

DNA metülatsioonipõhine CD4⁺ reguleerivate T-rakkude analüüs

Reguleerivad T-rakud (Treg rakud) on olulised organismi immuuntolerantsuse ja immuunsüsteemi homöostaasi säilitamisel. Nende arenguks, funktsiooniks ja stabiilsuseks on vajalikud transkriptsioonifaktor FOXP3 ning Treg rakkudele omase DNA metülatsioonimustri kujunemine. FOXP3 ekspresseeritakse X-kromosoomilt ning tulenevalt geeni asukohast võib *FOXP3* CpG saitide metüleeritus erineda soospetsiifiliselt.

Rakutüübispetsiifilise epigenoomi alusel on võimalik eristada erinevaid rakutüüpe, seal hulgas ka Treg rakke. Hetkel üheks usaldusväärsemaks Treg rakkude markeriks on *FOXP3* geenis paiknev spetsiifiline demetüleeritud regioon. Antud magistritöös uuriti CD4⁺ Treg rakkude ennustamiseks oluliste CpG saitide metülatsiooniväärtuseid erinevates CD4⁺ T-rakupopulatsioonides ning soospetsiifiliselt. Lisaks prooviti välja töötada epigeneetikal põhinevat meetodit, mille kasutamisel oleks võimalik ennustada ja hinnata Treg rakkude osakaalu DNA metülatsioonimustri põhjal.

Märksõnad: Reguleerivad T-rakud, CD4⁺, FOXP3, metülatsioon

CERCS: B500 Immunoloogia, seroloogia, transplantoloogia

DNA methylation pattern-based analysis of CD4⁺ regulatory T cells

Regulatory T cells (Treg cells) are important for maintaining immunological self-tolerance and homeostasis by suppressing immune responses harmful to the host. Their development, function and stability are controlled by expression of transcription factor FOXP3 and the establishment of Treg cell specific CpG methylation pattern. *FOXP3* gene is encoded by the X chromosome. Therefore, the CpG sites of the *FOXP3* gene might be differentially methylated between males and females.

It is possible to differentiate cellular populations by cell-type-specific DNA methylation pattern. One of the most reliable identifications for Treg cells is a specific demethylated region in the *FOXP3* gene. The purpose of the current thesis was to study the changes in DNA methylation levels of the selected CpG sites for prediction of CD4⁺ Treg cells in different CD4⁺ cell subset and also to characterize methylation level differences between males and females. The second aim was to study the potential of epigenetic-based approach to predict and quantify Treg cells based on the DNA methylation pattern.

Keywords: Regulatory T cells, CD4⁺, FOXP3, methylation

CERCS: B500 Immunology, serology, transplantation

SISUKORD

SISUKORD	3
KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS.....	7
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	8
1.1. REGULATOORSED T-RAKUD.....	8
1.2. REGULATOORSETE T-RAKKUDE ARENG.....	8
1.2.1. Tuumusest pärinevad regulatoorsed T-rakud	8
1.2.2. Perifeeriast pärinevad regulatoorsed T-rakud.....	10
1.2.3. Regulatoorsete T-rakkude alatüübid.....	11
1.3. REGULATOORSETE T-RAKKUDE TUNNUSED	12
1.3.1. Regulatoorsete T-rakkude pinnamarkerid	12
1.3.2. Transkriptsioonifaktor FOXP3	13
1.4. REGULATOORSETE T-RAKKUDE METÜLATSIOON	14
1.4.1. Regulatoorsete T-rakkude markergeeni <i>FOXP3</i> metülatsioon.....	15
1.4.1.1. <i>FOXP3</i> geeni metülatsioon meestel ja naistel.....	16
1.4.2. Regulatoorsete T-rakkude spetsiifiliste geenide metülatsioon	17
1.5. DNA METÜLATSIOON BIOMARKERINA	18
2. EKSPERIMENTAALOSA	21
2.1. TÖÖ EESMÄRGID	21
2.2. MATERJAL JA METOODIKA	21
2.2.1. Uuringu valim.....	21
2.2.2. Perifeerse vere mononukleaarsete rakkude eraldamine.....	23
2.2.3. CD4 ⁺ T-rakkude magnetsortimine.....	23
2.2.4. Fluorestsents-aktiveeritud rakkude sortimine.....	24
2.2.5. Genoomse DNA eraldamine.....	26
2.2.6. Naatriumbisulfit-töötlus	27
2.2.7. Bisulfit-töödeldud genoomse DNA amplifitseerimine.....	28
2.2.7.1. Töös kasutatud praimerid	28
2.2.7.2. Polümeraasi ahelreaktsioon.....	28
2.2.7.3. Geel-elektroforees	30
2.2.8. Sekvenerimise raamatukogude ettevalmistamine	30
2.2.8.1. Amplikonide kokku tõstmine ja puhastamine	30
2.2.8.2. DNA kontsentratsiooni mõõtmine Qubitiga	30

2.2.8.3.	Amplikonide segu lahjendamine ja märgistamine Nextera XT indeksitega ...	30
2.2.8.4.	Indeksitega märgistatud proovide puhastamine	31
2.2.8.5.	Indeksitega märgistatud proovide kontsentratsiooni ja fragmentide suuruse mõõtmine	32
2.2.8.6.	Proovide kvaliteedi kontroll ning sekveneerimine tuumiklaboris	33
2.2.9.	Sekveneerimisandmete analüüs	33
2.3.	TULEMUSED	34
2.3.1.	Geelektroforees	34
2.3.2.	Rakutüübispetsiifiline CpG saitide metüleeritus	34
2.3.3.	Metüleerituse tase uuritavates CpG saitides	36
2.3.3.1.	Soospetsiifiline CpG saitide metüleeritus	38
2.3.4.	Mudeli loomine	39
2.3.5.	CD4 ⁺ Treg rakkude osakaalu ennustamiseks kasutatud CpG saidid	45
2.3.6.	CD4 ⁺ Treg rakkude mudeli töökindluse testimine	46
2.4.	ARUTELU	47
	KOKKUVÕTE	51
	SUMMARY	52
	TÄNUSÕNAD	54
	KASUTATUD KIRJANDUS	55
	KASUTATUD VEEBIAADRESSID	67
	LISAD	68
	Lisa 1. Valimisse 2 kuuluvate indiviidide voolutsütomeetria analüüs.	68
	Lisa 2. Töös uuritud CpG saidid, kasutatud praimerid ja amplikonide pikkused.	69
	Lisa 3. Töös analüüsitud 19 CpG saiti, nende asukoht kromosoomis ja amplikoni info.	71
	Lisa 4. Korrelatsioonimaatriks Treg rakkudes diferentsiaalselt metüleeritud kümne CpG saidi ja Treg rakkude osakaalude vahel.	72
	Lisa 5. Naiivsete Treg rakkude mudeli väljund, selles kasutatud CpG saidid ning mudeli töökindlus.	73
	Lisa 6. EM Treg rakkude mudeli väljund, selles kasutatud CpG saidid ning mudeli töökindlus.	74
	Lisa 7. CM Treg rakkude mudeli väljund, selles kasutatud CpG saidid ning mudeli töökindlus.	76
	Lisa 8. RTE Treg rakkude mudeli väljund, selles kasutatud CpG saidid ning mudeli töökindlus.	77
	LIHTLITSENTS	79

KASUTATUD LÜHENDID

AIC	Akaike informatsiooni kriteerium, ingl. k <i>Akaike information criterion</i>
APC	antigeene esitlevad rakud, ingl. k <i>antigen-presenting cells</i>
CCR7	ingl. k <i>C-C chemokine receptor type 7</i>
CD	diferentseerumise klaster, ingl. k <i>cluster of differentiation</i>
CM rakud	tsentraalsed mälorakud, ingl. k <i>central memory cells</i>
CNS	mittekodeeriv konserveerunud järjestus, ingl. k <i>conserved non-coding sequence</i>
CpG sait	tsütosiin-guaaniin sait, ingl. k <i>cytosine-guanine site</i>
CTLA4	ingl. k <i>cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>
EM rakud	efektor-mälorakud, ingl. k <i>effector memory cells</i>
eTreg rakud	efektor-regulatoorsed T-rakud, ingl. k <i>effector regulatory T cells</i>
FACS	fluorestsents-aktiveeritud rakkude sorteerimine, ingl. k <i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FBS	veise loote seerum, ingl. k <i>fetal bovine serum</i>
FDR	valeavastuse määr, ingl. k <i>false discovery rate</i>
FOXP3	ingl. k <i>forkhead box P3</i>
GITR	ingl. k <i>glucocorticoid-induced TNFR-related protein</i>
IL	interleukiin, ingl. k <i>interleukin</i>
MACS	rakkude magnetsortimine, ingl. k <i>magnetic-activated cell sorting</i>
MDSC	müeloidset päritolu supressorirakud, ingl. k <i>myeloid-derived suppressor cells</i>
MHC	peamine koesobivuskompleks, ingl. k <i>major histocompatibility complex</i>
nTreg rakud	naiivsed regulatoorsed T-rakud, ingl. k <i>naive regulatory T cells</i>
PBMC	perifeerse vere mononukleaarsed rakud, ingl. k <i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PCA	peakomponentanalüüs, ingl. k <i>principal component analysis</i>
pTreg rakud	perifeersed regulatoorsed T-rakud, ingl. k <i>peripherally induced regulatory T cells</i>

RMSE	juuritud keskmine ruutviga, ingl. k <i>root mean squared error</i>
RTE	ingl. k <i>recent thymic emigrants</i>
STAT	ingl. k <i>signal transducer and activator of transcription</i>
TAE	Tris-atsetaat-EDTA puhver, ingl. k <i>Tris-acetate-EDTA</i>
TCR	T-raku retseptor, ingl. k <i>T cell receptor</i>
Teff rakud	T-efektorrakud, ingl. k <i>effector T cells</i>
TGF- β	transformeeriv kasvufaktor beeta, ingl. k <i>transforming growth factor beta</i>
Th rakud	T-abistajarakud, ingl. k <i>T helper cells</i>
TIGIT	ingl. k <i>T cell immunoglobulin and ITIM domain</i>
Tn rakud	naiivsed T-rakud, ingl. k <i>naive T cells</i>
TNFR	ingl. k <i>tumor necrosis factor receptor</i>
Treg rakud	regulatoorsed T-rakud, ingl. k <i>regulatory T cells</i>
TSDR	Treg rakkude spetsiifiline demetüleeritud regioon, ingl. k <i>Treg-specific demethylated region</i>
tTreg rakud	tuumusest pärinevad regulatoorsed T-rakud, ingl. k <i>thymus derived regulatory T cells</i>
WBC	valged vererakud (ingl. k <i>white blood cells</i>)
XCI	X-kromosoomi inaktivatsioon, ingl. k <i>X chromosome inactivation</i>

SISSEJUHATUS

Regulaatoorsed T-rakud (Treg rakud, ingl. k *regulatory T cells*) on osa inimese immuunsüsteemist, millel on tähtis roll immunoloogilise tolerantsuse säilitamisel. Nende osakaalu või funktsiooni kadumine võib viia autoimmuunhaiguste tekkeni (Wing et al., 2019). Treg rakkudele on omane mitmete erinevate pinnamolekulide ekspressioon, mille abil supresseeritakse autoreaktiivseid immuunvastuseid (Lucca ja Dominguez-Villar, 2020). Nende arenguks, funktsiooniks ja stabiilsuseks on kõige olulisem transkriptsioonifaktori FOXP3 (ingl. k *forkhead box P3*) ekspressioon (Arvey et al., 2015).

Treg rakkude fenotüüp ja funktsioneerimine sõltub epigeneetilistest modifikatsioonidest. Kõige suurem osakaal on DNA metülatsioonil, mis tagab rakutüübispetsiifiliste geenide ekspressiooni (Ohkura ja Sakaguchi, 2020). Treg rakkudele omast geenide metüleeritust, mis eristab neid teistest immuunrakkude alampopulatsioonidest, nimetatakse Treg-spetsiifiliseks metülatsioonimustriks (Ohkura et al., 2012).

Hetkel on üks parimaid markereid Treg rakkude määramisel ja uurimisel FOXP3 geenis asuv Treg rakkude spetsiifiline demetüleeritud regioon ehk TSDR (ingl. k *Treg-specific demethylated region*) (Morikawa ja Sakaguchi, 2014). Erinevalt teistest Treg rakkude poolt ekspresseeritavatest geenidest asub FOXP3 geen X-kromosoomil. Tulenevalt selle asukohast võib FOXP3 geeni CpG saitide (ingl. k *cytosine-guanine site*) hüpometülatsioon erineda soospetsiifiliselt (Rainbow et al., 2015).

Antud magistritöö eesmärk on kirjeldada CD4⁺ Treg rakkude ennustamiseks oluliste CpG saitide metülatsioonitasemete väärtuseid nii erinevates CD4⁺ T-rakkudes kui ka soospetsiifiliselt. Töö teine eesmärk on uurida bisulfitsekveneerimispõhise meetodi väljatöötamise potentsiaali, mille kasutamisel oleks võimalik määrata vererakkudest isoleeritud DNA-st CD4⁺ Treg rakkude osakaalu DNA metülatsioonimustri põhjal.

Töö eksperimentaalne osa teostati Tartu Ülikooli meditsiiniteaduste valdkonnas bio- ja siirdemeditsiini instituudis molekulaarpatoloogia uurimisgrupis.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. REGULATOORSED T-RAKUD

Regulatoorsed T-rakud on T-rakkude alampopulatsioon, mille peamised ülesanded on immuun-tolerantsuse ja immuunsüsteemi homöostaasi säilitamine (Ohkura ja Sakaguchi, 2010). Nende arvu vähenemine või funktsiooni kadumine võib viia tõsiste autoimmuunhaiguste tekkeni (Arpaia et al., 2015). Samas on ka nende kuhjumisel kahjulik mõju. Viimast on täheldatud näiteks kasvajate korral, kus Treg rakkude kuhjumine takistab kasvajakasvatuse immuunvastuse teket soodustades kasvaja arengut (Pere et al., 2012; Sakaguchi et al., 2010; Curiel et al., 2004).

Antud magistritöös keskendutakse kõige olulisematele ja paremini kirjeldatud regulatoorset aktiivsust omavatele T-rakkudele, milleks on $CD4^+CD25^+$ Treg rakud. Nende osakaal perifeersetest $CD4^+$ T-rakkude populatsioonist inimesel on 5-10% (Sakaguchi et al., 1995). Lisaks varem välja toodud immuun-tolerantsuse tagamise rollile on nad võimelised kontrollima mitmeid füsioloogilisi ja patoloogilisi immuunvastuseid, sealhulgas ära hoidma äratõuke- ja allergilisi reaktsioone (Sakaguchi et al., 2010). Treg rakud suruvad maha ka põletikulisi protsesse ja immuunsüsteemi reageerimist organismi kommensiaalsete bakterite vastu (Ohkura ja Sakaguchi, 2010; Sakaguchi et al., 2010).

