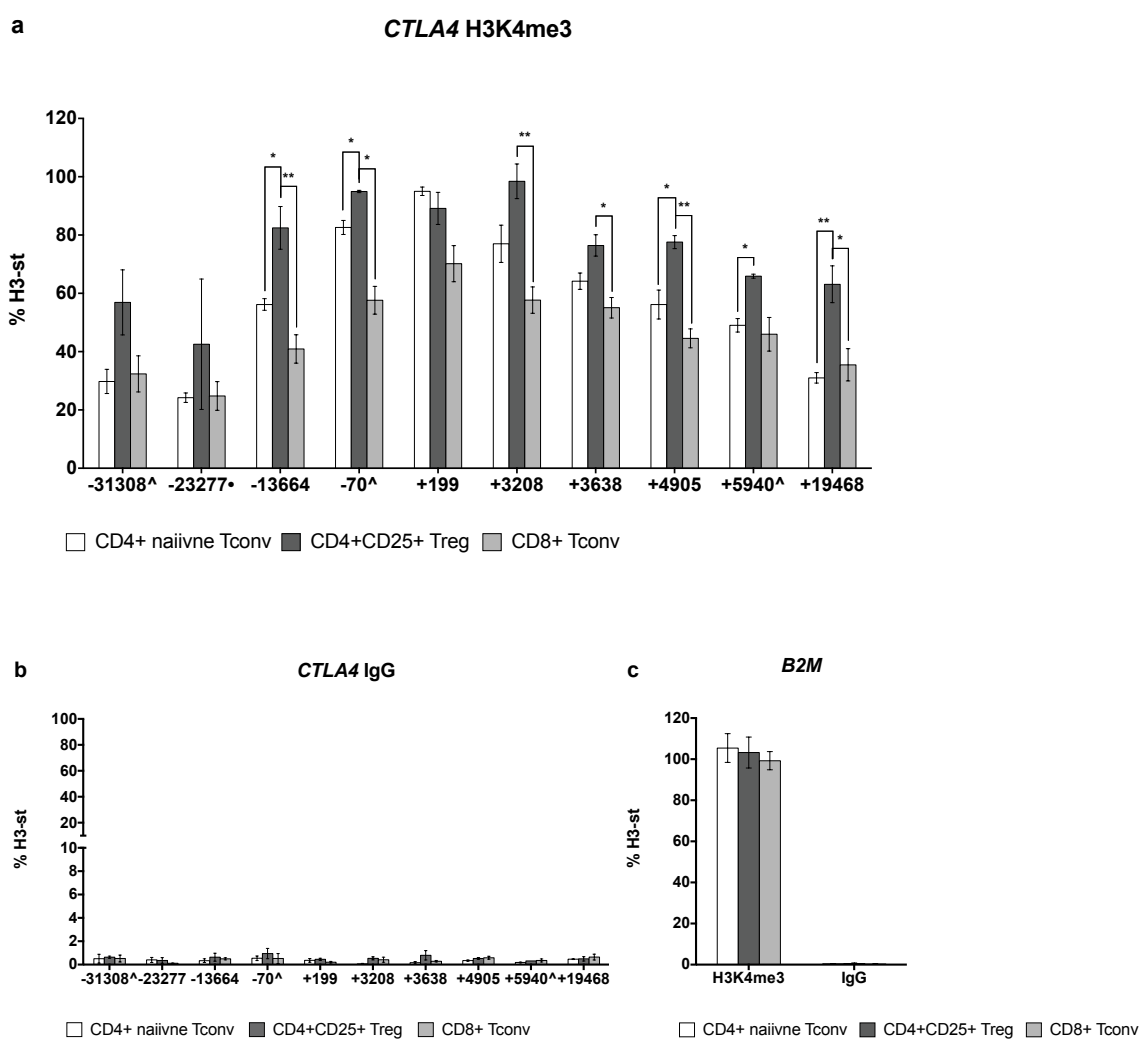


**Joonis 10. H3K4me1. a** H3K4me1 modifikatsiooni muster erinevates T-rakkude alapopulatsioonides *CTLA4* geenis ning geenist 5' ja 3' suunas. **b** Ebaspetsiifilise IgG antikehaga sadestatud kromatiini hulk erinevates T-rakkude alapopulatsioonides *CTLA4* geenis ning geenist 5' ja 3' suunas. **c** Positiivse kontrolli *GAPDH* H3K4me1 modifikatsiooni tase erinevates T-rakkude alapopulatsioonides. Histooni modifikatsiooni ChIP-i proovid analüüsiti qPCR-ga ja tulemused normaliseeriti kogu histoon H3 suhtes. Graafikutel on toodud kahe (^)puuduvad kõigi kolme rakupopulatsiooni ühe katse väärtused) või kolme iseseisva ChIP-i katse keskmised  $\pm$  SEM. Statistilist olulisust *CTLA4* H3K4me1 tasemes hinnati esmalt dispersioonianalüüsiga (ANOVA), millele järgnes paardumata kahe-suunaline t-test Treg vs CD4+ Tconv ja Treg vs CD8+ Tconv paaridega. Saadud p väärtused korrigeeriti Holm-Bonferroni mitmese testimise meetodiga. Esitatud on korrigeerimata p väärtused: \*p < 0,05 ( (\*) - mitmese testimise korrigeerimisega on p > 0,05), \*\*p < 0,01.

### 2.3.5 *CTLA4* H3K4me3 erinevates T-rakkude alapopulatsioonides

*CTLA4* promooteril (-70) on Treg-des H3K4me3 tase kõrgem kui Tconv-des. Ka geeni sees uuritud regioonides on Treg-des selle modifikatsiooni tase üldjuhul kõrgem, kas võrreldes mõlema Tconv populatsiooniga (+4905) või kõrgem võrreldes ühe Tconv populatsiooniga (+3208, +3638, +5904). *CTLA4* geenist allavoolu (+19468) langeb mõlemas Tconv alapopulatsioonis H3K4me3 märgise tase oluliselt madalamale võrreldes Treg-dega. Geenist 5' suunas paiknevast kahest potentsiaalsest regulaatorsest elemendist (-31308, -

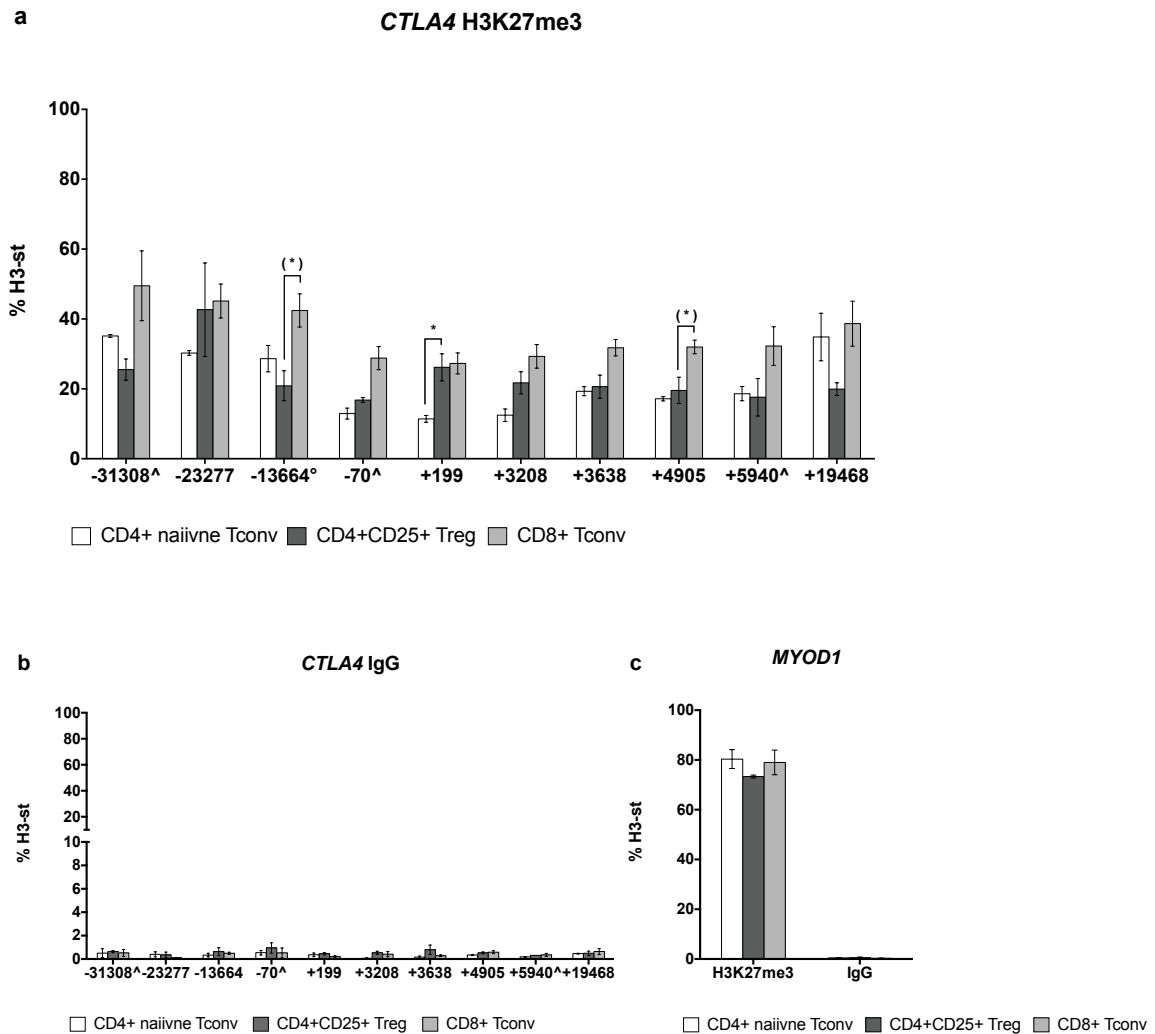
13664) leidis statistiliselt oluline erinevus H3K4me3 hulgas Treg ja Tconv alapopulatsioonide vahel ainult ühes, -13664. CD8+ konventsionaalsetes T-rakkudes on H3K4me3 tase *CTLA4* promooteril ning mitmes regioonides nii geeni sees kui geenist üles- ja allavoolu oluliselt madalam võrreldes Treg-dega (Joonis 11a). Joonisel 11b on näha, et ChIP-i katses ebaspetsiifiline kromatiini seondumine on madal ning Joonisel 11c, et positiivse kontrollina kasutatud geenis uuritud modifikatsiooni tase ei erine uuritud rakupopulatsioonides oluliselt.



**Joonis 11. H3K4me3.** **a** H3K4me3 modifikatsiooni muster erinevates T-rakkude alapopulatsioonides *CTLA4* geeni sees ning geenist 5' ja 3' suunas. **b** Ebaspetsiifilise IgG antikehaga sadestatud kromatiini hulk erinevates T-rakkude alapopulatsioonides *CTLA4* geeni sees ning geenist 5' ja 3' suunas. **c** Positiivse kontrolli *B2M* H3K4me3 modifikatsiooni tase erinevates T-rakkude alapopulatsioonides. Histooni modifikatsiooni ChIP-i proovid analüüsiti qPCR-ga ja tulemused normaliseeriti kogu histoon H3 suhtes. Graafikutel on toodud kahe (^puuduvad kõigi kolme rakupopulatsiooni ühe katse väärtused, •puudub CD8+ Tconv ühe katse väärtus) kuni kolme iseseisva ChIP-i katse keskmised  $\pm$  SEM. Statistilist olulisust *CTLA4* H3K4me3 tasemes hinnati esmalt dispersioonianalüüsiga (ANOVA), millele järgnes paardumata kahesuunaline t-test Treg vs CD4+ Tconv ja Treg vs CD8+ Tconv paaridega. Saadud p väärtused korrigeeriti Holm-Bonferroni mitmese testimise meetodiga. Esitatud on korrigeerimata p väärtused: \*p < 0,05, \*\*p < 0,01.

### 2.3.6 *CTLA4* H3K27me3 erinevates T-rakkude alapopulatsioonides

Võrreldes Treg ja CD4<sup>+</sup> Tconv-dega on CD8<sup>+</sup> Tconv-des H3K27me3 tase üldiselt kõrgem nii promooteril (-70), kui ka *CTLA4* geeni kodeerivas regioonis ning geenist 5' ja 3' suunas. Statistiliselt oluline erinevus Treg ja CD8<sup>+</sup> Tconv populatsiooni vahel esines kahes potentsiaalses reguleerivas regioonis (-13664, +4905), kuid mitmese testimise korrigeerimine kaotas paardumata kahe-suunalise t-testiga leitud statistilise olulisuse. Võrreldes CD8<sup>+</sup> Tconv-dega, on nii Treg-des ja CD4<sup>+</sup> Tconv-des geeni sees H3K27me3 madal, kusjuures geeni alguses (+199, +3208) on CD4<sup>+</sup> Tconv rakkudes H3K27me3 märgise hulk madalam kui Treg-des. Geenist 5' ja 3' suunas on näha H3K27me3 taseme suurenemise tendentsi CD4<sup>+</sup> ja vähemal määral ka CD8<sup>+</sup> konventsionaalsetes T-rakkudes (Joonis 12a). ChIP-i katses ebaspetsiifiline kromatiini seondumine on madal (Joonis 12b) ning positiivse kontrollina kasutatud *MYOD1* H3K27me3 modifikatsiooni tase ei erine uuritud T-rakkude alapopulatsioonides oluliselt (Joonis 12c).

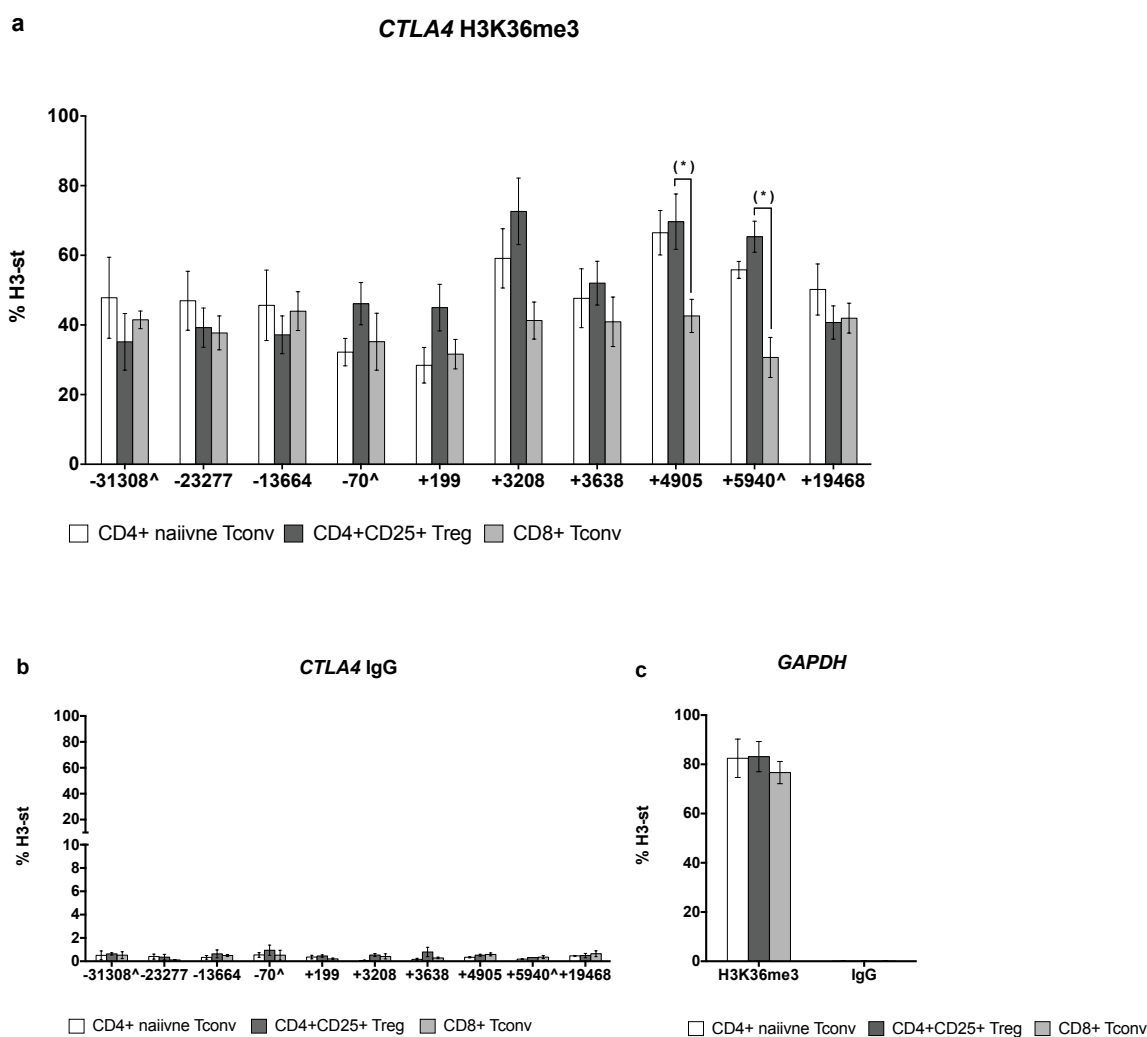


**Joonis 12. H3K27me3.** **a** H3K27me3 modifikatsiooni muster erinevates T-rakkude alapopulatsioonides *CTLA4* geeni sees ning geenist 5' ja 3' suunas. **b** Ebaspetsiifilise IgG antikehaga sadestatud kromatiini hulk erinevates T-rakkude alapopulatsioonides *CTLA4* geeni sees ning geenist 5' ja 3' suunas. **c** Positiivse kontrolli *MYOD1* H3K27me3 modifikatsiooni tase erinevates T-rakkude alapopulatsioonides. Histooni modifikatsiooni ChIP-i proovid analüüsiti qPCR-ga ja tulemused normaliseeriti kogu histoon H3 suhtes. Graafikutel on toodud kahe (^puuduvad kõigi kolme rakupopulatsiooni ühe katse väärtused, °puudub CD4+ naiivse Tconv ühe katse väärtus) kuni kolme iseseisva ChIP-i katse keskmised  $\pm$  SEM. Statistilist olulisust *CTLA4* H3K27me3 tasemes hinnati esmalt dispersioonianalüüsiga (ANOVA), millele järgnes paardumata kahesuunaline t-test Treg vs CD4+ Tconv ja Treg vs CD8+ Tconv paaridega. Saadud p väärtused korregeeriti Holm-Bonferroni mitmese testimise meetodiga. Esitatud on korregeerimata p väärtused: \*p < 0,05 ( (\*) - mitmese testimise korrektsiooniga on p > 0,05), \*\*p < 0,01.