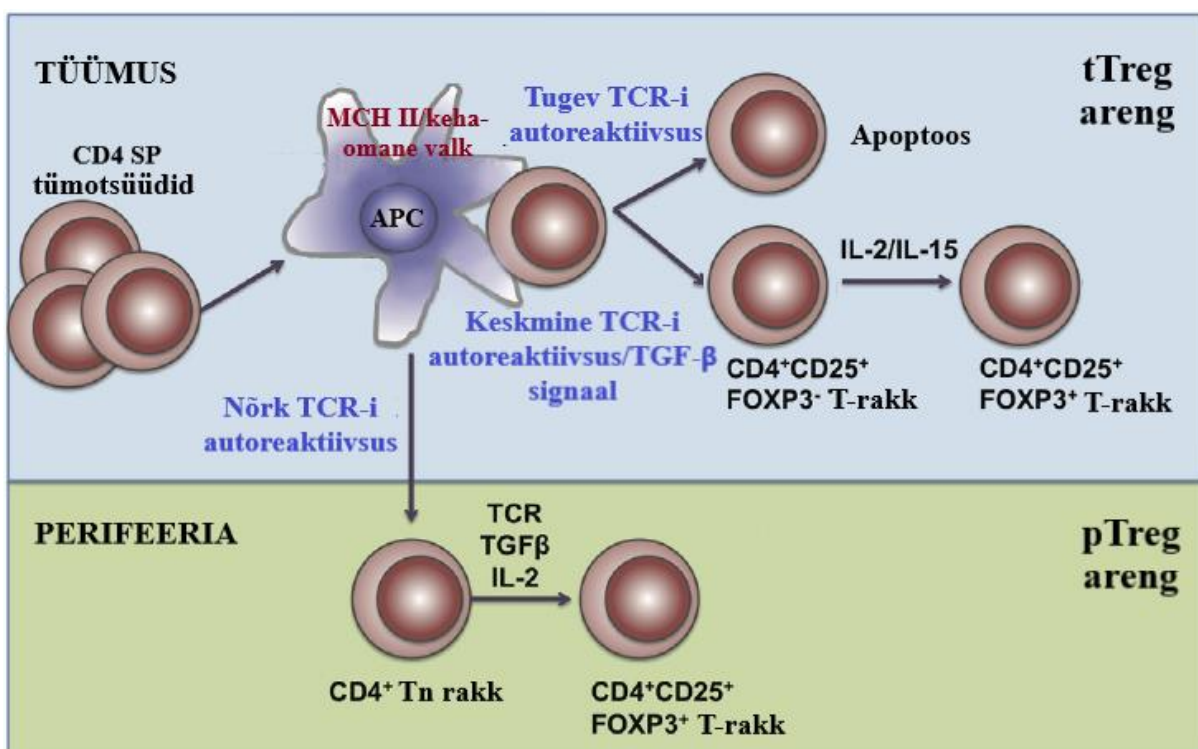
Treg rakke iseloomustab pinnamolekulide CD25 (IL-2 retseptori) ja CTLA-4 (ingl. k *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*) ekspressioon. Treg rakkudes endas on IL-2 ekspressioon alla surutud, mistõttu sõltuvad nad eksogeensest IL-2-st. Viimast sekreteerivad mitmed lümfotsüütide alatüübid, seal hulgas naiivsed T-rakud (Tn rakud, ingl. k *naive T cells*) ja T-efektorrakud (Teff rakud, ingl. k *effector T cells*) (Belz ja Masson, 2010; Murawski et al., 2006; Ohkura ja Sakaguchi, 2010). IL-2 tagab Treg rakkude ellujäämise ja proliferatsiooni ning on vajalik transkriptsioonifaktori FOXP3 ekspresseerimiseks aidates kaasa Treg rakkude diferentseerumisele ja funktsioneerimisele (Fontenot et al., 2005; Ohkura ja Sakaguchi, 2020).

1.2. REGULATOORSETE T-RAKKUDE ARENG

1.2.1. Tuumusest pärinevad regulatoorsed T-rakud

Enamik Treg rakke kujuneb tuumuses T-rakkude diferentseerimise käigus läbides positiivse ja negatiivse selektsiooni. Selektioonides on oluline roll antigeene esitlevatel rakkudel (APC, ingl. k *antigen-presenting cells*), milleks võivad näiteks olla dendriittrakud või tuumuse epiteelirakud, mis eksponeerivad peamise koosobivuskompleksi (MHC, ingl. k *major histocompatibility complex*) kaudu oma- ja võõrvalkude fragmente T-lümfotsüütidele (Guerra

et al., 2013). T-rakkude areng algab tuumuse kooreosas positiivse selektsiooniga, mille käigus selekteeritakse välja funktsionaalse T-raku retseptoriga (TCR, ingl. k *T cell receptor*) T-rakud. Need rakud jätkavad diferentseerumist tuumuse säsiosas, kus toimub negatiivne selektsioon (joonis 1). Selle tulemusel suunatakse apoptoosi T-rakud, mis seonduvad liiga tugevalt organismi enda valkudega, et vältida autoimmuunsete T-rakkude kujunemist (Boehncke ja Brembilla, 2019; Itoh et al., 1999). Madala autoreaktiivsusega T-rakkudest arenevad tavalised T-rakud, kuid nii-öelda keskmiselt kehaomaseid valke ära tundvatest tühotsüütidest arenevad tuumusest pärinevad Treg rakud (tTreg rakud, ingl. k *thymus-derived regulatory T cells*) (Nie et al., 2015). Selline T-rakkude koolitamine aitab tekkida immuuntolerantsusel, mille säilitamise eest vastutavadki tTreg rakud (Sakaguchi et al., 2010).



Joonis 1. tTreg ja pTreg rakkude areng. Tuumuses läbivad CD4⁺ tühotsüütid negatiivse selektsiooni, mille tulemusena eristuvad tuumusest pärinevate Treg (tTreg) rakkude eellasrakud, mis reageerivad kehaomastele valkudele keskmise aktiivsusega. Tugevalt autoreaktiivsed T-rakud suunatakse apoptoosi, nõrgalt reageerivatest T-rakkudest arenevad aga tavalised T-rakud. Sellist T-rakkude koolitamist viivad läbi antigeene esitlevad rakud (APC), mis eksponeerivad peamise koesobivuskompleksi (MHC) kaudu organismiomaste valkude fragmente. T-raku retseptori (TCR) signaal tTreg eellasrakkudes soodustab pinnaretseptori CD25 ekspressiooni, mis omakorda koostöös IL-2 ja IL-15 indutseerivad FOXP3 ekspressiooni. Teatud tingimustes võivad perifeerias naiivsed CD4⁺ T-rakud (Tn) diferentseeruda CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ T-rakkudeks ehk perifeeriast pärinevateks Treg (pTreg) rakkudeks. Selleks on vajalik antigeeni (TCR) stimulatsioon ning tsütokiinide (IL-2 ja TGF-β) olemasolu. Kohandatud Nie et al. (2015) järgi.

tTreg rakkude arengus on olulisel kohal transkriptsioonifaktor FOXP3 ning tsütokiinid IL-2 ja transformeeriv kasvufaktor beeta (TGF- β , ingl. k *transforming growth factor beta*) (Ohkura ja Sakaguchi, 2010). TCR-i signaal indutseerib Treg eellasrakkudes pinnaretseptori CD25 ekspressiooni (Tai et al., 2013), mida toetab ka tüumuses APC-de poolt toodetav IL-2 (Lafaille et al., 2004; Weist et al., 2015). Autoreaktiivsete tümotsüütide apoptoos soodustab aga TGF- β taseme tüosu, mis on oluline arenevate Treg rakkude ellujäämiseks (Ouyang et al., 2010). Transkriptsioonifaktori FOXP3 ekspressiooni indutseerivad omakorda CD25 ekspressioon ja TGF- β rikas keskkond (Konkel et al., 2014). Lisaks aitavad sellele kaasa ka IL-2 ja IL-15, mis soodustavad vajalike transkriptsioonifaktorite seondumist *FOXP3* geeni promootorile (Lio ja Hsieh, 2008; Vang et al., 2008).

1.2.2. Perifeeriast pärinevad regulatoorsed T-rakud

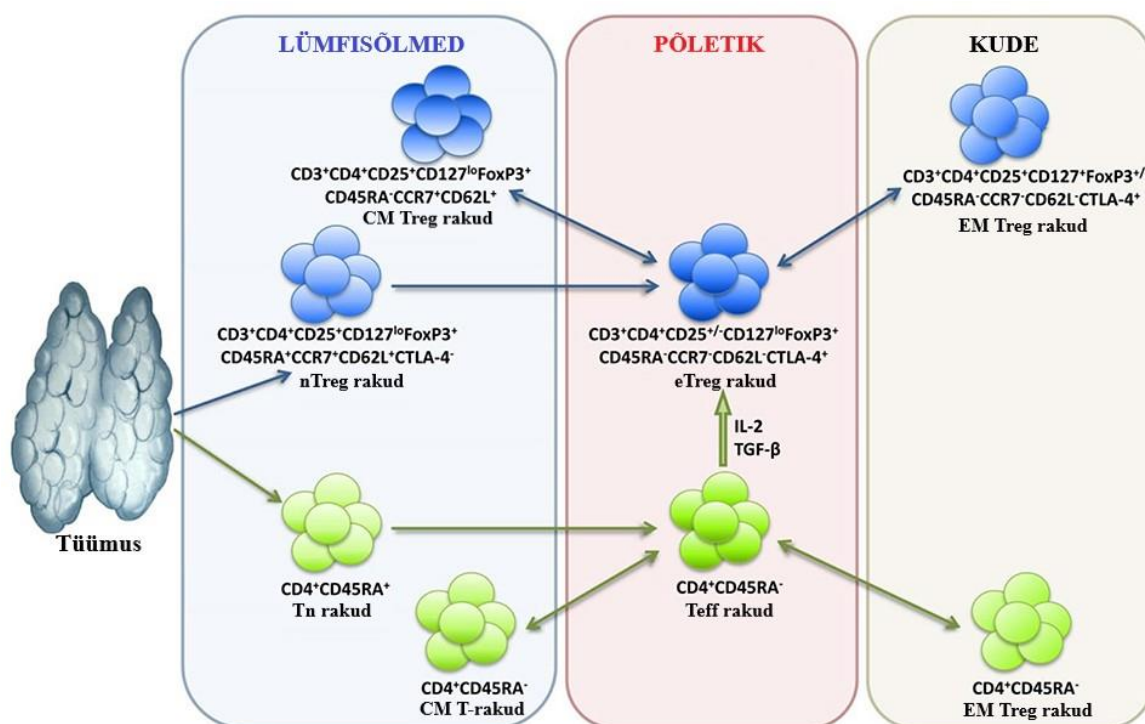
Treg rakud võivad areneda ka perifeerias naiivsetest CD4⁺ T-rakkudest ehk antigeeniga veel mitte kohtunud küpsetest T-rakkudest. Selliseid funktsionaalselt ja fenotüubiliselt Treg-sarnaseid rakke nimetatakse perifeeriast pärinevateks Treg rakkudeks (pTreg rakud, ingl. k *peripherally induced regulatory T cells*) (Sekiya et al., 2016; Ohkura ja Sakaguchi, 2010). pTreg rakkude arenemise põhjusteks võivad olla näiteks tTreg rakkude vähenenud arv, funktsiooni häiritus või põletik (Itoh et al., 1999). Nende areng toimub perifeersetes lümfooid-organites (Edelblum, 2016), kus lisaks TCR-i stimulatsioonile on vajalik IL-2. Kõige tähtsam on aga TGF- β olemasolu (joonis 1) (Mikami et al., 2020). TCR-i stimulatsioonijärgselt indutseerib TGF- β CD4⁺CD25⁻ naiivsetes T-rakkudes FOXP3 ekspressiooni (Chen et al., 2003; Konkel et al., 2014), aidates kaasa pTreg rakkude funktsioneerimisele (Fantini et al., 2004). Eksogeenne IL-2 on vajalik arenevate pTreg rakkude küpsemiseks ja ellujäämiseks ning pinnaretseptori CD25 ekspressiooni indutseerimiseks (Boyman ja Sprent, 2012).

Loomudelitel peal on näidatud, et pTreg rakkude osakaal perifeersetest FOXP3⁺ Treg rakkudest on ~20% (Thornton et al., 2010). Nende puudumisel pole tTreg rakud üksi võimelised supresseerima kroonilist põletikku ja autoimmuunsust (Haribhai et al., 2011). Seetõttu peetakse pTreg rakkude peamisteks ülesanneteks tTreg rakkude toetamist perifeerse tolerantsuse säilitamisel ning lokaalsete põletike kontrolli all hoidmist. Lisaks on neil oluline roll seedetrakti limaskestas ja raseduse ajal platsentas tagamaks tolerantsust vastavalt soolestiku mikrofloora ja loote vastu (Sekiya et al., 2016).

1.2.3. Regulaatorsete T-rakkude alatüübid

Regulaatorseid Treg rakke saab nende arenemise staadiumi ehk diferentseerumise alusel jagada omakorda alatüüpideks. Nendeks on naiivsed (nTreg rakud, ingl. k *naive regulatory T cells*), RTE (ingl. k *recent thymic emigrants*), efektor (eTreg rakud, ingl. k *effector regulatory T cells*), tsentraalsed mälu (CM, ingl. k *central memory*) ja efektor-mälu (EM, ingl. k *effector memory*) Treg rakud. RTE Treg rakkudeks nimetatakse naiivsete Treg rakkude alarühma, mis on vabastatud tüümusest (Booth et al., 2010; Valmori et al., 2005).

Treg rakkude diferentseerumine toimub perifeerias. Kui nTreg rakud kohtuvad sekundaarses lümfoidorganis (näiteks lümfisõlmes) antigeeniga, siis see toob kaasa nende paljunemise ning funktsionaalse diferentseerumise – nTreg rakud diferentseeruvad eTreg rakkudeks (joonis 2). Viimased liiguvad põletiku asukohta ning aitavad elimineerida põletiku põhjustajat (Rosenblum et al., 2016).



Joonis 2. CD4⁺ Treg rakkude diferentseerumine. Tn ja nTreg rakud kujunevad välja tüümuses ning nende diferentseerumine jätkub pärast tüümusest lahkumist. Kohtudes perifeerias antigeeniga panevad need aluse efektor Treg ehk eTreg rakkudele, mis liiguvad põletiku asukohta, et aidata võidelda põletikutekitajaga. Pärast esmakordset antigeeniga kohtumist paneb väike osa eTreg rakke aluse CM Treg rakkudele, mis jäävad sekundaarsetesse lümfoidorganitesse, ning EM Treg rakkudele, mis migreeruvad perifeersetesse kudedesse. Kohtudes antigeeniga teistkordselt on mälorakud võimelised kiiresti jagunema ning omandama eTreg raku fenotüübi. Ka konventsionaalsed T-rakud on võimelised põletikulistes tingimustes diferentseeruma eTreg rakkudeks IL-2 ja TGF- β olemasolul. Kohandatud Shevryev ja Tereshchenko (2020) järgi.

eTreg rakkude eluiga on lühike, kuid esmakordsel antigeeniga kokkupuutel jääb nendest väike osa mälu-Treg rakkudeks – kujunevad välja kaks mälu-Treg rakkude populatsiooni. Esimene on CM Treg rakkude alampopulatsioon, mis asub peamiselt lümfisõlmedes, ning teise moodustavad perifeersetes kudedes asuvad EM Treg rakud. Mõlemad võivad organismis püsida pikka aega isegi antigeeni puudumisel (Rosenblum et al., 2016). Tulenevalt nende asukohast aitavad CM Treg rakud peamiselt kontrollida immuunvastuste tekkimist lümfoïdorganites (näiteks lümfisõlmedes), kuid EM Treg rakud moduleerivad immuunvastuseid perifeersetes kudedes (Tosello et al., 2008). Samas on need mälu-Treg rakud antigeeniga teistkordsel kohtumisel võimelised ka kiiresti jagunema ning omandama eTreg fenotüübi (Sanchez et al., 2012; Smigielski et al., 2013).

Treg rakkude funktsionaalsus on läbi elu stabiilne ning nende osakaalu organismis hoitakse range kontrolli all (Santner-Nanan et al., 2008; Setoguchi et al., 2005). Samas võib vananedes Treg rakkude alatüüpide suhe muutuda. On täheldatud, et vanematel inimestel on suurem EM Treg ja CM Treg rakkude osakaal ning madalam nTreg ja RTE Treg rakkude osakaal (Booth et al., 2010; Santner-Nanan et al., 2008). Lisaks on näidatud, et indiviididel üle 60-aasta vana võib Treg rakkude üldine osakaal organismis olla siiski kõrgem võrreldes täiskasvanutega vanuses 20-25 eluaastat (Santner-Nanan et al., 2008) ning erineda pea 2-4 korda (Gregg et al., 2005). Üldist Treg rakkude tõusu võivad põhjustada ka põletikulised haigused ning kasvaja (Belkaid ja Rouse, 2005). Edaspidi kirjeldatakse üldiselt CD4⁺ Treg rakke ning alatüüpide juurde tullakse tagasi tulemuste juures.