### 2.3.7 *CTLA4* H3K36me3 erinevates T-rakkude alapopulatsioonides

*CTLA4* geenist 5' ja 3' suunas ei leitud uuritud T-rakkude alapopulatsioonides H3K36me3 hulgas statistiliselt olulist erinevust. Alates promooteri regioonist (-70) võib täheldada H3K36me3 tõusu tendentsi reguloorsetes T-rakkudes ja pärast 2. eksonit (+3208) CD4+ naiivsetes konventsionaalsetes T-rakkudes. Kuigi Treg ja CD4+ naiivsete Tconv populatsioonide vahel ei tuvastatud kahesuunalise paardumata t-testiga statistiliselt olulist erinevust üheski uuritud kromatiini regioonis, on Joonisel 13a näha mõningane erinevus

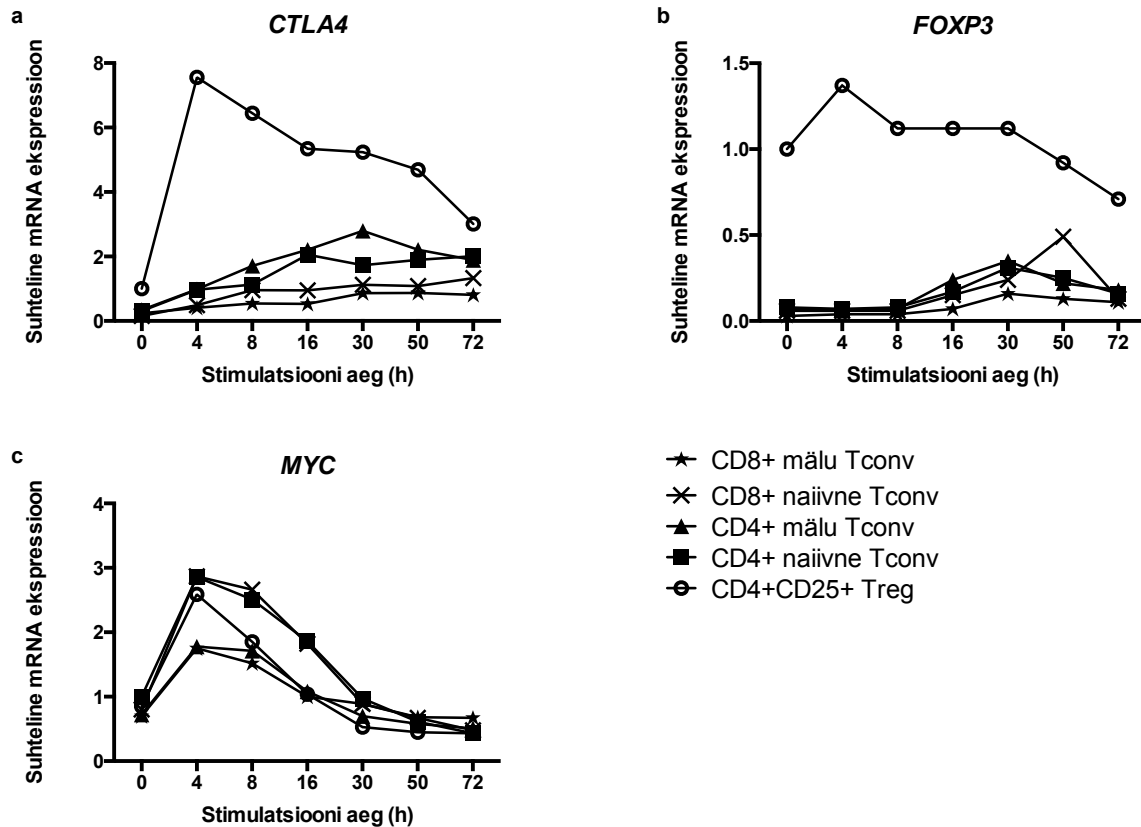
H3K36me3 hulgas promooteril (-70), esimeses eksonis (+199) ja geeni lõpus (+5940). CD8+ Tconv rakupopulatsioonis püsib H3K36me3 hulk uuritud kromatiini regioonides suhteliselt muutumatuna ning mitmese testimise korrektsioonita leiti geeni lõpus positsioonides +4905 ja +5940 statistiliselt oluline erinevus selle märgise tasemes võrreldes Treg-dega (Joonis 13a). Kromatiini ebaspetsiifiline sadestamine on läbiviidud CHIP-i katses madal (Joonis 13b) ning CHIP-i positiivse kontrollina kasutatud *GAPDH* H3K36me3 hulk uuritud rakupopulatsioonides ei erine (Joonis 13c).



**Joonis 13. H3K36me3.** **a** H3K36me3 modifikatsiooni muster erinevates T-rakkude alapopulatsioonides *CTLA4* geeni sees ning geenist 5' ja 3' suunas. **b** Ebaspetsiifilise IgG antikehaga sadestatud kromatiini hulk erinevates T-rakkude alapopulatsioonides *CTLA4* geeni sees ning geenist 5' ja 3' suunas. **c** Positiivse kontrolli *GAPDH* H3K36me3 modifikatsiooni tase erinevates T-rakkude alapopulatsioonides. Histooni modifikatsiooni CHIP-i proovid analüüsiti qPCR-ga ja tulemused normaliseeriti kogu histoon H3 suhtes. Graafikutel on toodud kahe (^puuduvad kõigi kolme rakupopulatsiooni ühe katse väärtused) kuni kolme iseseisva CHIP-i katse keskmised  $\pm$  SEM. Statistilist olulisust *CTLA4* H3K36me3 tasemes hinnati esmalt dispersioonianalüüsiga (ANOVA), millele järgnes paardumata kahe-suunaline t-test Treg vs CD4+ Tconv ja Treg vs CD8+ Tconv paaridega. Saadud p väärtused korregeeriti Holm-Bonferroni mitmese testimise meetodiga. Esitatud on korregeerimata p väärtused: \*p < 0,05 ( \* ) - mitmese testimise korrektsiooniga on p > 0,05).

### 2.3.8 Stimuleeritud T-rakkude alapopulatsioonide geeniekspressioon

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg, naiivseid ja mälu CD4<sup>+</sup> ning naiivseid ja mälu CD8<sup>+</sup> Tconv rakupopulatsioone stimuleeriti CD2, CD3 ja CD28 molekulide vastaste antiikehadega. 0, 4, 8, 16, 30, 50 või 72 h tundi stimuleeritud rakkudega teostati geeniekspressioonianalüüs. Joonisel 14 on toodud esimese sellise katse tulemused. Stimuleerimata rakkudes (0 h) on *CTLA4* mRNA tase Treg-des kõrgem kui uuritud Tconv-de alapopulatsioonides. Rakkude aktiveerumisel suureneb *CTLA4* mRNA hulk kõige tugevamini ja kiiremini Treg-des, jõudes maksimumini juba 4 h möödudes. Tconv alapopulatsioonides toimub *CTLA4* mRNA taseme tõus aeglasemalt. CD4<sup>+</sup> Tconv-des ekspresseeritakse *CTLA4* mRNA-d rohkem kui CD8<sup>+</sup> Tconv-des, kusjuures mälorakkudes veel omakorda mõnevõrra rohkem võrreldes naiivsete rakkude populatsiooniga (Joonis 14a). *FOXP3* mRNA tase on stimuleerimata (0 h) Tconv-des praktiliselt olematu võrreldes Treg-dega. Rakkude aktiveerumisel tõuseb esimese 4 h jooksul ajutuselt *FOXP3* mRNA hulk Treg-des. Alates 8 h ajapunktist langeb Treg-des mRNA algse ekspressiooniga sarnasele tasemele ning alates 50 h ajapunktist ka algsest stimuleerimata rakkude mRNA tasemest madalamale. Stimuleeritud Tconv-des on täheldatav *FOXP3* ekspressiooni tõus alates 8 h stimulatsiooni ajapunktist (Joonis 14b). Transkriptsioonifaktori Myc ekspressiooniprofiili muutus on sarnane kõikides uuritud T-rakkude alapopulatsioonides: *MYC* mRNA hulk jõuab maksimumini kõikides uuritud T-rakkude alapopulatsioonides pärast 4-tunnist stimulatsiooni (Joonis 14c).

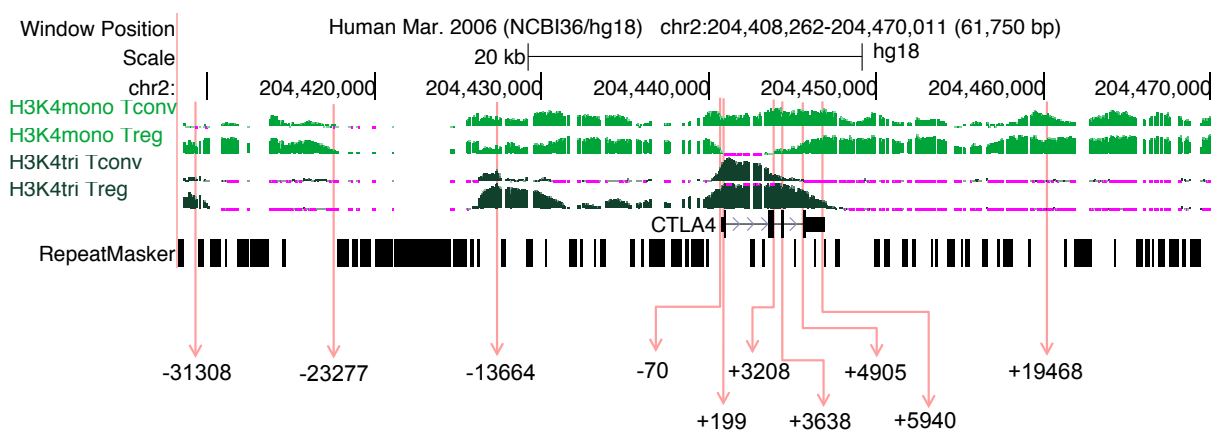


**Joonis 14. Stimuleeritud T-rakkude alapopulatsioonide geeniekspressiooni analüüs.** T-rakkude alapopulatsioonid stimuleeriti CD2-, CD3- ja CD28-vastaste antikehadega ja CD8+ Tconv populatsioonide puhul IL-2 (10 u/ml) juuresolekul 0, 4, 8, 16, 30, 50 või 72 h. Stimuleerimata ja stimuleeritud rakkudes uuriti *CTLA4* (a), *FOXP3* (b) ja *MYC* (c) ekspressiooni. Esitatud on ühe qPCR-i triplikaatide keskmised.

## 2.4 Arutelu

H3K4me3 on tüüpiliselt assotsieeritud aktiivsete geenide promooteritega (Heintzman jt., 2007; Heintzman jt., 2009). Käesolevas töös leitud kõrge H3K4me3 tase Treg-des *CTLA4* promooteril (-70) (Joonis 11a) viitab aktiivsele geeniekspressioonile, mida näitavad ka *CTLA4* mRNA ekspressiooni tulemused (Joonis 8a). Vastupidiselt, madal promooteri H3K4me3 CD8+ Tconv-des (Joonis 11a) näitab aktiivse transkriptsiooni puudumist, mida samuti kinnitavad *CTLA4* ekspressioonikatse tulemused (Joonis 8a). CD4+ Tconv-des on promooteril H3K4me3 tase suhteliselt kõrge, olles küll mõnevõrra madalam Treg-dest, kuid samal ajal kõrgem CD8+ Tconv-dest (Joonis 11a). Selline H3K4 trimetülatsiooni muster CD4+ Tconv-des viitab aktiivsele promooterile. *CTLA4* geeniekspressiooni analüüsiga detekteeriti mõningal määral ka *CTLA4* mRNA-d, mille hulk on oluliselt madalam Treg-dest, kuid mõnevõrra kõrgem CD8+ Tconv-dest (Joonis 8a), olles kooskõlas varasemate teadmistega, et naiivsetes/puhkavates Tconv rakkudes ei toimu olulist *CTLA4* ekspressiooni (Harper jt., 1991; Lindsten jt., 1993; Gibson jt., 2007). Treg ja CD4+ Tconv-de suhteliselt

sarnane H3K4me3 profiil *CTLA4* promooteril vihjab, et kõrget ja konstitutiivset *CTLA4* ekspressiooni Treg-des ning inhibeeritud *CTLA4* ekspressiooni CD4+ Tconv-des määravad H3K4me3 erinevused just promooterist eemal asuvates regioonides. Ülegenoomsed ChIP analüüsid on näidanud, et lisaks promooteritele on H3K4 trimetülatsioon iseloomulik ka võimendajatele (Barski jt., 2007; Pekowska jt., 2011). Käesolevas töös leiti, et Treg-des on H3K4me3 tase oluliselt kõrgem Tconv-dest mitmes regioonis geeni sees kui ka geenist üles- ja allavoolu (Joonis 11a). Uurides DNA metülatsiooni Treg ja Tconv rakkudes, leidsid Schmidl jt (2009) *CTLA4* geenist 5' suunas kaks erinevalt metüleeritud regiooni (antud töös positsioonid -31308 ja -13664), mida peeti potentsiaalseteks regulaatorseteks elementideks. Käesolevas töös leiti statistiliselt oluline erinevus Tconv-de ja Treg-de vahel positsioonis -13664. Samas, ka regioonis -31308 on täheldatav tendents kõrgemale H3K4me3 hulga Treg-des võrreldes Tconv-dega (Joonis 11a), langedes kokku Schmidl'i jt (2009) tulemustega (Joonis 15). Kui regioonide -31308 ja -13664 puhul on tõepoolest tegemist *CTLA4* transkriptsiooni võimendajatega ja arvestades asjaolu, et H3K4me3 on leitud just aktiivsetel võimendajatel (Pekowska jt., 2011), siis on võimalik, et Treg-de kõrgem H3K4me3 tase just nendes alades võimaldab *CTLA4* konstitutiivset ekspressiooni selles T-raku alapopulatsioonis.



**Joonis 15. Schmidl jt (2009) *CTLA4* histoonide modifikatsioonide ChIP-chip tulemused.** UCSC genoomi lehitsejas (UCSC *Genome Browser*) visualiseeritud Schmidl jt (2009) *in vitro* aktiveeritud ja kasvatatud CD4+ Tconv ja CD4+CD25+ Treg rakkudega tehtud H3K4 metülatsiooni ChIP-chip katse tulemused. Näidatud on kummagi rakupopulatsiooni H3K4 mono- (heleroheline) ja trimetülatsiooni (tumeroheline) andmed ning *RepeatMasker* rida näitab ENCODE'is olemasolevaid andmeid kordusi sisaldavate genoomsete regioonide kohta. Punaste nooltega on tähistatud käesolevas töös uuritud kromatiini regioonid.

Kuigi antud töös ei tuvastatud pärast mitmese testimise korrigeerimist Treg-de ja CD8+ Tconv-de H3K27 trimetülatsiooni tasemes statistiliselt olulist erinevust, on siiski

enamikus uuritud regioonidest täheldatav selle modifikatsiooni kõrgema taseme tendents CD8<sup>+</sup> Tconv-des võrreldes Treg-dega (Joonis 12a). H3K27me<sub>3</sub> iseloomustab nii vaigistatud geenide promootereid kui kodeerivat ala (Barski jt., 2007; Mikkelsen jt., 2007; Ernst jt., 2011). CD8<sup>+</sup> Tconv-de suhteliselt kõrgem H3K27me<sub>3</sub> tase kajastub ka *CTLA4* mRNA tasemes, olles selles rakupopulatsioonis kõige madalam (Joonis 8a). Promooteril (-70) ja geeni sees on Treg-de ja CD4<sup>+</sup> Tconv-de H3K27me<sub>3</sub> tase enamasti suhteliselt sarnane, kuid enamikus geenist üles- ja allavoolu paiknevates regioonides langeb Treg-des H3K27me<sub>3</sub> märgise hulk madalamale võrreldes CD4<sup>+</sup> Tconv-dega (Joonis 12a). Arvestades Treg-de ja Tconv-de H3K27me<sub>3</sub> erinevusi geenist 5' ja 3' suunas asuvatel aladel, on võimalik, et selle märgise erinevus just nendes regioonides reguleerib konstitutiivset transkriptsiooni Treg-des ja transkriptsiooni vaigistamist naiivsetes/puhkavates Tconv-des.

H3K4me<sub>1</sub> on assotsieeritud eelistatult transkriptsiooni võimendajatega (Heintzman jt., 2007; Heintzman jt., 2009). Tian jt (2011) leidsid *CTLA4* 2. introni alguses Treg-spetsiifilise H3K4 monometülatsiooni rikastumise, mis arvati olevat võimendaja. Tian'i jt (2011) poolt kirjeldatud ala 2. intronis langeb kokku käesolevas töös uuritud positsiooniga +3208, kus H3K4 monometülatsioon on kõrgem hoopiski Tconv-des (Joonis 10a), mida on näha ka Schmidl'i jt (2009) poolt läbi viidud ChIP-chip analüüsi tulemustest (Joonis 15). Nii Tian jt (2011) kui Schmidl jt (2009) kasutasid oma töös *in vitro* stimuleeritud ja paljundatud T-rakke, seetõttu võivad vasturääkivused nende tööde tulemustes olla tingitud erinevustest kasutatud rakkude *in vitro* prolifereerimise meetodikatest. Schmidl'i jt (2009) poolt kirjeldatud kahes potentsiaalses *CTLA4* regulaatoorses elemendis (-31308 ja -13664), ei leitud käesolevas töös erinevusi H3K4 monometülatsiooni tasemes Treg-de ja Tconv-de vahel (Joonis 10a). Samas Schmidl'i jt (2009) tulemustes on Treg-del näha -31308 regioonis kõrgemat monometülatsiooni taset (Joonis 15). Schmidl'i jt (2009) töö andmed näitavad Treg-des *CTLA4* kodeeriva regiooni esimeses pooles H3K4 monometülatsiooni madalamat taset võrreldes Tconv-dega (Joonis 15), millega langevad kokku ka käesoleva töö tulemused (Joonis 10a).