1.3. REGULATOORSETE T-RAKKUDE TUNNUSED

1.3.1. Regulaatorsete T-rakkude pinnamarkerid

Regulaatorsetele T-rakkudele on iseloomulik erinevate pinnamarkerite ekspressioon. Nende hulgast võib leida mitmeid kostimulaatorseid (näiteks CD28) ja koinhibiitorseid molekule (näiteks CTLA-4), TNFR (ingl. k *tumor necrosis factor receptor*) superperekonda kuuluvaid retseptoreid (näiteks TNFR2 ja GITR, ingl. k *glucocorticoid-induced TNFR-related protein*) ning mitmeid teisi pinnamolekule (Chen ja Oppenheim, 2011; Kim ja Leonard, 2007). Ühed olulisemad on CD25, CTLA-4 ja GITR, mille ekspressioon korreleerub transkriptsioonifaktori FOXP3 ekspressiooniga (Yagi et al., 2004; Zheng ja Rudensky, 2007). FOXP3 puudumisel antud pinnaretseptoreid CD4⁺ T-rakkudel ei ekspresseerita (Fontenot et al., 2003).

Treg rakkudele omased pinnamarkerid panustavad immuuntolerantsuse säilitamisesse. CD25 seob Treg raku funktsioneerimiseks ja regulatoorse funktsiooni säilitamiseks hädavajalikku tsütokiini IL-2 (Chen ja Oppenheim, 2011). CTLA-4 on aga tuumuses arenevatel Treg rakkudel vajalik autoreaktiivse T-rakkude repertuaari kujunemiseks ning autoreaktiivsete Teff rakkude aktivatsiooni pärssimiseks (Yamaguchi et al., 2013). Pinnamolekulide CD25 ja CTLA-4 kõrval on tähtis ka GITR, mille ekspressioon võrreldes teiste T-rakkude alatüüpidega on kõrge just CD4⁺ Treg rakkude populatsioonil (McHugh et al., 2002). GITR on oluline Treg rakkude diferentseerumiseks ja küpsemiseks ning kaitseks apoptoosi eest (Ronchetti et al., 2015; Nocentini et al., 1997).

1.3.2. Transkriptsioonifaktor FOXP3

Treg rakkude arenguks on kõige tähtsam transkriptsioonifaktori FOXP3 ekspressioon, mis tagab nende supresseeriva funktsiooni (Williams and Rudensky, 2007) ning vähendab proliferatsioonivõimet (McMurchy et al., 2013). Selle ekspressiooni käivitamises osalevad mitmed transkriptsioonifaktorid, kuid stabiilset ekspressiooni küpsetes Treg rakkudes aitab hoida IL-2 (Rubtsov et al., 2010) läbi JAK-STAT signaaliraja. IL-2 seondumine oma retseptorile aktiveerib antud signaalirajas mitmeid faktoreid, seal hulgas ka STAT (ingl. k *signal transducer and activator of transcription*) perekonda kuuluva faktori STAT5. Viimane seondub *FOXP3* geeni TSDR piirkonda indutseerides FOXP3 ekspressiooni (Consonni et al., 2021; Passerini et al., 2008; Zheng et al., 2010).

FOXP3 käitub sõltuvalt sihtmärkgeenist transkriptsiooni aktivaatori või repressorina. FOXP3 surub alla CD4⁺ T-rakkudele iseloomulike tsütokiinide produktsiooni, sealhulgas IL-2 transkriptsiooni (Lin et al., 2007). Selleks seondub FOXP3 *IL2* geeni promootorpiirkonda ning indutseerib lokaalset histoonide deatsetülatsiooni – epigeneetilist modifikatsiooni, mis surub maha geeni ekspresseerumist (Chen et al., 2006). Teisalt aitab FOXP3 kaasa Treg rakkudele omaste pinnamolekulide sünteesile ja geenide *IL2RA* (ingl. k *interleukin IL2 receptor alpha*, kodeerib pinnaretseptorit CD25), *GITR* ja *CTLA4* transkriptsioonile (Ohkura ja Sakaguchi, 2010; Sasidharan Nair et al., 2018; Wing et al., 2019). Selleks seondub FOXP3 taaskord nende geenide promootorile, kuid põhjustab hoopis epigeneetilisi muutusi, mis soodustavad geeni ekspressiooni (Chen et al., 2006). Lisaks on transkriptsioonifaktorile FOXP3 omane positiivne autoregulatsioon. See seondub *FOXP3* geenis introonsesse TSDR piirkonda aidates niiviisi

säilitada enda ekspressiooni ning Treg rakkude fenotüüpi (Ohkura ja Sakaguchi, 2010; Zheng et al., 2010).

Transkriptsioonifaktorit FOXP3 ekspresseeritakse X-kromosoomilt (Chatila et al., 2000) ning mutatsioon *FOXP3* geenis põhjustab raskekujulist immuunsüsteemi häiret, mida nimetatakse IPEX sündroomiks. Geeni asukoha tõttu avaldub meestel sageli tugevam IPEX-i fenotüüp (Bacchetta et al., 2018). IPEX lühend tuleb järgmistest sündroomide omastest haigustunnustest: immuunsuse düsregulatsioon, polüendokrinopaatia, enteropaatia, X-liitelisus (Bennett et al., 2001; Clark et al., 1999). Lisaks iseloomustavad sündroomi tõsised mitmeid organsüsteeme haaravad autoimmuunhaigused, põletik, allergiad ja lühike eluiga (McMurchy et al., 2013).

FOXP3 geeni ekspressioonitase võib soospetsiifiliselt erineda. Nimelt on näidatud, et tervel meesterahval võib see olla 2-3 korda kõrgem (Singh ja Bischoff, 2021). Ekspressiooni erinevuse üheks põhjuseks arvatakse olevat naissuguhormoon ehk östrogeen, mis supresseerib naistel CD4⁺ Treg rakkude arvu ja funktsionaalset aktiivsust (Arruvito et al., 2007; Nie et al., 2015; Singh and Bischoff, 2021). Samas on kindlasti oma roll ka genoomsel vermimisel (ingl. *genomic imprinting*), mis mõjutab muu hulgas X-liiteliste geenide ekspressiooni (Bartolomei et al., 2020).

1.4. REGULATOORSETE T-RAKKUDE METÜLATSIOON

DNA metülatsioon on üks peamisi epigeneetilisi modifikatsioone, mis mõjutab Treg rakkude arengut ja stabiilse geeniekspressioonimustrit. Tegu on modifikatsiooniga, mis ei muuda DNA järjestust, küll aga mõjutab geenide avaldumist (Shevach ja Thornton, 2014; Schmidl et al., 2009). See esineb enamasti CpG saidi kontekstis, kus metüülrühm lisatakse tsütosiini (C) nukleotiidile, millele järgneb guaniin (G). P-täht tähistab C ja G vahel olevat fosfodiestersidet. CpG saitide metüleerituse taseme langust nimetatakse hüpometülatsiooniks ning metüleerituse tõusu hüpermetülatsiooniks. Inimese genoomis on 70-80% CpG saitidest metüleeritud (Heinaru, 2012; Li ja Zhang, 2014).

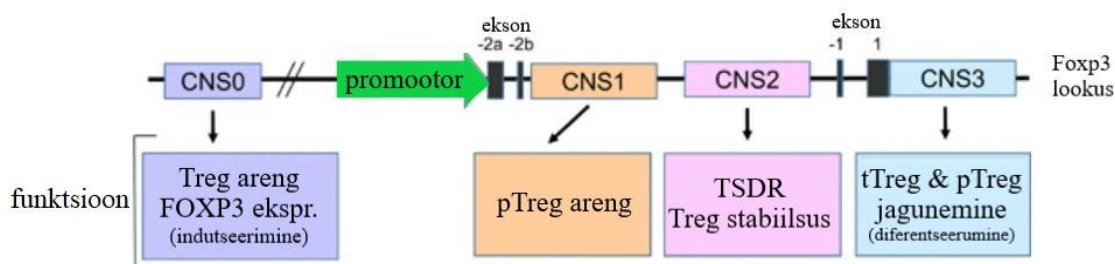
DNA metülatsioon on oluline mitmetes erinevates protsessides nagu näiteks embrüonaalses arengus ja varem mainitud genoomses vermimises. Enamasti seostatakse seda geeniekspressiooni regulatsiooniga ning selle mõju sõltub asukohast geenis. Nimelt on täheldatud, et geenikehades esinev DNA metülatsioon on seotud pigem kõrgema geeniekspressiooniga, kuid promootorite hüpermetülatsioon geeni vaigistamisega (Jjingo et al., 2012; Yang et al., 2014).

DNA metülatsiooni uurimiseks on võimalik kasutada mitmeid meetodeid. Üks usaldusväärsemaid meetodeid on bisulfitsekveneerimine, kus uuritavale DNA-le tehakse naatriumbisulfitöötlus, mille käigus metüleerimata tsütosiinid konverteeritakse uratsiiliks, kuid metüleeritud tsütosiinid jäävad puutumata. Sellele järgneb järgmise põlvkonna sekveneerimine (Frommer et al., 1992; Li and Zhang, 2014).

DNA metülatsioon erineb rakutüübiti ning see on ka üheks mehhanismiks, kuidas tagatakse rakutüübispetsiifiline geeniekspressioon (Dor ja Cedar, 2018). Treg rakkudele omase epigenoomi kujunemine algab juba tuumuses ning jätkub perifeerias kujundades Treg rakkudele omase fenotüübi (Ohkura et al., 2012; Herppich et al., 2019; Wing et al., 2019). Treg-spetsiifilise metülatsioonimustri kujunemine on FOXP3 ekspressioonist sõltumatu protsess (Ohkura et al., 2012; Schmidl et al., 2009).

1.4.1. Regulaatorsete T-rakkude markergeeni *FOXP3* metülatsioon

FOXP3 geeni intronite alas asub kolm evolutsiooniliselt konserveerunud mittekodeerivat järjestust (CNS, ingl. k *conserved noncoding sequence*): CNS1, CNS2 ja CNS3. Nende numbriline järjestus tuleneb kaugusest transkriptsiooni algussaidist (Sekiya et al., 2016). Antud konserveerunud piirkondade kõrval on oluline ka geeni promootorpiirkond, mis on sarnaselt CNS-dega epigeneetilise kontroll all. Treg rakkudes on *FOXP3* promootori CpG saidid hüpometüleeritud soodustades geeni transkriptsiooni (Janson et al., 2008). *FOXP3* lookus, olulisemad konserveerunud piirkonnad ning nende peamised funktsioonid on välja toodud joonisel 3.



Joonis 3. *FOXP3* lookuse konserveerunud elementide CNS0-CNS3 paiknemine ning nende olulisemad funktsioonid. Eksonid -2a, -2b ja -1 on mittekodeerivad, ekson 1 on aga kodeeriv *FOXP3* ekson. Kohandatud Lee ja Lee (2018) järgi.

CNS1 asub esimeses intronis, ca 2 kb kaugusel *FOXP3* promootorist (Tone et al., 2008) ning on seotud TGF- β signaalirajaga. See on oluline pTreg rakkudele, kuid ei mõjuta tTreg arengut, sest CNS1 deletsiooni korral pole pTreg rakud võimelised indutseerima FOXP3 ekspressiooni

(Zheng et al., 2010). CNS1 piirkonda seondub TGF- β signaaliraja faktor Smad, mis aitab stabiliseerida ja säilitada CNS2 hüpometülatsiooni (ja sellega FOXP3 ekspressiooni) pTreg rakkudes (Ouyang et al., 2010). Erinevalt teistest CNS piirkondadest puuduvad CNS1-s CpG saidid (Lal et al., 2009) ning seda reguleerivad histoonide modifikatsioonid (Tone et al., 2008).

CNS2 asub samuti esimeses intronis paiknedes umbes 4 kb allavoolu *FOXP3* promootorist. See sisaldab rohkelt CpG saite, mis on Treg rakkudes demetüleeritud, mistõttu nimetatakse seda piirkonda sageli ka Treg rakkude spetsiifiliseks demetüleeritud regiooniks ehk TSDR-iks (Kressler et al., 2021; Li et al., 2014). TSDR demetülatsiooni tõttu on sinna võimelised seonduma mitmed transkriptsioonifaktorid, millest kõige olulisem on FOXP3 ise. Seega on CNS2 üks peamisi funktsioone aidata kaasa FOXP3 stabiilsele ekspressioonile (Zheng et al., 2010; Ono et al., 2007).

CNS3 asub *FOXP3* geenis esimese eksoni kõrval ning umbes 7 kb kaugusel promootorist. See mängib olulist rolli Treg rakkude jagunemisel ja diferentseerumisel, sest CNS3 deletsiooni korral on nende areng häiritud (Feng et al., 2015). Selle piirkonna CpG saitide demetülatsioon ning erinevate transkriptsioonifaktorite seondumine soodustab epigeneetilisi muutusi *FOXP3* promootorpiirkonnas ja *FOXP3* lookuse avamist Treg eellasrakkudes. Seepärast kutsutakse CNS3 piirkonda ka „pioneer-elementiks“ (Zheng et al., 2010).

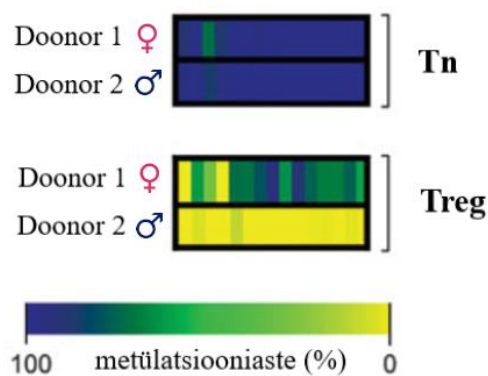
2017. aastal kirjeldati veel ühte regulatoorset CNS piirkonda, mida nimetatakse CNS0-ks. See asub *FOXP3* geeni transkriptsiooni algussaidist 8,5 kb ülesvoolu ning selle aktiveerumine indutseerib teiste CNS piirkondade epigeneetilisi muutusi (Zheng et al., 2010). Seetõttu kutsutakse CNS0 piirkonda ka „super-enhanseriks“. See on hädavajalik FOXP3 transkriptsiooni alustamisel Treg rakkudes ning mängib väga olulist rolli nende arengus ja diferentseerumises tuumuses (Ono, 2020; Kitagawa et al., 2017).

1.4.1.1. *FOXP3* geeni metülatsioon meestel ja naistel

FOXP3 geenis paikneva TSDR demetüleeritus eristab Treg rakke teistest rakutüüpidest ning ka perifeersetest vererakkudest olles oluline Treg rakkude kujunemiseks ja FOXP3 ekspressiooniks (Baron et al., 2007; Kressler et al., 2021). Nagu varasemalt mainitud, asub *FOXP3* geen X-kromosoomis. Sarnaselt teistele X-liitelistele geenidele saavutatakse naistel *FOXP3* geeni doosikompensatsioon ehk ekspressiooni võrdsustamine ühe X-kromosoomi inaktivatsiooniga (XCI) (Tommasini et al., 2002). Tulenevalt XCI-st võivad *FOXP3* geenis asuvate CpG saitide metüleeritus naiste puhul erineda (Carrel ja Willard, 2005; Minskaia et al.,

2018). Samas täpne *FOXP3* geeni ekspressiooni regulatsioon naistel on veel mõistatuseks, sest suurem osa *FOXP3* lookuse metülatsiooni-uuringuid on kaasanud ainult meesdoonoreid, et välistada XCI mõju (Minskaia et al., 2018).

Senised uuringute tulemused näitavad, et meestel on TSDR piirkond peaaegu täielikult demetüleeritud, kuid naiste puhul on metüleeritus varieeruv – CpG saidid võivad olla täielikult demetüleeritud või erineda meeste CpG saitide metüleerituse tasemest ca 50% (Minskaia et al., 2018; Rainbow et al., 2015). Sageli esineb naistel TSDR piirkonnas hemimetülatsioon, kus CpG sait on ühel *FOXP3* alleelil metüleeritud ning teisel demetüleeritud (Spreafico et al., 2014). Sellist tulemust kinnitab *FOXP3* geeni metüleerituse võrdlus Tn ja Treg rakkudes (joonis 4), kus Tn rakkude korral esineb nii meestel kui naistel TSDR piirkonna täielik metüleeritus. Samas Treg rakkude populatsiooni korral on meestel TSDR täielikult demetüleeritud, naistel esineb aga hemimetülatsioon (Baron et al., 2007).