H3K36 trimetülatsiooni peetakse aktiivse transkriptsiooni, täpsemalt elongatsiooni märgiseks (Barski jt., 2007; Mikkelsen jt., 2007; Ernst jt., 2011). Kuigi käesolevas töös ei erine pärast mitmese testimise korrektsiooni üheski uuritud kromatiini positsioonis Treg-de ja Tconv-de H3K36me<sub>3</sub> tase statistiliselt oluliselt, on siiski mõned erinevused täheldatavad. CD8<sup>+</sup> Tconv-des püsib selle modifikatsiooni hulk suhteliselt muutumatuna kogu uuritud kromatiini ala piires erinevalt Treg-dest ja CD4<sup>+</sup> Tconv-dest, kus H3K36me<sub>3</sub> hulk mõnevõrra suureneb geeni kodeerivas alas, kusjuures Treg-des alates promooterist (-70), kuid CD4<sup>+</sup>

Tconv-des alles 2. eksoni lõpust (+3208) (Joonis 13a). Treg-de H3K36me3 profiil uuritud kromatiini alal vastab kõrgele *CTLA4* ekspressioonile selles alapopulatsioonis (Joonis 8a). CD4+ Tconv-del on geeni kodeerivas alas mõnevõrra kõrgem H3K36 trimetülatsiooni tase kui CD8+ Tconv-des, mis korreleerub ka CD4+ Tconv-de mõnevõrra kõrgema *CTLA4* mRNA tasemega võrreldes CD8+ Tconv-dega (Joonis 8a). Alternatiivselt splaisitud eksonites on leitud H3K36me3 vähem, mis viitab selle modifikatsiooni võimalikule rollile pre-mRNA protsessimise regulatsioonis (Kolasinska-Zwierz jt., 2009). Ka antud töö tulemustest on näha, et võrreldes teiste kodeeriva ala regioonidega, langeb alternatiivselt splaisitud eksonis +3638 H3K36me3 tase nii Treg-des kui CD4+ Tconv-des (Joonis 13a), viidates võimalikule alternatiivse splaisingu regulatsioonimehhanismile.

On leitud, et monovalentsed H3K4me3 promooterid iseloomustavad üldiselt koduhoidjageene. Samas bivalentsed e H3K4me3 ja H3K27me3 märgisega promooterid on aga keerulisema ekspressiooniga geenidel, nt rakkude diferentseerumises osalevatel ja seda protsessi omakorda reguleerivate TF-te geenidel ning erinevatele keskkonnast tulevatele signaalidele reageerivate pinnamolekulide geenidel (Mikkelsen jt., 2007), mille hulka saab lugeda ka *CTLA4*. Ka antud töö tulemustest on näha, et *CTLA4* promooteril esineb üheaegselt nii aktiveeriv H3K4me3 kui repressiiv H3K27me3 modifikatsioon. *CTLA4* erinev mRNA ekspressioon peegeldub uuritud histoonide modifikatsioonide muustrites, mis viitab epigeneetilise regulatsiooni mehhanismi olemasolule. Nende mehhanismide välja selgitamisel on oluline kaasata ka promooterist eemal asuvad regioonid, mis võivad sisaldada rakuspetsiifilist geeniekspressiooni reguleerivaid elemente. Kuigi ei Schmidl jt (2009) ega Tian jt (2011) ei suutnud näidata *CTLA4* geeni sees (+3208) ega geeni ees (-31308, -13664) leitud potentsiaalsete regulatoorsete elementide mõju reportergeeni ekspressioonile, ei saa välistada, et tegemist on T-rakkude alapopulatsioonides *CTLA4* erinevat ekspressiooni kontrollivate võimendajatega. Nende alade võimalikku regulatoorset funktsiooni toetavad erinevused histoonide modifikatsioonide profiilides nii antud töö tulemustes kui varem avaldatud tööde tulemustes (Schmidl jt., 2009; Tian jt., 2011). Lisaks, *CTLA4* 2. ja 3. introni järjestuste kõrge konserveerumine hiirel ja inimesel vihjab võimalikele regulatoorsetele elementidele nendes regioonides (Ling jt., 1999). Potentsiaalsete võimendajate identifitseerimiseks ja kirjeldamiseks oleks võimalik teostada reportergeenialüüs selleks sobilikus rakuliinis. Lisaks, on näidatud, et H3K27 ja H3K9 atsetülatsioon (Heintzman jt., 2009; Creighton jt., 2010) ning RNA Pol II seondumine (Pekowska jt., 2011) iseloomustavad aktiivseid võimendajaid.

Lisaks käesoleva uurimustöö käigus leitud histoonide modifikatsioonide erinevustele uuritud T-rakkude alapopulatsioonides, on oluliseks tulemuseks ka asjaolu, et saadud tulemused saavutati kasutatud ChIP-i protokolliga kõigest 2 x 10<sup>4</sup> rakuga ühe kromatiini immunosadestamise reaktsiooni kohta. Nimelt on reguloorsed T-rakud väga haruldased, moodustades inimesel kõigest ~ 1 kuni 3% PBMC-dest (Hoffmann jt., 2006). Seetõttu on kõigis varasemates töodes kasutatud *in vitro* paljundatud Treg-e. Koekultuuris tugevate stimulatsioonide tagajärjel võivad rakkudes toimuda muutused, mis ei peegelda enam *in vivo* olukorda. Väikese raku hulga kasutamise eeliseks on ka võimalus edaspidi uurida autoimmuunseid haigusi põdevaid patsiente, kellelt saadud materjali hulk on limiteeritud.

Uurimaks, kuidas on aktiveerumisel T-rakkude alapopulatsioonide võime üles reguleerida *CTLA4* mRNA ekspressioon seotud histoonide modifikatsioonide profiilidega, stimuleeriti CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg, naiivseid ja mälu CD4<sup>+</sup> ning naiivseid ja mälu CD8<sup>+</sup> Tconv populatsioone *in vitro*. On teada, et *CTLA4* ekspresseerub T-rakkude alapopulatsioonides erinevalt: konstitutiivselt CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> reguloorsetes T-rakkudes (Takahashi jt., 2000), kuid konventsionaalsetes T-rakkudes oluliselt alles pärast rakkude aktiveerumist (Harper jt., 1991; Lindsten jt., 1993; Gibson jt., 2007). Antud töö geeniekspressiooni tulemused on varasemate teadmistega kooskõlas: stimuleerimata Tconv rakkudes on *CTLA4* mRNA tase madalam kui Treg-des ning hakkab tõusma pärast rakkude aktiveerumist (Joonis 14a). Käesolevas töös kirjeldatud histoonide modifikatsioonide profiilid peegeldavad ka uuritud T-rakkude alapopulatsioonide võimet *CTLA4* mRNA transkriptsiooni indutseerida. Nimelt, üldiselt kõige rohkem aktiivsele geeniekspressioonile iseloomulike histoonide märgistega Treg-d reguleerivad *CTLA4* ekspressiooni üles kõige kiiremini ja võimsamalt. Samas, vaigistatud geenile iseloomulike histooni modifikatsioonide profiilidega CD8<sup>+</sup> Tconv-del on uuritud rakupopulatsioonidest väikseim võime *CTLA4* ekspressiooni üles reguleerida. CD4<sup>+</sup> Tconv-de histoonide modifikatsioonide profiil, mida iseloomustab suhteliselt kõrge H3K4me<sub>3</sub> ja H3K36me<sub>3</sub> tase, sarnanedes selles osas Treg-dega, kuid samal ajal ka Treg-dest enamasti kõrgem vaigistav H3K27me<sub>3</sub>, peegeldab CD4<sup>+</sup> Tconv-de võimet indutseerida *CTLA4* ekspressioon kiiremini ja suuremal määral võrreldes CD8<sup>+</sup> Tconv-dega, kuid aeglasemalt ja väiksemal määral võrreldes Treg-dega.

*FOXP3* ekspressioon on kõrgeim Treg-des (Joonis 14b), kinnitades olemasolevaid teadmisi *FOXP3*-st kui Treg-de funktsiooni peamisest regulaatorist ja rakupopulatsiooni markerist (Sakaguchi jt., 2010). *In vitro* prolifereeruvatel Treg-del väheneb *FOXP3* ekspressioon (Hoffmann jt., 2006), mida võib täheldada ka antud töö tulemustes (Joonis 14b). Naiivsete ja aktiveeritud T-rakkude ülegenoomsed geeniekspressiooni uuringud on näidanud,

et rakutsükli, apoptoosi jt rakuliste protsesside regulatsioonis osalev *MYC* on üks geenidest, mille ekspressioonitase suureneb nii naiivsete kui mälu T-rakkude aktiveerumisel (Liu jt., 2001). Joonisel 14c esitatud tulemused näitavad, et ka antud töös uuritud Treg-d ja naiivsed ning mälu Tconv-d aktiveeruvad efektiivselt vastusena *in vitro* stimulatsioonile.