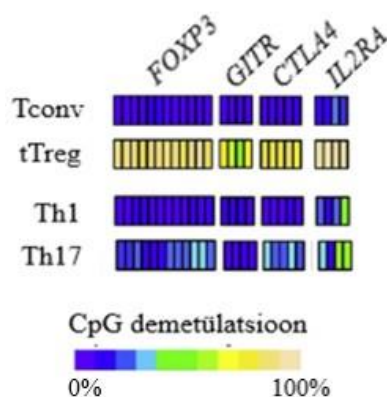


Joonis 4. Mehe ja naise TSDR piirkonna CpG saitide metüleeritus Tn ja Treg rakkudes. Üks kastike tähistab TSDR-s asuvat CpG saiti. Värvikoodiga on eristatud CpG saiti metülatsioonitase. Kahe doonori (1 – naine, 2 – mees) TSDR piirkonna CpG saitide metüleeritus Tn rakkudes on sarnane, kuid Treg rakkudes esineb naistel TSDR piirkonna kõrgem metüleeritus. Kohandatud Baron et al. (2007) järgi.

1.4.2. Regulaatorsete T-rakkude spetsiifiliste geenide metülatsioon

Treg rakkudes teisiti metüleeritud regioone nimetatakse Treg-spetsiifiliselt demetüleeritud piirkondadeks (Treg-DR, ingl. k *Treg-specific demethylated region*), mille alla kuulub ka *FOXP3* geeni intronis asuv TSDR. Seni ei ole teada, kas demetülatsiooni põhjustavad samad või erinevad faktorid ning täpne Treg-DR kujunemise mehhanism on veel kindlaks tegemata. Kui Treg-DR piirkondades ei esine hüpometülatsiooni, siis on Treg-spetsiifiliste geenide ekspressioon langenud (Herppich et al., 2019; Ohkura et al., 2012).

Erinevatest Treg rakuspetsiifiliste geenide metülatsioonimustri uuringutest on selgunud, et Treg-DR piirkonnad võivad paikneda promootoris ning ka geenikehas. See on ühine joon mitmetel Treg rakkudes ekspresseeruvatel geenidel, seal hulgas geenidel *IL2RA* (kodeerib pinnaretseptorit CD25), *CTLA4* ja *GITR* (joonis 5) (Ohkura et al., 2012; Sasidharan Nair et al., 2018). Nende geenide promootorpiirkonnad on Treg rakkudes hüpometüleeritud (Morikawa et al., 2014; Ohkura et al., 2012). Nagu varasemalt mainitud soodustab see transkriptsioonifaktori FOXP3 seondumist, mis reguleerib antud geenide ekspressiooni (Zhang et al., 2013).



Joonis 5. Treg rakuspetsiifiliste geenide CpG saitide metüleeritus erinevates T-raku alampopulatsioonides. Üks kastike tähistab uuritavas geenis asuvat CpG saiti. Värvikoodiga on eristatud CpG saiti metülatsioonitaseme. Bisulfitsekveneerimisega on tehtud kindlaks neljas T-raku alampopulatsioonides Treg rakuspetsiifiliste geenide CpG saitide metülatsioonitaseme väärtused. tTreg rakkude alampopulatsioonile on omane geenide *FOXP3*, *GITR*, *CTLA4* ja *IL2RA* CpG saitide demetülatsioon, mis eristab neid teistest T-raku alampopulatsioonidest. Tconv ehk konventsionaalsed T-rakud tähistavad naiivsed T-rakke, mis teatud tingimustes võivad omandada Treg rakkudele omase fenotüübi ning funktsionaalsuse (panevad aluse pTreg rakkudele). Kohandatud Ohkura et al. (2012) järgi.

1.5. DNA METÜLATSIOON BIOMARKERINA

DNA metülatsioon on laialdasemalt uuritud ning huvipakkuv epigeneetiline modifikatsioon. DNA ise on väga stabiilne bioloogiline molekul, kuid metülatsioon on dünaamiline modifikatsioon olles mõjutatav elustiilist ja patoloogilistest muutustest. Seetõttu uuritakse üha enam DNA metülatsiooni kasutamise võimalusi biomarkerina meditsiinis.

DNA metülatsioonimustri muutused võivad viidata mitmetele haiguslikele seisunditele olles kasulikud näiteks kasvaja diagnoosimisel. Kui normaalsetele rakkudel on iseloomulik promootorpiirkonna CpG saitide demetülatsioon ja geenikehas valdavalt hüpermetülatsioon, siis kasvajakudede korral on tihtipeale täheldatud vastupidist olukorda (Marzese ja Hoon, 2015). DNA metülatsiooni potentsiaalne kasutusvaldkond on ka vedelbiopsia diagnostika, kus

saab uurida apoptootilistest rakkudest pärinevat tsirkuleeriva rakuvaba DNA molekule, et hinnata loote tervislikku seisundit (näiteks kromosoomhaiguste esinemist) või jälgida kasvaja arengut ja ravi efektiivsust mitte-invasiivselt (Jiang and Lo, 2016).

On täheldatud, et vananemine mõjutab samuti metülatsioonimustrit. Sellel põhjusel on üks põnevamaid DNA metülatsiooni kasutusviise inimese vananemise tempo hindamine ning bioloogilise vanuse ennustamine. Bioloogilise vanuse hindamist DNA metülatsioonimustri põhjal nimetatakse epigeneetiliseks vanuseks või kellaks. Tegu on meetodiga, mis võtab arvesse kindlate CpG saitide metüleerituse taset rakkudes, kudedes või organites, mis peegeldavad kronoloogilise vanusega seotud metülatsioonimuutusi. Inimese epigeneetilise vanuse ennustamiseks kasutatavad CpG saidid on sageli seotud rakkude ellujäämise või suremusega, proliferatsiooniga ning organismi või koe arenguga (Belsky et al., 2020; Chen et al., 2016; Horvath, 2013; Weidner et al., 2014).

Ühed tuntumad epigeneetilised kellad on Horvathi DNAm vanuse (ingl. k *DNA methylation age*), Hannumi kell ja Levine'i DNAm PhenoAge kell (Levine et al., 2018; Hannum et al., 2013; Horvath, 2013). Juhul, kui epigeneetiline vanus on kõrgem kui tegelik vanus, siis see tähendab, et indiviid vananeb kiiremini. Metülatsioonipõhiste kellade väljatöötamisel on proovitud kaasata ka elustiili ja haigestumise tegureid, mis aitaksid hinnata eluiga. Üks nendest on GrimAge, mis võtab muu hulgas arvesse inimese suitsetamisharjumust (Lu et al., 2019). Viimase epigeneetilise kella eelis teiste varem välja toodute ees on, et lisaks eluea ennustamisele võimaldab GrimAge ennustada ka muid vanusega seotud muutusi, näiteks menopausi ja südame-veresoonkonna haiguste tekkimise vanust.

Nagu varasemalt mainitud tagavad rakutüübispetsiifiliste geenide ekspressiooni epigeneetilised modifikatsioonid, mistõttu erinevates rakutüüpides esineb erinev DNA metülatsioonimuster (Arvey et al., 2015; Illingworth et al., 2008). Rakutüübispetsiifilise epigenoomi põhjal on proovitud välja töötada ka mudeleid, mis ennustaksid rakutüüpide proportsioone kudedes. Juba praegu on võimalik peaaegu 100% täpsusega hinnata ja eristada suuremaid leukotsüütide alatüüpide (T-rakkude; B-rakkude; looduslikke tapjarakkude, ingl. k *natural killer cells*; eosinofiilide; basofiilide; neutrofiilide; monotsüütide) proportsioone veres kasutades paarikümmet CpG saiti (Accomando et al., 2014). Esialgu on keskendutud peamiselt leukotsüütide ennustamisele, mis moodustavad organismi esimese kaitseliini patogeene vastu ja peegeldavad immuunsüsteemi seisundit (Houseman et al., 2012). Viimasel aastakümnel on astunud esimesi samme ka spetsiifilisemate mudelite väljatöötamise suunas, mille fookuses on metülatsioonipõhine Treg rakkude ennustamine (Barzaghi et al., 2012; Husseiny et al., 2020;

Sehouli et al., 2011; Wiczorek et al., 2009). Enamasti on selleks kasutatud *FOXP3* geeni TSDR kvantiseerimist metülatsiooni-spetsiifilise kvantitatiivse polümeraasiahela reaktsiooni abil. Käesoleva magistr töö raames proovitakse välja töötada aga bisulfitsekvenceerimise põhise mudelit Treg rakkude osakaalu ennustamiseks.

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. TÖÖ EESMÄRGID

Käesoleva magistratöö eksperimendialosa eesmärgid olid:

- 1) kirjeldada valitud Treg rakkude ennustamiseks oluliste CpG saitide metülatsoonitaset nii erinevates CD4⁺ T-rakkudes kui ka soospetsiifiliselt;
- 2) uurida bisulfitsekveneerimise põhise meetodi potentsiaali, mille kasutamisel oleks võimalik määrata vererakkudest isoleeritud DNA-st Treg rakkude osakaalu DNA metülatsoonimustri põhjal.

2.2. MATERJAL JA METOODIKA

2.2.1. Uuringu valim

Antud uuringusse kaasati kaks valimit: üks Tartu Ülikooli Kliinikumi verekeskusest ning teine sise- ja nahahaiguste kliinikust. Uuringu läbiviimiseks olid olemas Tartu Ülikooli inim-uuringute eetika komitee load (protokollid nr 272/T-12 ja 275/M-17) ning kõik doonorid olid allkirjastanud informeeritud nõusoleku lehe, millega lubasid kasutada oma materjali teadustöök. Esimesse valimisse kuulusid TÜ Kliinikumi verekeskuse 9 vabatahtlikku vere-doonorit (neli naist ja viis meest), kelle täpsemad andmed on välja toodud tabelis 1. Uuritavate naiste keskmine vanus antud valimis oli 27 eluaastat ning meeste keskmine vanus 34 eluaastat. Kõige noorem indiviid oli 21-aastane naissoost isik, kõige vanem 47-aastane mees.

Tabel 1. Esimene valim

	Mehed	Naised
Proovide arv	5	4
Vanus aastates	23-47	21-41
Keskmine vanus aastates	34	27

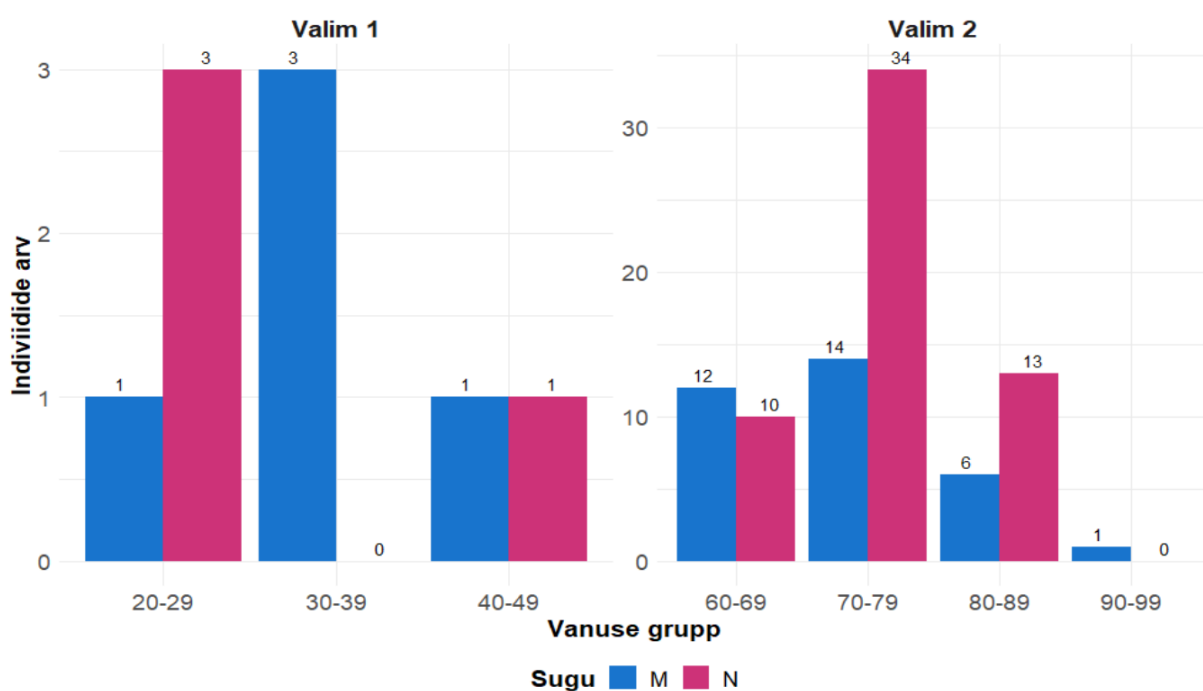
Uuringusse kaasati ka TÜ Kliinikumi sisekliinikust ja nahahaiguste kliinikust vastavalt 50 ja 40 indiviidi, kes moodustasid teise uuritava valimi. Sinna kuulusid 33 meest ja 57 naist vanusevahemikus 65-95 eluaastat. Teises valimis olevate naiste keskmine vanus oli 75 eluaastat, meeste keskmine vanus aga 74 eluaastat. Nii noorim mees kui ka naine antud valimis

oli 65-aastane, vanim naine 89-aastane ja vanim mees 95-aastane. Täpsemad andmed on esitatud tabelis 2.

Tabel 2. Teine valim

	Mehed	Naised
Proovide arv	33	57
Vanus aastates	65-95	65-89
Keskmine \pm SD vanus aastates	74 \pm 7	75 \pm 5

Mõlema valimi vanuseline ja sooline jaotus on välja toodud joonisel 6. Esimeses valimis olid mehed esindatud kõigis kolmes vanusegrupis. Naisi oli kõige rohkem vanusegrupis 20-29 eluaastat, kuid meesisikute arv oli suurim vanusevahemikus 30-39 eluaastat. Valimis 2 oli näha naissoost isikute üldist ülekaalu. Samas sarnaselt esimese valimiga oli ka valimis 2 mehed esindatud kõikides vanusegruppides. Kõige rohkem mehi ja naisi oli vanusevahemikus 70-79 eluaastat.



Joonis 6. Kahe uuritava valimi vanuseline ja sooline jaotus. Võrreldud on meeste ning naiste arvu valimis 1 ja 2 erinevates vanusegruppides. X-teljel on välja toodud vanusevahemikud ning y-teljel indiviidide arv. Värvikoodiga on eristatud mehed (M) ja naised (N).

2.2.2. Perifeerse vere mononukleaarsete rakkude eraldamine

Tartu Ülikooli Kliinikumi verekeskuses valmistati tabelis 1 välja toodud esimese valimi indiviidide täisverest 50 ml *buffy coat*, millest antud töö autor eraldas perifeerse vere mononuklearsed rakud (PBMC, ingl. k *peripheral blood mononuclear cell*) kasutades Ficoll-gradient-tsentrifugimist. Tsentrifugimise etappidel kasutati tsentrifuugi Eppendorf 5810 R ja rootorit A-4-62 (Saksamaa).

50 ml algmaterjali jagati võrdselt kahte 50 ml katsutisse ning lisati võrdses mahus toasooja DPBS puhvrit (Corning, USA). Saadud vere ja DPBS-i segu segati ning seejärel pipeteeriti 15 ml Ficolli lahusele (GE Healthcare, Rootsi) fraktsioone segi ajamata. Sellele järgnes tsentrifuugimine minimaalse kiirenduse ja pidurdusega toatemperatuuril 30 minutit 400 rcf juures. Pärast tsentrifuugimist eemaldati plasma jättes viimast alles umbes 1 cm. Mononuklearseid rakke sisaldav valge kiht korjati kokku uude 50 ml katsutisse ning lisati 50 ml-ni DPBS puhvrit. Saadud lahust tsentrifuugiti 10 minutit 300 rcf juures toatemperatuuril. Pärast supernatandi eemaldamist suspendeeriti rakud üles 50 ml DPBS puhvril ning tsentrifuugiti 10 minutit 300 rcf juures toatemperatuuril. Supernatant eemaldati ning sade võeti üles 50 ml RB puhvril (2mM EDTA, 0,5% BSA, 1xPBS). Rakususpensiooni tsentrifuugiti 10 minutit 300 rcf ja 4°C juures. Samaaegselt loendati rakud Luna-FL automatiseeritud fluorestsents-rakuloenduriga (Logos Biosystems, Lõuna-Korea) vastavalt tootja protokollile kasutades akridiinoranži ja propiidiumjodiidi (kataloogi-number F23001).

Pärast tsentrifuugimist 10 minutit 4°C 300 rcf juures eemaldati supernatant. Eraldatud PBMC-d külmutati maha edasiseks eksperimentideks kasutades CTL-Cryo ABC Freezing Media kitti (ImmunoSpot, USA) vastavalt tootja protokollile või kasutades RPMI 1640 rakuöödet (Corning, USA), mis sisaldas 1x veise loote seerumit (FBS, ingl. k *fetal bovine serum*; Gibco, Thermo Fisher Scientific, katalooginumber 10270106) ja 1x penitsilliini-streptomütsiini (Corning, USA, katalooginumber 30-002-CI), ning 20% dimetüülsulfoksiidi (DMSO, ITW Reagents Division, Hispaania, tootekood A3672). PBMC-d külmutati maha vahemikus $2 \cdot 10^7$ - 10^8 rakku/ml ning hoiustati -150°C juures.

2.2.3. CD4⁺ T-rakkude magnetsortimine

CD4⁺ T-rakkude populatsiooni rikastamiseks kasutati $3 \cdot 10^7$ PBMC-d ning rakkude magnetsortimise meetodikat (MACS, ingl. k *magnetic-activated cell sorting*). $3 \cdot 10^7$ PBMC-d võeti üles 240 µl RB puhvril ning lisati 60 µl CD4 magnetkerakesi (Miltenyi Biotec,

Saksamaa). CD4⁺ T-rakkude rikastamiseks kasutati magnetlust ning MS kolonni (Miltenyi Biotech, Saksamaa) vastavalt tootja protokollile. Rikastatud CD4⁺ T-rakkude rakususpensioon koguti 5 ml katsutisse. Rakkude loendamiseks Luna-FL automatiseeritud fluorestsents-rakuloenduriga kasutati akridiinoranži ja propiidiumjodiidi vastavalt tootja protokollile. Ülejäänud rakususpensiooni tsentrifugeeriti 10 minutit 300 rcf juures toatemperatuuril (Eppendorf 5810 R, A-4-62 rootor). Supernatant eemaldati täielikult ja rakud võeti üles 100 µl RB puhvriss.

2.2.4. Fluorestsents-aktiveeritud rakkude sortimine

CD4⁺ T-rakkude rikastamisele järgnes fluorestsents-aktiveeritud rakkude sortimine (FACS, ingl k *fluorescence-activated cell sorting*). Rikastatud CD4⁺ T-rakkudele lisati 5 µl FcR blokaatorit (BD Biosciences, USA) ning inkubeeriti 5 minutit 4°C kapis. Seejärel lisati rakususpensioonile esimene antikehade segu (tabel 3) ning inkubeeriti 37°C juures 20 minutit.

Tabel 3. Esimene antikehade segu

Antikeha	Fluorokroom	Kogus (µl)	Katalooginumber (tootja)
CCR6	BV605	5	353420 (Biolegend, USA)
CXCR3	APC	5	353708 (Biolegend, USA)

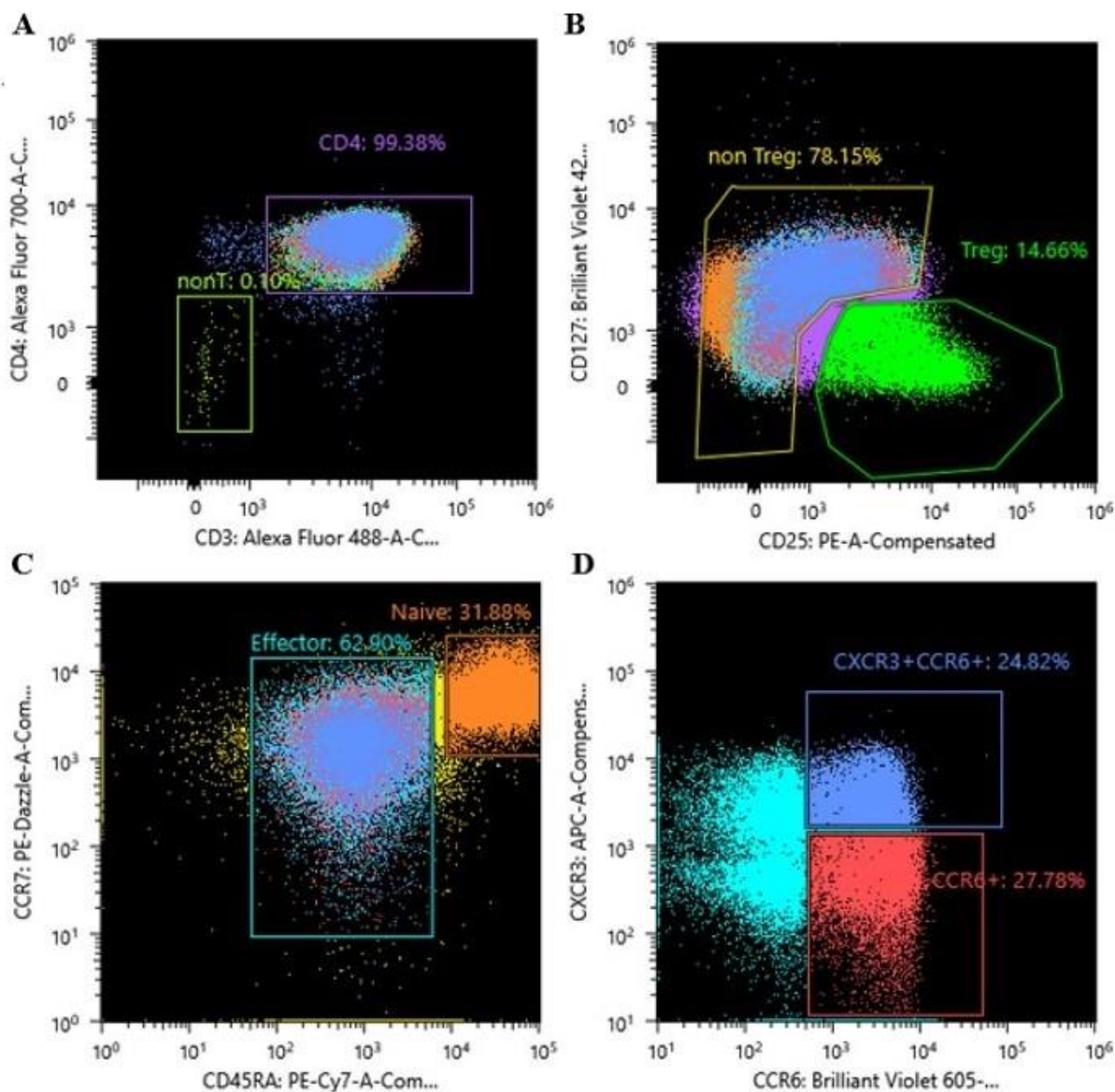
Seejärel lisati teine antikehade segu (tabel 4) ning proove inkubeeriti 4°C juures 20 minutit.

Tabel 4. Teine antikehade segu

Antikeha	Fluorokroom	Kogus (µl)	Katalooginumber (tootja)
CD25	PE	5	202105 (Biolegend, USA)
CD127	BV421	1,25	351310 (Biolegend, USA)
CD4 (1:10)	AF700	5	317426 (Biolegend, USA)
CD45RA (1:10)	PE-Cy7	6	304126 (Biolegend, USA)
CCR7	PE-Dazzle	2	353236 (Biolegend, USA)
CD3	AF488	0,5	300415 (Biolegend, USA)

Pärast inkubatsioone pesti rakke 2 ml RB puhvriga, tsentrifuugiti 10 minutit 300 rcf juures toatemperatuuril (Eppendorf 5810 R, A-4-62 rootor) ning eemaldati supernatant. Antud pesuetappi korrati veel üks kord. Seejärel võeti rakud üles 1 ml RB puhvrisk ja lasti läbi 70 µm rakufiltri, et saada üherakuline suspensioon.

Antud töös sortiti Sony MA900 masinaga (Sony Biotechnology, USA) välja neli CD4⁺ T-rakkude alampopulatsiooni: Tn rakud, Treg rakud ning kaks T-abistajarakkude (Th, ingl. k *T helper cells*) alampopulatsiooni Th1 ja Th17 (joonis 7).



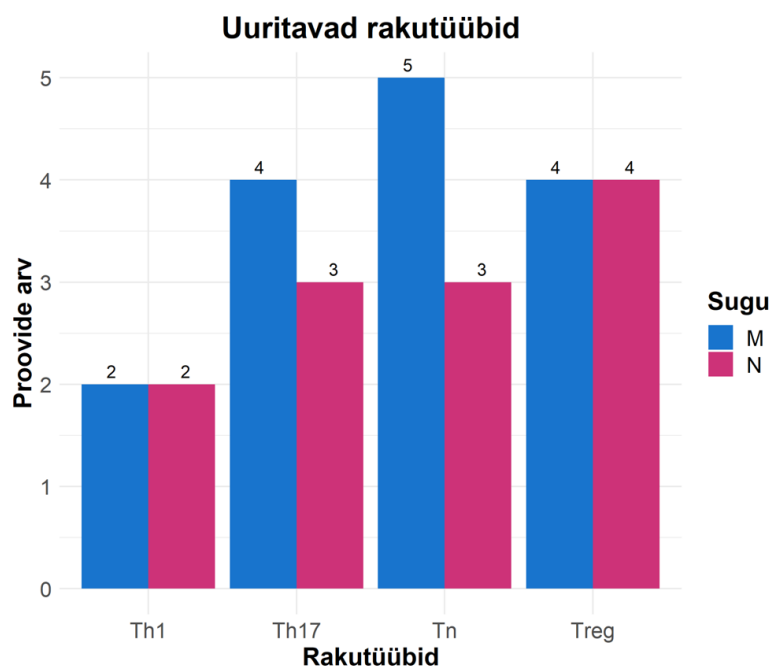
Joonis 7. CD4⁺ T-rakkude sortimine FACS meetodiga. Välja on toodud proovi M23 FACS sortimise tulemused. Eelnevalt MACS-iga rikastatud CD4⁺ T-rakud (A) jagati CD25 ekspressiooni alusel mitte-Treg (non-Treg) ja Treg rakkudeks (B). C paneelil on CCR7 ja CD45RA ekspressiooni alusel eristatud Teff (Effector) ja Tn (Naive) rakud. Teff rakkudest sortiti omakorda välja CXCR3⁺ Th1 ning CXCR3⁻ Th17 rakud (D).

Sortimisel kasutati 100 µm sortimiskiipi (Sony Biotechnology, USA). Uuritavad rakupopulatsioonid koguti 5 ml katsutitesse, mis olid üleöö 5% BSA-ga (1xPBS; Thermo Fisher Scientific, USA) inkubeeritud vältimaks rakkude kleepumist katsuti sein külge. Sorditud rakupopulatsioonide puhtuse kontrolliks kasutati sortimisel kasutatud markereid: Treg (CD25⁺CD127⁻), Tn (CD45RA⁺CCR7⁺), Th1 (CCR6⁺CXCR3⁺) ja Th17 (CCR6⁺CXCR3⁻). Jälgiti, kas sorditud rakud satuvad FACS-i graafikul endiselt õigesse raami ekspresseeritavate pinnamolekulide alusel. Oodatud tulemusena nii ka juhtus. FACS sortimise puhtus kõigi nelja rakupopulatsiooni puhul oli vähemalt 94%.

Sorditud rakususpensioonidelt eemaldati supernatant ja rakusade säilitati edaspidisteks eksperimentideks 1,5 ml katsutites -80°C juures. Valimisse 2 kuuluvate indiviididele oli varasemalt tehtud teise tööühma liikme poolt voolutsütomeetria analüüs, mille protokoll on välja toodud Lisa 1. Osa nendest tulemustest kasutati hiljem DNA metülatsioonipõhise mudeli loomisel.

2.2.5. Genoomse DNA eraldamine

Valimisse 1 kuuluvate proovide genoomse DNA (gDNA) eraldamiseks kasutati GeneJET Genomic DNA Purification kitti (Thermo Fisher Scientific, USA) vastavalt tootja protokollile. gDNA elueeriti 50 µl elueerimispuhvrtsis ning kvaliteeti hinnati NanoDrop 2000 spektrofotomeetriga (Thermo Fisher Scientific, USA). gDNA eraldamine õnnestus 29 sorditud rakupopulatsiooni proovist, mille jaotus soo lõikes on välja toodud joonisel 8. Valimisse 1 kuuluvate indiviidide korral oli kõige rohkem Tn, Treg ja Th17 rakutüüpide proove.



Joonis 8. Uuritavate rakupopulatsioonide proovide arv soo lõikes. Võrreldud on meeste ja naiste proovide arvu uuritavates rakupopulatsioonides. X-teljel on rakutüüpide nimed ja y-teljel proovide arv. Värvikoodiga on eristatud mehed (M) ja naised (N).

Valimisse 2 kuuluvate indiviidide gDNA oli varasemalt eraldatud väljasoolamise meetodil tööühma teise liikme poolt.

2.2.6. Naatriumbisulfit-töötlus

Naatriumbisulfit-töötluste läbiviimiseks kasutati EZ DNA Methylation kitti (Zymo Research, USA) vastavalt tootja protokollile. Töötlusteks kasutati 150 ng punktis 2.2.5. eraldatud gDNA-d. Valimisse 2 kuuluvate indiviidide gDNA-le oli varasemalt tehtud naatriumbisulfit-töötlus tööühma teise liikme poolt. Proove inkubeeriti üleöö termotsükleris Mastercycler (Eppendorf, Saksamaa) kasutades tootja poolt välja pakitud alternatiivset inkubeerimisrežiimi (tabel 5).

Tabel 5. Naatriumbisulfit-töötluste alternatiivne inkubeerimise režiim

Etapp	Temperatuur	Kestvus	Tsüklite arv
Denaturatsioon	95°C	30 sek	16
Konversioon	50°C	60 min	
Temperatuuri hoidmine	4°C	∞	1

Proovid elueeriti 50 µl elueerimispuhvrts ning säilitati edasisteks katseteks -20°C külmpapis.

2.2.7. Bisulfit-töödeldud genoomse DNA amplifitseerimine

2.2.7.1. Töös kasutatud praimerid

Käesoleva magistritöö raames uuriti Treg rakkudele olulistest geenides paiknevate CpG saitide metüülatsiooni. Uuritavad CpG saidid asusid järgmistes geenides: *FOXP3*, *CTLA4* ja *GITR*. Antud geenides asuvate CpG saitide uurimiseks disainiti praimerid. Katsesse kaasati ka teisi CpG saite, mis on välja valitud TÜ molekulaarpatoloogia uurimisrühmas läbi viidud uurimistöödest. Lisainformatsioon töös kasutatud praimerite kohta ja nende nukleotiidsed järjestused on välja toodud lisa 2.

Praimerite disainimiseks vajalikud nukleotiidsed järjestused saadi UCSC Genome Browseri¹ andmebaasist. Primerid disainiti internetipõhise programmi Primer3² abil järgmiste tingimuste alusel:

- praimerid pikkus jääb vahemikku 18-27 nt;
- praimerid järjestus ise ei sisalda CpG saite;
- praimerite sulamistemperatuur (T_m) jääb vahemikku 54-62°C;
- PCR produkti ehk ampliconi pikkus jääb vahemikku 80-150 nt;
- GC protsent on 20-60%.