#### 2.4.1 Järeldused

Käesoleva uurimustöö tulemuste põhjal jõuti järgmistele järeldustele:

1. Värskest isoleeritud T-rakkude alapopulatsioone eristab *CTLA4* geeni promooteri avatuse aste, mida iseloomustab aktiivselt transkribeeritavatele geenidele omane H3K4me3 kõrgeim rikastus Treg-des ja vaigistatud geenidele iseloomuliku märgise H3K27me3 kõrgeim tase CD8<sup>+</sup> rakkudes. CD4<sup>+</sup> rakkudes iseloomustab promooterit suhteliselt kõrge H3K4me3 tase, jäädes madalamaks Treg-dest, kuid kõrgemaks CD8<sup>+</sup> T-rakkudest, ning Treg-dega sarnaselt madal H3K27me3. See on vastavuses *CTLA4* mRNA hulgaga uuritud T-raku alapopulatsioonides.
2. Geeni kodeerivas alas on kõrgeim H3K36me3 tase Treg-des. CD8<sup>+</sup> T-rakkudes jääb H3K36me3 tase ühtlaselt madalaks kogu uuritud ala ulatuses, mis on iseloomulik aktiivse transkriptsioonilise elongatsiooni puudumisele. CD4<sup>+</sup> Tconv-des on H3K36me3 sarnasem Treg-dega kui CD8<sup>+</sup> Tconv-dega, viidates mõningasele transkriptsioonilise elongatsiooni toimumisele.
3. Treg-d eristuvad teistest uuritud T-raku alapopulatsioonidest väga kiire (< 4 tunni jooksul) ja märkimisväärse *CTLA4* transkriptsioonilise aktiivsuse tõusu poolest peale stimulatsiooni. Seevastu CD4<sup>+</sup> Tconv-des tõuseb *CTLA4* mRNA tase mõõdukalt ja aeglasemalt, maksimumiga 30.-ndal tunnil peale stimuleerimist ning jääb CD8<sup>+</sup> T-rakkudes veelgi madalamaks.
4. Treg-del on võrreldes teiste uuritud T-raku alapopulatsioonidega oluliselt kõrgem H3K4me3 tase ka potentsiaalsetes reguleerivates alades *CTLA4* geeni promooterist ülesvoolu. CD8<sup>+</sup> T-rakud eristuvad H3K27me3 kõrgema taseme poolest reguleerivatel aladel. On võimalik, et histoonide modifikatsioonide erinevused just nendes regioonides võimaldavad *CTLA4* ekspressiooni kiiret dünaamikat Treg-des ja pidurdavad oluliselt *CTLA4* transkriptsiooni CD8<sup>+</sup> T-rakkudes ka tugeva stimulatsiooni tingimustes.

## Kokkuvõte

Käesolevas töös uuriti histoonide modifikatsioone perifeersest verest värskest isoleeritud CD4+CD25+ regulatoorsetes T-rakkudes ja naiivsetes CD4+ ning naiivsetes/rahulolekus CD8+ konventsionaalsetes T-rakkudes, leidmaks seoseid histoonide modifikatsioonide mustrite ja T-rakkude alapopulatsioonide erineva *CTLA4* ekspressiooni vahel. Leiti, et uuritud rakupopulatsioonides esinevad erinevused H3K4 mono- ja trimetülatsiooni ning H3K27 ja H3K36 trimetülatsiooni mustrites nii *CTLA4* geeni promooteril, kodeerivas alas kui geenist 5' ja 3' suunas promooterist eemal asuvatel aladel. Erinevused modifitseeritud histoonide profiilides peegeldusid erinevustes *CTLA4* mRNA ekspressioonis naiivsetes/puhkavates rakkudes ning uuritud rakupopulatsioonide võimes aktivatsioonijärgselt reguleerida üles *CTLA4* mRNA ekspressioon. Leiti, et lisaks promooterile esinevad histooni märgistes erinevused geenist alla- ja ülesvoolu paiknevatel aladel, mis võivad osutada olulisteks *CTLA4* ekspressiooni kontrollivateks regulatoorseteks elementideks. Selle keskse immuunosupressiivse molekuli regulatsioonimehhanismide mõistmine aitab kaasa mitmete immuunsüsteemi talitlushäirete tagajärjel tekkivate haiguste patogeneesi mõistmisele ja spetsiifilisemate ravimeetmete väljatöötamisele.

See on esimene Treg rakkude epigeneetika uuring, mis on tehtud värskest isoleeritud Treg-del. Kromatiini immunosadestamise katses kasutatud rakkude arvule seab piirangud selle populatsiooni madal protsent vererakkude hulgas. Käesolevas töös õnnestus viia rakkude arv  $2 \times 10^4$ -ni ühe sadestamise reaktsiooni kohta. Sel moel on võimalik vajamineva vereproovi hulk hoida piirides, mis lubab tulevikus uuringutesse kaasata ka autoimmuunhaigustega patsiente.

# Histone H3 methylation patterns in *CTLA4* expression regulation in different T-cell subpopulations

Janika Pöder

## Summary

Cytotoxic T-lymphocyte associated antigen 4 (*CTLA4*) is a protein expressed in T-cells. This molecule has a critical role in regulating immune responses. It is thought that *CTLA4* suppresses T-cell activation by either directly submitting inhibitory signals to T-cells or by modulating the phenotype of antigen presenting cells and thus decreasing their activating potency. As a key regulator of T-cell mediated immune response, *CTLA4* is a strong candidate for developing therapies for both autoimmune diseases and cancer. The gene encoding *CTLA4* is expressed differentially in different T-cell subpopulations with CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> immunosuppressive regulatory T-cells (Tregs) expressing it constitutively, whereas conventional CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cells (Tconvs) express it significantly only after activation. The exact mechanisms governing the differential expression of *CTLA4* in T-cell subpopulations are not known. There are different levels and mechanisms of gene expression regulation. Histone modifications shape the structure of chromatin, which in turn allows selective binding of specific, gene expression regulating factors. To determine how differences in histone modification patterns are associated with differential expression of *CTLA4* in T-cell subpopulations, chromatin immunoprecipitation (ChIP) with antibodies against modified histones (H3K4me1/me3, H3K27me3 and H3K36me3) was carried out in freshly isolated Treg and CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> Tconv cells.

Among the studied T-cell subsets, distinct histone methylation profiles were observed at the *CTLA4* promoter, the coding region and promoter-distal sites up- and downstream of the gene. The dissimilarities in histone modifications were reflected in differential *CTLA4* mRNA expression in freshly isolated naive/resting T-cell subpopulations and in the different ability of these populations to upregulate *CTLA4* mRNA expression in response to *in vitro* stimulation. In the freshly isolated T-cell subpopulations, Tregs had significantly higher *CTLA4* mRNA levels compared to CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> Tconvs. Also, Tregs were most potent in upregulating *CTLA4* transcription upon activation. The highly active *CTLA4* expression in this population correlates with generally higher levels of the modifications that are associated with active gene expression (H3K4me3, H3K36me3) and lower levels of the repressing H3K27me3 through all of the studied chromatin regions. By contrast, freshly isolated CD8<sup>+</sup> Tconv cells had virtually no *CTLA4* mRNA expression and were the least potent in inducing

*CTLA4* mRNA transcription upon activation. The inactivity of the *CTLA4* gene in this T-cell subpopulation was reflected in histone modification profiles, having generally less activating histone marks and more of the repressive mark compared to both CD4<sup>+</sup> Tconvs and Tregs. Freshly isolated CD4<sup>+</sup> Tconvs had significantly lower *CTLA4* mRNA level compared to Tregs, but somewhat higher level compared to CD8<sup>+</sup> Tconvs. Also, upon activation, CD4<sup>+</sup> Tconvs upregulated *CTLA4* expression faster and to a higher degree than CD8<sup>+</sup> cells but slower and to a lesser extent than Tregs. In CD4<sup>+</sup> Tconvs *CTLA4* promoter had a relatively high amount of the activating H3K4me3 and a low amount of the repressing H3K27me3, similarly to Tregs. Also, CD4<sup>+</sup> Tconv H3K36me3 pattern across the studied chromatin regions resembled more the pattern seen in Tregs rather than CD8<sup>+</sup> Tconvs. However, when comparing CD4<sup>+</sup> Tconvs and Tregs, several differences in H3K4 and H3K27 trimethylation levels were found at promoter-distal potential regulatory elements. Thus, higher H3K4me3 and lower H3K27me3 levels specifically at these promoter-distal sites may be important for the ability of Tregs to constitutively express *CTLA4*.

Another important outcome of this study is the fact, that it was possible to get results while using only  $2 \times 10^4$  cells per one immunoprecipitation reaction. Since Tregs are a very rare cell population, it is challenging to obtain sufficient numbers of freshly isolated, uncultured Tregs for ChIP analysis. If future studies were to involve patients with autoimmune diseases, the amount of donor blood would be limited, especially when dealing with child patients. However, with only  $2 \times 10^4$  cells per one immunoprecipitation reaction, the required amount of donor blood can be kept within acceptable limits and thus make such studies feasible.