Kui Primer3 ei andnud soovitud tingimustega sobivaid praimeripaaride kandidaate, siis kasutati teisi internetipõhiseid programme³ käsitsi disainitud praimerite T_m ja GC% kontrollimiseks ja arvutamiseks. Disainitud praimeritele lisati Illumina üleulatuvad adapterjärjestused. Kodeeriva ahela 5'otsa lisati TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG järjestus ning mittekodeeriva ahela 5'otsa GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG järjestus. Primerid telliti firmast Metabion (Saksamaa).

2.2.7.2. Polümeraasi ahelreaktsioon

Polümeraasi ahelreaktsioonis (PCR) amplifitseeriti esimese valimi punktis 2.2.6. bisulfit-töödeldud DNA proovid üles kõigi 24 praimeripaariga. Teise valmisel kuuluvate indiviidide bisulfit-töödeldud DNA proovid paljundati üles aga esimese kaheksa praimeripaariga (lisa 2),

¹ <http://genome.ucsc.edu/>

² <http://primer3.ut.ee/>

³ <https://tmcaculator.neb.com/#!/main>

sest nende indiviidide metülatsiooniandmed 9.-24. amplikoni CpG saitide kohta oli olemas varasematest TÜ molekulaarpatoloogia uurimisrühmas läbi viidud katsetest.

PCR-i reaktsioon viidi läbi 5 µl mahus. Iga reaktsiooni komponendid on välja toodud tabelis 6. Esimesse valimisse kuuluvate proovide ja teise valimisse kuuluvate proovide bisulfit-töödeldud DNA kontsentratsioonid olid vastavalt 3 ng/µl ja 12 ng/µl.

Tabel 6. PCR-is kasutatud reagensid ja nende lõppkontsentratsioonid

Reagent	Lõpp-kontsentratsioon
Nuclease-Free Water (Ambion, USA)	N/A
10x Yellow Buffer (Naxo, Eesti)	1x
25 mM MgCl ₂ (Solis BioDyne, Eesti)	1,5 mM
2 mM dNTP segu (Solis BioDyne, Eesti)	0,12 mM
5 U/µl HOT FIREPol DNA polümeraas (Solis BioDyne, Eesti)	0,06 U
3 ng/µl või 12 ng/µl bisulfit-töödeldud DNA	0,72 ng/µl
0,5 µM F+R praimerite segu	0,2 µM

PCR reaktsioonid viidi läbi masinaga Mastercycler (Eppendorf, Saksamaa) vastavalt tabelis 7 välja toodud tingimustele.

Tabel 7. PCR-i programm

Etapp	Temperatuur	Kestvus	Tsüklite arv
Eel-denaturatsioon	95°C	15 min	1
Denaturatsioon	95°C	20 sek	40
Praimerite seondumine	56°C	30 sek	
Elongatsioon	72°C	1 min	
Lõplik elongatsioon	72°C	3 min	1
Temperatuuri hoidmine	4°C	∞	1

2.2.7.3. Geel-elektroforees

PCR-i kontrolliks teostati geel-elektroforees, kus kasutati 3%-list TAE (Tris-atsetaat-EDTA; Naxo, Eesti) agarosgeeli, millele lisati vajalik kogus etiidiumbromiidi (0,5 g/ml; Naxo, Eesti). Pikkusmarkeriks kasutati pUC19 DNA/MspI (HpaII) markerit (Thermo Fisher Scientific, USA). Elektroforeesi teostamiseks kasutati firma Bio-Rad (USA) foreesivanni. Uuritavate amplikonide pikkused on välja toodud lisa 2.

2.2.8. Sekveneerimise raamatukogude ettevalmistamine

2.2.8.1. Amplikonide kokku tõstmine ja puhastamine

Sekveneerimise raamatukogude valmistamiseks tõsteti iga indiviidi amplikonid võrdses mahus kokku, saades esimese valimi indiviidide ja teise valimi indiviidide korral vastavalt 24 (72 µl) ja 8 (24 µl) erineva amplikoni segu. Saadud amplikonide segu puhastamiseks kasutati Agencourt AMPure XP magnetkerakesi (Beckman Coulter, USA) tootja protokoll järgi.

AMPure XP kerakestega puhastamisesse võeti esimese valimi proovide korral 25 µl ning teise valimi proovide korral 24 µl kokku tõstetud amplikonide segu. Puhastatud proovid elueeriti 17,5 µl 10 mM Tris puhvril pH 8,0 (ArcherDX, USA), millest võeti kasutusele 15 µl, et vältida magnetkerade ülekannet järgmisesse reaktsiooni.

2.2.8.2. DNA kontsentratsiooni mõõtmine Qubitiga

Puhastatud amplikonide segude kontsentratsioonid mõõdeti Qubit 2.0 fluoromeetriga (Thermo Fisher Scientific, USA) kasutades Axygen 0,5 ml PCR katsuteid (Corning, USA) ja Qubit dsDNA HS Assay reagente (Thermo Fisher Scientific, USA) vastavalt tootja protokollile. Mõõtmisesse võeti juhuslikult esimesest valimist 5 proovi ning teisest valimist 10 proovi. Antud 15 proovi kontsentratsioonide mõõtmiseks kasutati 1 µl punktis 2.2.8.1. puhastatud amplikonide segu. Ülejäänud valimi 1 ja 2 proovide kontsentratsiooniks võeti vastava valimi mõõdetud proovide aritmeetilise keskmise väärtus.

2.2.8.3. Amplikonide segu lahjendamine ja märgistamine Nextera XT indeksitega

Qubit 2.0 fluoromeetri mõõtmistulemuste põhjal valmistati proovide lahjendused kontsentratsiooniga 10 ng/µl. Kuna praimeridisaini käigus olid praimeritele lisatud Illumina üleulatuvad adapterjärjestused, siis see võimaldas puhastatud amplikonide otsetesse lisada

Nextera XT Index Kit v2 indeksjärjestused (Illumina, USA). Indeksite lisamise PCR viidi läbi 15 µl reaktsioonisegus. Reaktsioonikomponendid on välja toodud tabelis 8.

Tabel 8. Indeksite lisamise PCR-i reaktsioonisegu komponendid

Reagent	Kogus
Amplikonide segu (10 ng/µl)	2,5 µl
Nextera XT indeks 1 Praimer	2,5 µl
Nextera XT indeks 2 Praimer	2,5 µl
2x KAPA HiFi HotStart PCR mix (Kapa Biosystems, USA)	7,5 µl

PCR-i reaktsioonid viidi läbi masinaga Mastercycler (Eppendorf, Saksamaa) vastavalt tabelis 9 välja toodud tingimustele.

Tabel 9. Indeksite lisamise PCR-i programm

Etapp	Temperatuur	Kestvus	Tsüklite arv
Eel-denaturatsioon	95°C	3 min	1
Denaturatsioon	95°C	30 sek	7
Praimerite seondumine	55°C	30 sek	
Elongatsioon	72°C	30 sek	
Lõplik elongatsioon	72°C	5 min	1
Temperatuuri hoidmine	4°C	∞	1

2.2.8.4. Indeksitega märgistatud proovide puhastamine

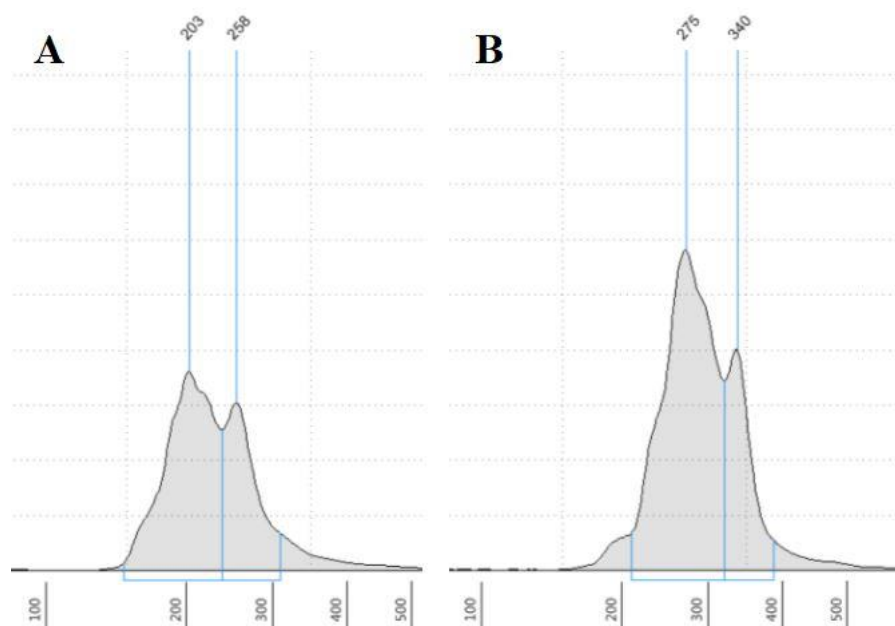
Nextera XT indeksitega märgistatud proovid puhastati taaskord Agencourt AMPure XP magnetkerakestega vastavalt tootja protokollile. Proovid elueeriti 13,75 µl 10 mM Tris puhvrisk pH 8,0, millest kasutusele võeti 10 µl puhastatud produkti, et vältida magnetkerakeste ülekannet järgmisesse reaktsiooni.

2.2.8.5. Indeksitega märgistatud proovide kontsentratsiooni ja fragmentide suuruse mõõtmine

Punktis 2.2.8.4. puhastatud proovide kontsentratsioonid mõõdeti Qubit 2.0 fluoromeetriga kasutades Qubit dsDNA HS Assay reagente sarnaselt punktis 2.2.8.2. kirjeldatule.

Puhastatud ja indeksitega märgistatud DNA amplikonide pikkuseid kontrolliti Tartu Ülikooli genoomika instituudi tuumiklaboris TapeStation 2200 instrumendil (Agilent Technologies, USA), kasutades D1000 ScreenTape reagente (Agilent Technologies, USA) ja lähtudes tootja soovitustest. Tulemused visualiseeriti TapeStation (Agilent Technologies, USA) tarkvaraga.

Mõõtmisel kasutati nelja proovi: kahte proovi esimesest valimist (N22_Treg, N24_Treg) ja kahte proovi teisest valimist (IGN013, IGA051). Joonisel 9 on välja toodud TapeStation 2200 instrumendiga mõõdetud proovi N24_Treg amplikonide pikkused enne ja pärast indeksite lisamist.



Joonis 9. Proovi N24_Treg amplikonide pikkused mõõdetuna TapeStation 2200 instrumendiga. Välja on toodud proovi N24_Treg amplikonide pikkused enne indeksite lisamist (A) ja pärast indeksite lisamist (B).

TapeStationi kiibi analüüs oli vajalik veendumaks, et indeksjärjestused olid seondunud adapterjärjestustele. Joonisel 9 on TapeStation mõõtmistulemustest näha, et indeksite lisamine on õnnestunud, sest amplikonid on pärast punktis 2.2.8.3. Nextera XT indeksite lisamise PCR-i pikemad.

2.2.8.6. Proovide kvaliteedi kontroll ning sekveneerimine tuumiklaboris

Amplikonid sekveneeriti Tartu Ülikooli genoomika instituudi tuumiklaboris. Proovide kontsentratsiooni mõõtmiseks teostati qPCR seadmega 7900HT Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, USA) kasutades KAPA Library Quantification kitti (Kapa Biosystems, USA).

Raamatukogu keskmise fragmentide pikkuse määramiseks kasutati TapeStation instrumenti ning High Sensitivity D1000 (Agilent Technologies, USA) süsteeme vastavalt tootja protokollile. Raamatukogu ettevalmistus käis vastavalt MiSeq Reagent Kit v2 komplekti (Illumina, USA) tootjapoolsetele juhistele (Illumina, USA). Raamatukogu sekveneerimiseks kasutati MiSeq sekvenaatorit (Illumina, USA), mille tulemusel saadi 2 x 250 aluspaari pikkused lugemid.

2.2.9. Sekveneerimisandmete analüüs

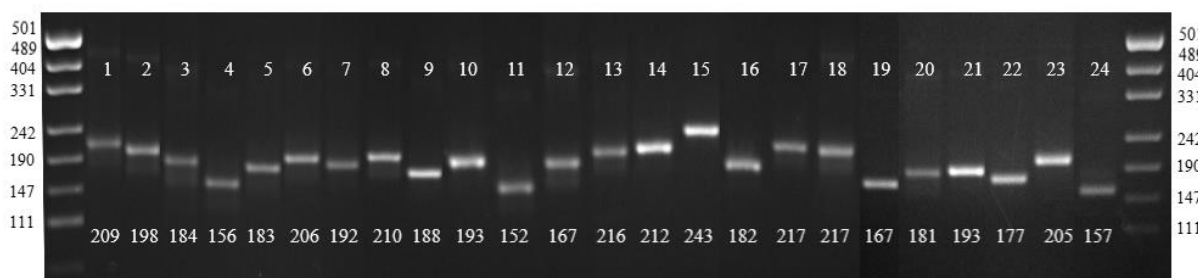
Antud katse käigus amplifitseeriti üles 24 ampliconi, milles paiknes 80 CpG saiti. Analüüsi kaasati CpG saidid, mille sekveneerimine õnnestus mõlema uuritava valimi indiviididega. Selliseid saite oli kokku 19 (lisa 3). DNA sekveneerimisandmete esmane analüüs viidi läbi Linux/Unix keskkonnas, kus andmete kvaliteedikontrolliks kasutati programmi FastQC (versioon 0.11.9, Babraham Bioinformatics, 2019). Programmi TrimGalore (versioon 0.6.6, Babraham Bioinformatics, 2020) abil teostati lugemite adapterite trimmimine ning programmi Bismark (versioon 0.19.0, Babraham Bioinformatics, 2017) abil joondati lugemid inimese referentsgenoomile (hg19/GRCh37) ning saadi kätte CpG saitide metülatsiooniväärtused. Edasiseks andmeanalüüsiks kasutati programmeerimiskeelt R (versioon 4.0.4; R Core Team 2021) ja integreeritud arenduskeskkonda RStudio (versioon 1.4.1717; RStudio Team, 2021).

DNA metülatsioonipõhise lineaarse regressiooni mudeli test- ja treeningandmestik jaotati R-i paketi „caret“ (versioon 6.0.86; Kuhn, 2020) abil ning mudel saadi kasutades paketti „MASS“ (versioon 7.3.53; Venables ja Ripley, 2002). Andmete ettevalmistamiseks rakendati pakette „dplyr“ (versioon 1.0.5; Wickham et al., 2021) ja „data.table“ (versioon 1.14.0; Dowle ja Srinivasan, 2021). Tulemuste visualiseerimiseks kasutati aga pakette „ggplot2“ (versioon 3.3.3; Wickham 2016), „ggpubr“ (versioon 0.4.0; Kassambara, 2020), „ggrepel“ (versioon 0.9.1; Slowikowski 2021), „pheatmap“ (versioon 1.0.12; Kolde 2019) ja „scales“ (versioon 1.1.1; Wickham ja Seidel, 2020).

2.3. TULEMUSED

2.3.1. Geelelektroforees

Huvipakkuvate CpG saitide metüleerituse uurimiseks teostati esimese valimi indiviidide gDNA proovidele bisulfitöötlus. Valimisse 2 kuuluvate indiviidide gDNA-le oli varasemalt tehtud naatrium-bisulfitöötlus töögrupi teise liikme poolt. Valimi 1 proovide bisulfitöötlusele järgnes PCR-i amplifikatsioon kõigi 24 praimeripaariga, teise valimi proovide korral kasutati aga ainult praimeripaare 1-8. Kontrollimaks bisulfitöötluse õnnestumist ja PCR-i efektiivsust kasutati geelelektroforeesi meetodit. Joonisel 10 on välja toodud geelelektroforeesi pilt indiviidi M23 kohta, millel on näha 24 amplifitseeritud ampliconi. Kõik ampliconid olid oodatava pikkusega (lisa 2).



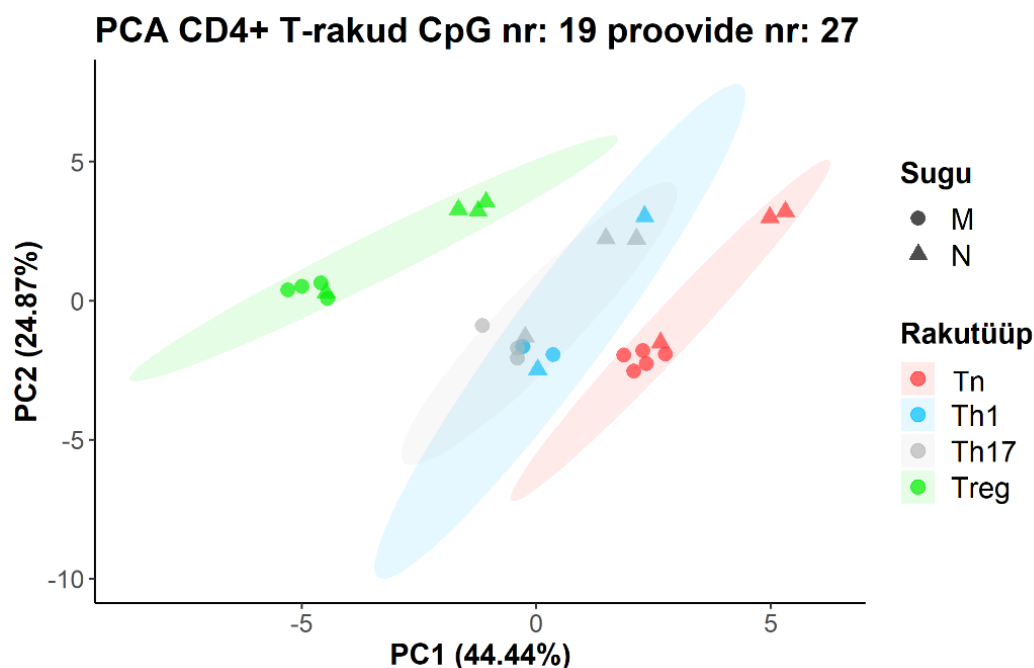
Joonis 10. Katses kasutatud 24 ampliconi ning nende pikkused. Geelelektroforeesi pildil UV-valguse all on välja toodud ampliconide numbrid ja pikkused. Esimesel ja viimasel real on pikkusmarker pUC19 DNA/MspI (HPAII).

2.3.2. Rakutüübispetsiifiline CpG saitide metüleeritus

Üheks antud töö eesmärgiks oli hinnata CD4⁺ Treg rakkude osakaalu valgete vererakkude (WBC, ingl. k *white blood cells*) suhtes CpG saitide metüleerituse alusel. Uuritavad 24 ampliconi sisaldasid 80 CpG saiti, millest analüüsi kaasati 19 (lisa 3). Antud CpG saidid pärinevad järgmistest geenidest: *GITR* (amplicon 1), *CTLA4* (ampliconid 2, 3) ning *FOXP3* (ampliconid 4, 5, 7, 8). Uuritavateks rakupopulatsioonideks antud uurimuses olid eelnevalt CD4⁺ T-rakkudest FACS meetodil sorditud Tn, Treg, Th1 ja Th17 rakud (punkt 2.2.4.). Katses kasutatud proovide nimedes kajastub nii indiviidi sugu, vanus kui ka sorditud rakutüüp. Näiteks „N41-Treg“ on naissoost indiviidi (vanus 41 eluaastat) Treg rakkude populatsiooni proov.

Teades, et DNA metülatsiooni alusel on võimalik eristada rakutüüpe, kasutati peakomponentanalüüsi (PCA, ingl. k *principal component analysis*), et vaadata nelja uuritava rakupopulatsiooni metülatsiooniprofiilide spetsiifilisust. PCA tekitab omavahel mitte-korreleeruvad uued tunnused ehk peakomponendid selliselt, et esimene peakomponent kirjeldaks CpG saitide

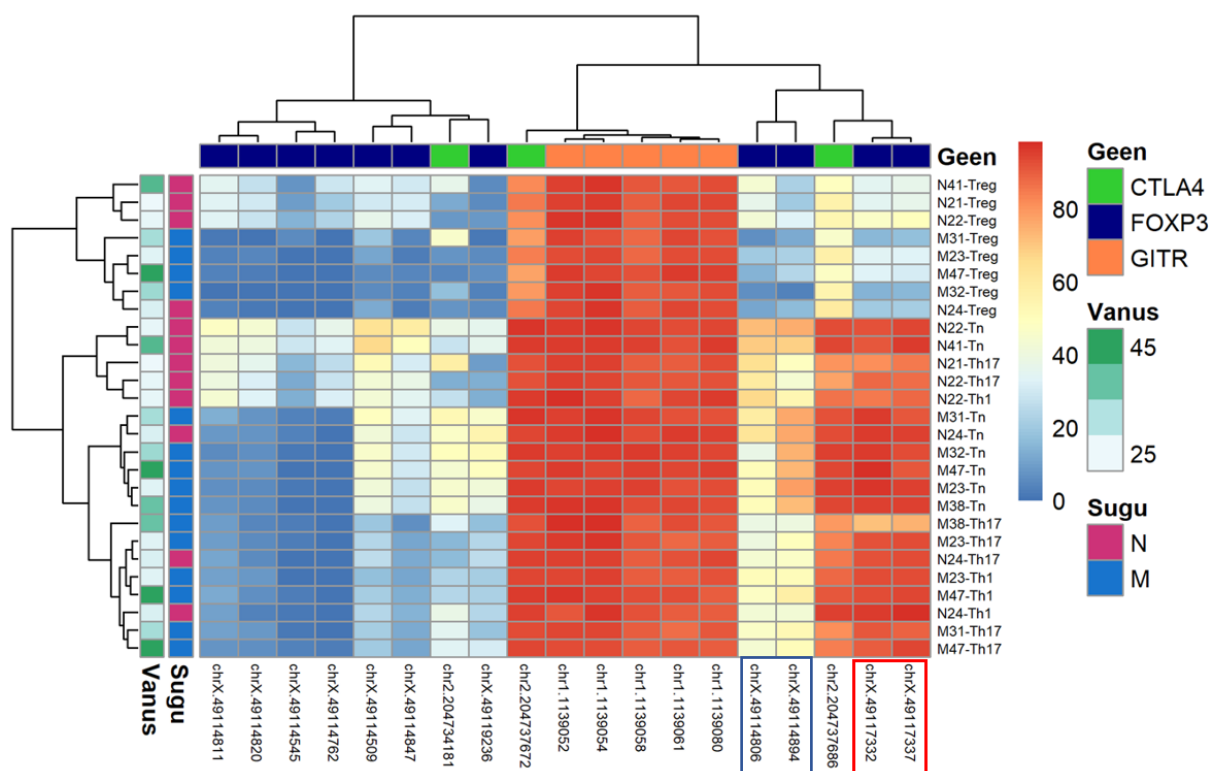
metüleerituse varieeruvusest kõige suurema osa ning iga järgmine järjest väiksema osa. Tulemuste visualiseerimiseks kasutati esimest kahte peakomponenti ehk peakomponenti 1 (PC1) ja 2 (PC2). Joonisel 11 on välja toodud uuritavate CD4⁺ T-rakkude alampopulatsioonide PCA joonis. Oodatava tulemusena tekkis CpG saitide metüleerituse alusel klasterdumine. Selgelt eristusid Tn ja Treg rakud. Soospetsiifilist klasterdumist oli enim näha Treg rakkude puhul.



Joonis 11. 19 CpG saidi metüleerituse varieeruvus neljas uuritavad rakupopulatsioonid. Telgedel on välja toodud põhikomponendid 1 (PC1) ja 2 (PC2). Iga punkt tähistab ühte indiviidi. Värvikoodiga on eristatud rakupopulatsioonid ning punkti kujuga sugu.

Järgnevalt vaadati CpG saitide metüleerituse geenispetsiifilist klasterdumist, mis on välja toodud joonisel 12. Lisaks uuriti kas ja kuidas on uuritavate geenide CpG saitide metülatsiooniga seotud sugu ja vanus. Tulemuste visualiseerimiseks kasutati kuumakaarti (ingl. k *heatmap*), kus sarnasema metüleerituse profiiliga indiviidid/proovid asuvad kõrvuti. Jooniselt on näha, et *GITR* geenis paiknevad CpG saidid olid sarnaselt metüleeritud nii meestel kui ka naistel ning kõikides uuritavates rakutüüpides. See-eest *CTLA4* geeni CpG saidid olid Treg rakkudes üldiselt madalamalt metüleeritud võrreldes teiste uuritavate rakupopulatsioonidega. Selgelt eristas Treg rakke ka *FOXP3* geeni CNS2 ja CNS3 piirkonnas paiknevate CpG saitide hüpometülatsioon, mis on joonisel 12 märgistatud vastavalt punase ja sinise kastiga. Soospetsiifilist klasterdumist oli näha eelkõige Treg rakkude puhul, kus *FOXP3* geenis paiknevad CpG saidid olid naistel kõrgema metüleerituse tasemega. Eraldi vaadati ka

vanuse korrelatsiooni uuritava 19 CpG saidi metüleeritusega, kuid ühtegi statistiliselt olulist tulemust ei leitud tulenevalt väikesest valimist tingitud väikesest võimsusest.

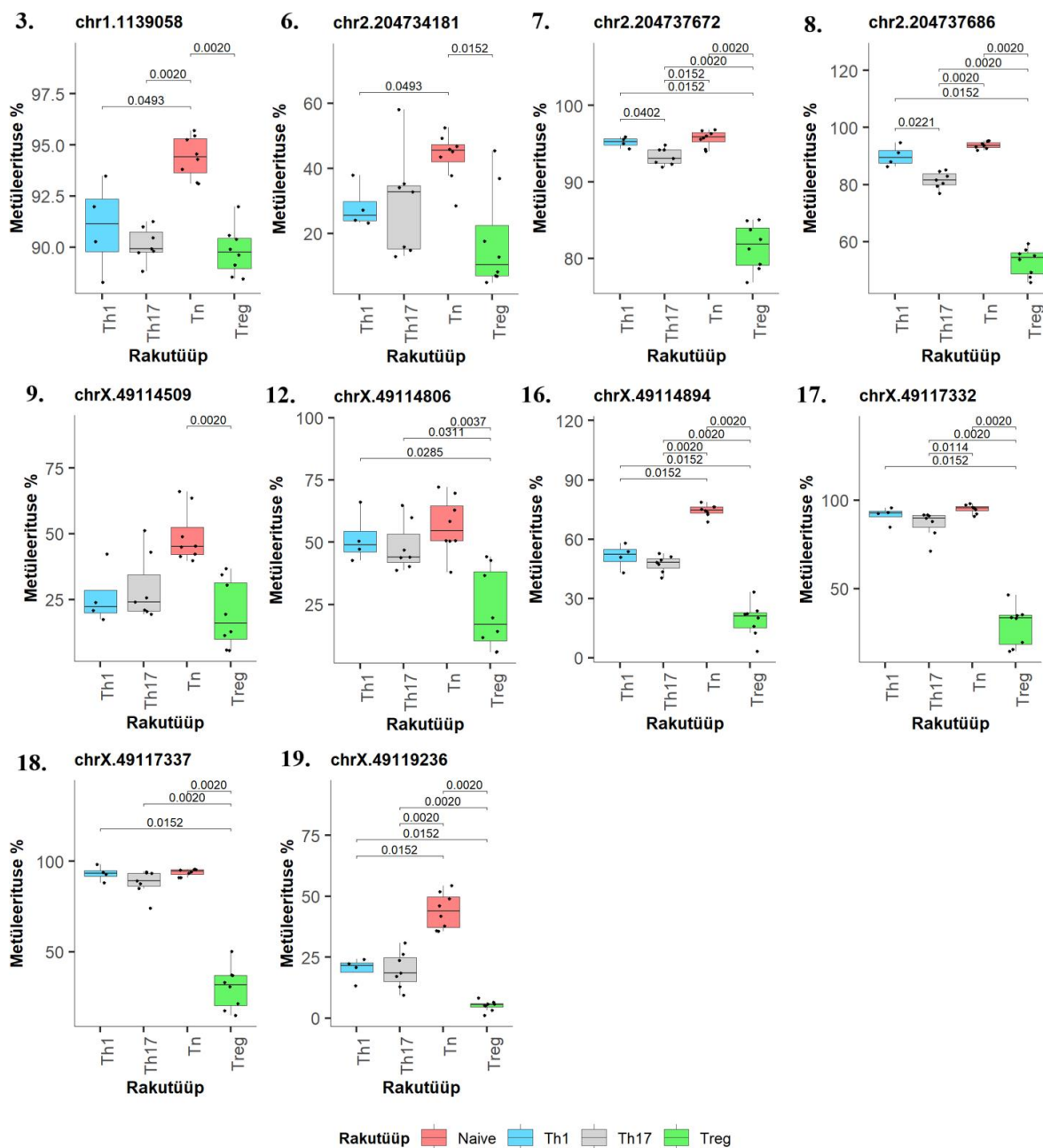


Joonis 12. 19 CpG saidi geenispetsiifiline metüleeritus uuritavates CD4⁺ Treg rakkude. Reas on välja toodud proovide nimed (indiviidid), vanus ja sugu, tulbas aga CpG saitide asukoht kromosoomis. Värvikoodiga on eristatud metüleerituse tase (skaalal 0-100%), geen, sugu ja vanus. Iga kastike tähistab ühe CpG saidi metüleerituse protsenti ühel indiviidil. Punase kastiga on tähistatud *FOXP3* geeni CNS2, sinise kastiga aga CNS3 piirkonnas asuvad CpG saidid.