## **Tänuavaldused**

Antud töö on valminud Tartu Ülikooli Biomeditsiini Instituudi immunoloogia õppetooli juures ja Molekulaar- ja Rakubioloogia Instituudi biotehnoloogia õppetooli juures. Tänan abi ja toetuse eest oma juhendajaid Kai Kisandit, Kalle Kisandit ja Neeme Tõnissoni, immunoloogia õppetooli ja molekulaarpatoloogia töögrupi liikmeid ning oma lähedasi.

## Kasutatud kirjandus

- Abrams, J.R. et al., 2000. Blockade of T lymphocyte costimulation with cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4-immunoglobulin (CTLA4Ig) reverses the cellular pathology of psoriatic plaques, including the activation of keratinocytes, dendritic cells, and endothelial cells. *J Exp Med*, 192(5), pp.681-94.
- Alegre, M.-L., Frauwirth, K.A. & Thompson, C.B., 2001. T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nat Rev Immunol*, 1(3), pp.220-28.
- Anjos, S.M. & Polychronakos, C., 2006. Functional evaluation of the autoimmunity-associated CTLA4 gene: the effect of the (AT) repeat in the 3'untranslated region (UTR). *J Autoimmun*, 27(2), pp.105-09.
- Anjos, S.M., Shao, W., Marchand, L. & Polychronakos, C., 2005. Allelic effects on gene regulation at the autoimmunity-predisposing CTLA4 locus: a re-evaluation of the 3' +6230G>A polymorphism. *Genes Immun*, 6(4), pp.305-11.
- Bachmann, M.F. et al., 2001. Normal pathogen-specific immune responses mounted by CTLA-4-deficient T cells: a paradigm reconsidered. *Eur J Immunol*, 31(2), pp.450-58.
- Bachmann, M.F. et al., 1999. Cutting edge: lymphoproliferative disease in the absence of CTLA-4 is not T cell autonomous. *J Immunol*, 163(3), pp.1128-31.
- Barski, A. et al., 2007. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell*, 129(4), pp.823-37.
- Bernstein, B.E., Meissner, A. & Lander, E.S., 2007. The mammalian epigenome. *Cell*, 128(4), pp.669-81.
- Blair, P.J. et al., 1998. CTLA-4 ligation delivers a unique signal to resting human CD4 T cells that inhibits interleukin-2 secretion but allows Bcl-X(L) induction. *J Immunol*, 160(1), pp.12-15.
- Boussiotis, V.A. et al., 1993. Activated human B lymphocytes express three CTLA-4 counterreceptors that costimulate T-cell activation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90(23), pp.11059-63.
- Bradshaw, J.D. et al., 1997. Interaction of the cytoplasmic tail of CTLA-4 (CD152) with a clathrin-associated protein is negatively regulated by tyrosine phosphorylation. *Biochemistry*, 36(50), pp.15975-82.
- Chuang, E. et al., 1997. Interaction of CTLA-4 with the clathrin-associated protein AP50 results in ligand-independent endocytosis that limits cell surface expression. *J Immunol*, 159(1), pp.144-51.
- Chuang, E. et al., 2000. The CD28 and CTLA-4 receptors associate with the serine/threonine phosphatase PP2A. *Immunity*, 13(3), pp.313-22.
- Chuang, E. et al., 1999. Regulation of cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4 by Src kinases. *J Immunol*, 162(3), pp.1270-77.
- Collins, A.V. et al., 2002. The interaction properties of costimulatory molecules revisited. *Immunity*, 17(2), pp.201-10.
- Creyghton, M.P. et al., 2010. Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107(50), pp.21931-36.
- Cutolo, M. & Nadler, S.G., 2013. Advances in CTLA-4-Ig-mediated modulation of inflammatory cell and immune response activation in rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.autrev.2013.01.001>.
- Dahl, J.A. & Collas, P., 2007. A quick and quantitative chromatin immunoprecipitation assay for small cell samples. *Front Biosci.*, 12, pp.4925-31.
- Ernst, J. et al., 2011. Mapping and analysis of chromatin state dynamics in nine human cell types. *Nature*, 473(7345), pp.43-49.
- Fahlén, L. et al., 2005. T cells that cannot respond to TGF-beta escape control by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *J Exp Med*, 201(5), pp.7373-746.

- Fallarino, F. et al., 2003. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol*, 4(12), pp.1206-12.
- Finck, B.K., Linsley, P.S. & Wofsy, D., 1994. Treatment of murine lupus with CTLA4Ig. *Science*, 265(5176), pp.1225-27.
- Finn, P.W. et al., 1997. Synergistic induction of CTLA-4 expression by costimulation with TCR plus CD28 signals mediated by increased transcription and messenger ribonucleic acid stability. *J Immunol*, 158(9), pp.4074-81.
- Friedline, R.H. et al., 2009. CD4+ regulatory T cells require CTLA-4 for the maintenance of systemic tolerance. *J Exp Med*, 206(2), pp.421-34.
- Gibson, H.M. et al., 2007. Induction of the CTLA-4 gene in human lymphocytes is dependent on NFAT binding the proximal promoter. *J Immunol*, 179(6), pp.3831-40.
- Gimmi, C.D. et al., 1993. Human T-cell clonal anergy is induced by antigen presentation in the absence of B7 costimulation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90(14), pp.6586-90.
- Gimmi, C.D. et al., 1991. B-cell surface antigen B7 provides a costimulatory signal that induces T cells to proliferate and secrete interleukin 2. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88(15), pp.6575-79.
- Graziani, G., Tentori, L. & Navarra, P., 2012. Ipilimumab: a novel immunostimulatory monoclonal antibody for the treatment of cancer. *Pharmacol Res*, 65(1), pp.9-22.
- Greenwald, R.J. et al., 2001. CTLA-4 regulates induction of anergy in vivo. *Immunity*, 14(2), pp.145-55.
- Haller, K. et al., 2004. Type 1 diabetes is insulin -2221 MspI and CTLA-4 +49 A/G polymorphism dependent. *Eur J Clin Invest*, 34(8), pp.543-48.
- Harper, K. et al., 1991. CTLA-4 and CD28 activated lymphocyte molecules are closely related in both mouse and human as to sequence, message expression, gene structure, and chromosomal location. *J Immunol*, 147(3), pp.1037-44.
- Heintzman, N.D. et al., 2009. Histone modifications at human enhancers reflect global cell-type-specific gene expression. *Nature*, 459(7243), pp.108-12.
- Heintzman, N.D. et al., 2007. Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. *Nat Genet*, 39(3), pp.311-18.
- Hoffmann, P. et al., 2006. Only the CD45RA+ subpopulation of CD4+CD25high T cells gives rise to homogeneous regulatory T-cell lines upon in vitro expansion. *Blood*, 108(13), pp.4260-67.
- Huber, S. et al., 2004. Cutting edge: TGF-beta signaling is required for the in vivo expansion and immunosuppressive capacity of regulatory CD4+CD25+ T cells. *J Immunol*, 173(11), pp.6526-31.
- Iida, T. et al., 2000. Regulation of cell surface expression of CTLA-4 by secretion of CTLA-4-containing lysosomes upon activation of CD4+ T cells. *J Immunol*, 165(9), pp.5062-68.
- Jago, C.B. et al., 2004. Differential expression of CTLA-4 among T cell subsets. *Clin Exp Immunol*, 136(3), pp.463-71.
- Jenkins, M.K., Taylor, P.S., Norton, S.D. & Urdahl, K.B., 1991. CD28 delivers a costimulatory signal involved in antigen-specific IL-2 production by human T cells. *J Immunol*, 147(8), pp.2461-66.
- Kolasinska-Zwierz, P. et al., 2009. Differential chromatin marking of introns and expressed exons by H3K36me3. *Nat Genet*, 41(3), pp.376-81.
- Kouki, T. et al., 2000. CTLA-4 gene polymorphism at position 49 in exon 1 reduces the inhibitory function of CTLA-4 and contributes to the pathogenesis of Graves' disease. *J Immunol*, 165(11), pp.6606-11.
- Kouzarides, T., 2007. Chromatin modifications and their function. *Cell*, 128(4), pp.693-705.

- Krogan, N.J. et al., 2003. Methylation of histone H3 by Set2 in *Saccharomyces cerevisiae* is linked to transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell Biol*, 23(12), pp.4207-18.
- Krummel, M.F. & Allison, J.P., 1996. CTLA-4 engagement inhibits IL-2 accumulation and cell cycle progression upon activation of resting T cells. *J Exp Med*, 183(6), pp.2533-40.
- Leach, D.R., Krummel, M.F. & Allison, J.P., 1996. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science*, 271(5256), pp.1734-36.
- Lee, K.-M. et al., 1998. Molecular basis of T cell inactivation by CTLA-4. *Science*, 282(5397), pp.2263-66.
- Lee, J.-S. & Shilatifard, A., 2007. A site to remember: H3K36 methylation a mark for histone deacetylation. *Mutat Res*, 618(1-2), pp.130-34.
- Lenschow, D.J. et al., 1992. Long-term survival of xenogeneic pancreatic islet grafts induced by CTLA4lg. *Science*, 257(5071), pp.789-92.
- Leung, H.T., Bradshaw, J., Cleaveland, J.S. & Linsley, P.S., 1995. Cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4, a high-avidity receptor for CD80 and CD86, contains an intracellular localization motif in its cytoplasmic tail. *J Biol Chem*, 270(42), pp.25107-14.
- Li, B., Carey, M. & Workman, J.L., 2007. The role of chromatin during transcription. *Cell*, 128(4), pp.707-19.
- Lindsten, T. et al., 1993. Characterization of CTLA-4 structure and expression on human T cells. *J Immunol*, 151(7), pp.3489-99.
- Ling, V. et al., 2001. Assembly and annotation of human chromosome 2q33 sequence containing the CD28, CTLA4, and ICOS gene cluster: analysis by computational, comparative, and microarray approaches. *Genomics*, 78(3), pp.155-68.
- Ling, V. et al., 1999. Complete sequence determination of the mouse and human CTLA4 gene loci: cross-species DNA sequence similarity beyond exon borders. *Genomics*, 60(3), pp.341-55.
- Linsley, P.S. et al., 1991. Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation. *J Exp Med*, 173(3), pp.721-30.
- Linsley, P.S. et al., 1992. Coexpression and functional cooperation of CTLA-4 and CD28 on activated T lymphocytes. *J Exp Med*, 176(6), pp.1595-604.
- Linsley, P.S. et al., 1995. Binding stoichiometry of the cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4 (CTLA-4). A disulfide-linked homodimer binds two CD86 molecules. *J Biol Chem*, 270(25), pp.15417-24.
- Liu, K. et al., 2001. Augmentation in expression of activation-induced genes differentiates memory from naive CD4+ T cells and is a molecular mechanism for enhanced cellular response of memory CD4+ T cells. *J Immunol*, 166(12), pp.7335-44.
- Livak, K.J. & Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4), pp.402-08.
- Madrenas, J. et al., 2004. Conversion of CTLA-4 from inhibitor to activator of T cells with a bispecific tandem single-chain Fv ligand. *J Immunol*, 172(10), pp.5948-56.
- Magistrelli, G. et al., 1999. A soluble form of CTLA-4 generated by alternative splicing is expressed by nonstimulated human T cells. *Eur J Immunol*, 29(11), pp.3596-602.
- Marshall, O.J., 2004. PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. *Bioinformatics*, 20(15), pp.2471-72.
- Mead, K.I. et al., 2005. Exocytosis of CTLA-4 is dependent on phospholipase D and ADP ribosylation factor-1 and stimulated during activation of regulatory T cells. *J Immunol*, 174(8), pp.4803-11.

- Mikkelsen, T.S. et al., 2007. Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature*, 448(7153), pp.553-60.
- Murayama, A. et al., 2006. A specific CpG site demethylation in the human interleukin 2 gene promoter is an epigenetic memory. *EMBO J*, 25(5), pp.1081-92.
- Ng, H.H., Robert, F., Young, R.A. & Struhl, K., 2003. Targeted recruitment of Set1 histone methylase by elongating Pol II provides a localized mark and memory of recent transcriptional activity. *Mol Cell*, 11(3), pp.709-19.
- Oaks, M.K. et al., 2000. A native soluble form of CTLA-4. *Cell Immunol*, 201(2), pp.144-53.
- Onishi, Y., Fehervari, Z., Yamaguchi, T. & Sakaguchi, S., 2008. Foxp3<sup>+</sup> natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105(29), pp.10113-18.
- Pekowska, A. et al., 2011. H3K4 tri-methylation provides an epigenetic signature of active enhancers. *EMBO J*, 30(20), pp.4198-210.
- Polansky, J.K. et al., 2008. DNA methylation controls Foxp3 gene expression. *Eur J Immunol*, 38(6), pp.1654-63.
- Qureshi, O.S. et al., 2012. Constitutive clathrin-mediated endocytosis of CTLA-4 persists during T cell activation. *J Biol Chem*, 287(12), pp.9429-40.
- Qureshi, O.S. et al., 2011. Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science*, 332(6029), pp.600-03.
- Roh, T.-Y., Cuddapah, S., Cui, K. & Zhao, K., 2006. The genomic landscape of histone modifications in human T cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103(43), pp.15782-87.
- Rozen, S. & Skaletsky, H., 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol*, 132, pp.365-86.
- Rydén, A. et al., 2012. Low expression and secretion of circulating soluble CTLA-4 in peripheral blood mononuclear cells and sera from type 1 diabetic children. *Diabetes Metab Res Rev*, 28(1), pp.84-96.
- Sakaguchi, S., Miyara, M., Costantino, C.M. & Hafler, D.A., 2010. FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol*, 10(7), pp.490-500.
- Sakaguchi, S. et al., 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*, 155(3), pp.1151-64.
- Schmidl, C. et al., 2009. Lineage-specific DNA methylation in T cells correlates with histone methylation and enhancer activity. *Genome Res*, 19(7), pp.1165-74.
- Schuettengruber, B. et al., 2007. Genome regulation by polycomb and trithorax proteins. *Cell*, 128(4), pp.735-45.
- Shahbazian, M.D. & Grunstein, M., 2007. Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation. *Annu Rev Biochem*, 76, pp.75-100.
- Sullivan, T.J. et al., 2001. Lack of a role for transforming growth factor-beta in cytotoxic T lymphocyte antigen-4-mediated inhibition of T cell activation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98(5), pp.2587-92.
- Suzuki, M.M. & Bird, A., 2008. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nat Rev Genet*, 9(6), pp.465-76.
- Takahashi, T. et al., 2000. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med*, 192(2), pp.303-10.
- Teft, W.A., Kirchhof, M.G. & Madrenas, J., 2006. A molecular perspective of CTLA-4 function. *Annu Rev Immunol*, 24, pp.65-97.
- Tian, Y. et al., 2011. Global mapping of H3K4me1 and H3K4me3 reveals the chromatin state-based cell type-specific gene regulation in human Treg cells. *PLoS One*, 6(11), p.e27770.

- Tivol, E.A. et al., 1995. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity*, 3(5), pp.541-47.
- Tivol, E.A. et al., 1997. CTLA4Ig prevents lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction in CTLA-4-deficient mice. *J Immunol*, 158(11), pp.5091-94.
- Tivol, E.A. & Gorski, J., 2002. Re-establishing peripheral tolerance in the absence of CTLA-4: complementation by wild-type T cells points to an indirect role for CTLA-4. *J Immunol*, 169(4), pp.1852-58.
- Turka, L.A. et al., 1992. T-cell activation by the CD28 ligand B7 is required for cardiac allograft rejection in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89(22), pp.11102-05.
- Ueda, H. et al., 2003. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature*, 423(6939), pp.506-11.
- Vermeulen, M. et al., 2007. Selective anchoring of TFIID to nucleosomes by trimethylation of histone H3 lysine 4. *Cell*, 131(1), pp.58-69.
- Vijayakrishnan, L. et al., 2004. An autoimmune disease-associated CTLA-4 splice variant lacking the B7 binding domain signals negatively in T cells. *Immunity*, 20(5), pp.563-75.
- Voigt, P. et al., 2012. Asymmetrically modified nucleosomes. *Cell*, 151(1), pp.181-93.
- Walker, L.S.K. & Sansom, D.M., 2011. The emerging role of CTLA4 as a cell-extrinsic regulator of T cell responses. *Nat Rev Immunol*, 11(12), pp.852-63.
- Wandstrat, A. & Wakeland, E., 2001. The genetics of complex autoimmune diseases: non-MHC susceptibility genes. *Nat Immunol*, 2(9), pp.802-09.
- Waterhouse, P. et al., 1995. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in CtIa-4. *Science*, 270(5238), pp.985-88.
- Wilson, C.B., Rowell, E. & Sekimata, M., 2009. Epigenetic control of T-helper-cell differentiation. *Nat Rev Immunol*, 9(2), pp.91-105.
- Wing, K. et al., 2008. CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science*, 322(5899), pp.271-75.
- Wing, K., Yamaguchi, T. & Sakaguchi, S., 2011. Cell-autonomous and -non-autonomous roles of CTLA-4 in immune regulation. *Trends Immunol*, 32(9), pp.428-33.
- Wolffe, A.P. & Matzke, M.A., 1999. Epigenetics: regulation through repression. *Science*, 286(5439), pp.481-86.
- Wu, Y. et al., 2006. FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell*, 126(2), pp.375-87.
- Yin, L., Schneider, H. & Rudd, C.E., 2003. Short cytoplasmic SDYMN segment of CD28 is sufficient to convert CTLA-4 to a positive signaling receptor. *J Leukoc Biol*, 73(1), pp.178-82.
- Yokosuka, T. et al., 2010. Spatiotemporal basis of CTLA-4 costimulatory molecule-mediated negative regulation of T cell activation. *Immunity*, 33(3), pp.326-39.

**Kasutatud veebiaadressid:**

<http://cran.r-project.org/>

<http://genome.ucsc.edu/>

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

Mina, Janika Pöder (sünnikuupäev: 23.05.1983)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose “Histoon H3 metülatsiooni mustrid *CTLA4* ekspressiooni regulatsioonis erinevates T-rakkude alapopulatsioonides”, mille juhendajad on Kai Kisand, MD, PhD, Kalle Kisand, MD, PhD ja Neeme Tõnisson, MD, PhD,

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, 27.05.2013