2.3.3. Metüleerituse tase uuritavates CpG saitides

Uuritavad 19 CpG saiti asusid Treg rakkude fenotüüpi kirjeldavates geenides (lisa 3). Nendest viis asusid *GITR* (1.-5. sait), kolm *CTLA4* (6.-8. sait) ja 11 *FOXP3* (9.-19. sait) geenis. Uuritavates rakupopulatsioonides diferentsiaalselt metüleeritud ning statistiliselt olulisemad tulemused on välja toodud joonisel 13. Eeldus, et Treg-spetsiifilistes geenides on Treg rakkude korral CpG saidid hüpometüleeritud, pidas antud juhul paika. Kõige enam erines CpG saitide metüleeritus 17. chrX.49117332 ja 18. chrX.49117337 CpG saidi korral. Tegu oli *FOXP3* geenis CNS2 piirkonnas asuvate CpG saitidega, mille demetülatsiooni loetakse üheks parimaks Treg rakkude markeriks. Kõige sarnasem CpG saidi metülatsioonitaseme väärtuse keskmine oli 3. chr1.1139058 CpG saidis, mis asub *GITR* geenis. Võrreldes teiste uuritavate

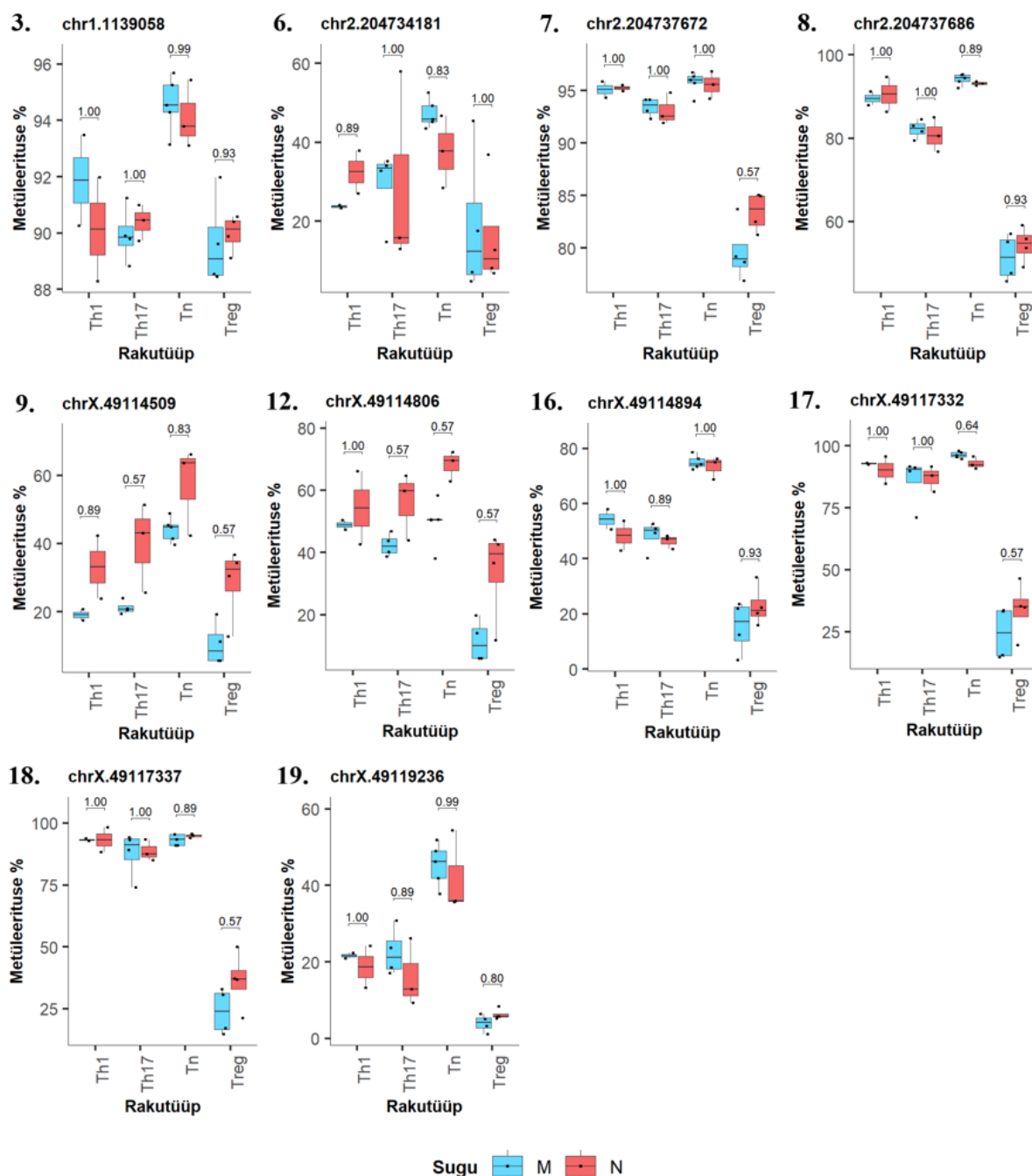
rakupopulatsioonidega oli Treg rakkude korral CpG saitide metülatsoonitase väärtused kõige varieeruvad, seda nii *GITR* ja *CTLA4* kui ka X-liitelise *FOXP3* geeni puhul.



Joonis 13. Uuritavate CpG saitide metüleeritus erinevates CD4⁺ T-raku alam-populatsioonides. Välja on toodud kümne statistiliselt olulisema CpG saidi metüleeritus töös käsitletud neljas erinevas rakupopulatsioonis (Tn, Treg, Th1 ja Th17). X-teljel on välja toodud rakutüüp, y-teljel metüleerituse protsent. Värvikoodiga on eristatud rakutüübid. Paneelidel on välja toodud ka CpG saitide nimed (asukohad kromosoomis), numeratsioon, mis vastab lisas 3 väljatodule, ning kohandatud p-väärtused. Kohandatud p-väärtused arvutati valeavastuste määra (FDR, ingl. k *false discovery rate*) meetodi ning statistiline olulisus arvutati Wilcoxon testi abil. Tulemust peeti statistiliselt oluliseks, kui kohandatud p-väärtus oli väiksem kui 0,05.

2.3.3.1. Soospetsiifiline CpG saitide metüleeritus

Järgmisena vaadati eelnevalt joonisel 13 välja toodud CpG saitide metülatsoonitasete väärtuste erinevusi soospetsiifiliselt uuritavate rakupopulatsioonide raames. Kuna antud juhul oli valimi suurus pool varasemast ja statistiline võimsus oli lihtsalt liiga väike, siis ühtegi statistiliselt olulist erinevust ei saadud. Antud tulemused on välja toodud joonisel 14.



Joonis 14. Uuritavate CpG saitide soospetsiifiline metülatsoonitasete väärtused erinevates CD4⁺ T-raku alampopulatsioonides. Välja on toodud kümne CpG saidi metüleeritus soospetsiifiliselt töös käsitletud neljas uuritavas CD4⁺ T-rakupopulatsioonis (Tn, Treg, Th1 ja Th17). X-teljel on välja toodud rakutüüp, y-teljel CpG saidi metüleerituse protsent.

Värvikoodiga on eristatud sugu. Paneelidel on välja toodud ka CpG saitide nimed (asukohad kromosoomis), numeratsioon, mis vastab lisas 3 väljatoodule, ning kohandatud p-väärtused. Kohandatud p-väärtused arvutati FDR meetodi ning statistiline olulisus arvutati Wilcoxon testi abil. Tulemust peeti statistiliselt oluliseks, kui kohandatud p-väärtus oli väiksem kui 0,05.

Kõigi nelja uuritava rakupopulatsiooni korral on näha, et varasemad suured CpG saitide metülatsiooniväärtuste varieeruvused võisid tuleneda nii soospetsiifilisest varieeruvusest kui ka soo lõikes suurest metülatsioonitaseme väärtuste varieeruvusest. Kõige sarnasemad CpG saitide metülatsioonitaseme väärtuste keskmised rakupopulatsioonide raames meestel ja naistel olid *GITR* ja *CTLA4* geenides paiknevatel CpG saitidel (vastavalt 3. chr1.1139058 CpG sait ning 7. chr2.204737672 ja 8. chr2.204737686 CpG saidid). Kuigi väikese statistilise võimuse tõttu soospetsiifilist metülatsioonierinevust ei tuvastatud, oli näha oodatud trendi eelkõige X-kromosoomil paikneva *FOXP3* geeni korral, kus CpG saitide metüleeritus paistis olevat naiste puhul kõrgem võrreldes meestega uuritavates rakupopulatsioonides.

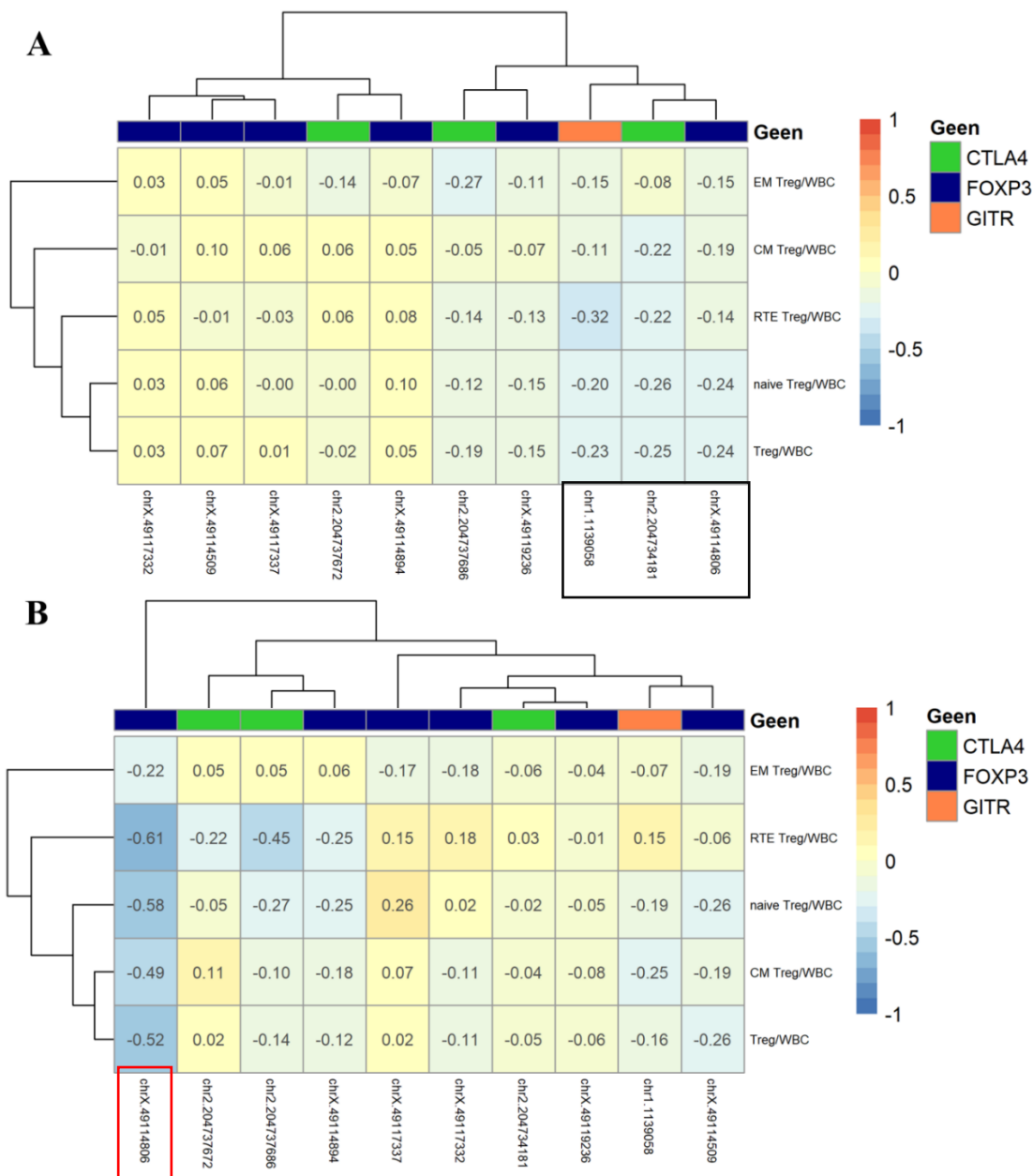
2.3.4. Mudeli loomine

Käesoleva magistritöö teine eesmärk oli uurida bisulfitsekvenerimise põhise meetodi potentsiaali, mille kasutamisel oleks võimalik määrata vererakkudest isoleeritud DNA-st Treg rakkude osakaalu DNA metülatsioonimustri põhjal. Selleks kirjeldati valimi 1 indiviidide abil Treg rakkudes diferentsiaalselt metüleeritud CpG saite, mille metülatsioonitaseme väärtus oli statistiliselt oluliselt erinev (kohandatud p-väärtus < 0,05) teiste uuritud CD4⁺ T-rakkude alampopulatsioonide suhtes. Kokku oli selliseid saite 10 ning need on eelnevalt joonisel 13 väljatoodud CpG saidid. Nendest üks CpG sait asus *GITR* geenis, kolm *CTLA4* ja kuus *FOXP3* geenis. Kuna *FOXP3* geen asub X-kromosoomis, siis tuli meetodi arendamisel võtta arvesse ka võimalikku soospetsiifilist CpG saitide metülatsioonitaseme väärtuste erinevust.

Meetodi arendamisel kasutati valimisse 2 kuuluvaid indiviide (33 meest ja 57 naist), kelle puhul oli teada kliiniline taust ning olemas uuritavate CpG saitide sekveneerimistulemused ehk metülatsioonitaseme väärtused. Lisaks olid olemas ka varasemalt teise töögrupi liikme poolt tehtud voolutsütomeetria andmed, sealhulgas Treg rakkude osakaal WBC-dest. Voolutsütomeetria andmestikus oli olemas nii Treg rakkude üldine osakaal kui ka alampopulatsioonide info. Viimaste hulgas olid naiivsed (järgnevalt joonistel kasutatud sünonüümina sõna „naive“), RTE Treg, CM Treg ja EM Treg rakud.

Antud töö raames prooviti luua lineaarset regressioonimudelit, kus uuritavaks tunnuseks on Treg rakkude osakaal WBC-dest. Enne mudeli tegemist vaadati, kas ja kuidas on olulisemad

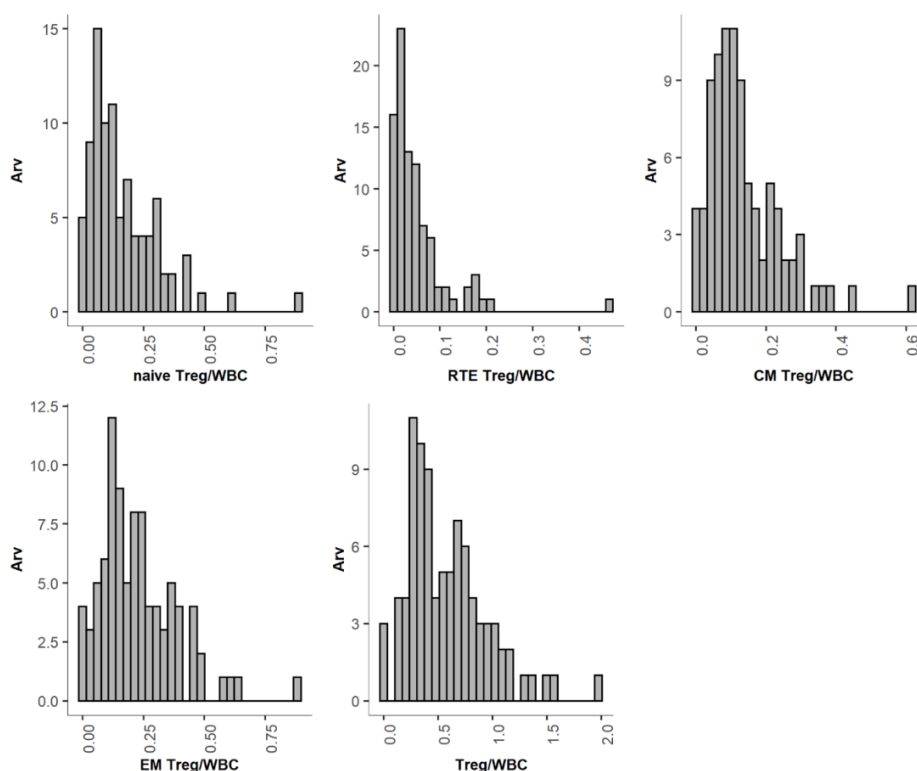
lineaarse regressiooni eeldused täidetud. Kõigepealt uuriti kümne Treg rakke eristavate CpG saidi korrelatsiooni Treg rakkude osakaaludega soospetsiifiliselt. Selle visualiseerimiseks kasutati korrelatsiooni kuumakaarti (joonis 15), kus paneelil A ja B on vastavalt välja toodud valimisse 2 kuuluvate naiste ja meeste korrelatsioonid. Kõikide indiviidide Treg rakkude osakaalude ja CpG saitide metüleeritasetaseme väärtuste vaheline korrelatsioonimaatriks on välja toodud lisa 4).



Joonis 15. Kümne Treg rakkudes diferentsiaalselt metüleeritud CpG saidi korrelatsioon Treg rakkude osakaaludega soospetsiifiliselt. A paneelil on naiste ja B paneelil meeste CpG saitide metüleerituse ja Treg rakkude osakaalu suhe. Reas on välja toodud uuritavad volutsütomeetria tunnused ehk Treg rakkude osakaalud ja tulbas väljavalitud kümne CpG saidi nimed (asukohad kromosoomis). Värvikoodiga on eristatud geen ja korrelatsiooni aste. Iga kastike tähistab ühe CpG saidi metüleerituse ja vastava Treg rakkude osakaalu seost. Kasutatud on Pearsoni korrelatsiooni.

Vaadates kõikide valimisse 2 kuuluvate indiviididega korrelatsioonimaatriksit (lisa 4), siis sealt ei joonistu välja väga tugevaid seoseid Treg rakkude osakaalude ja CpG saitide metülatsioonitaseme väärtuste vahel. Soospetsiifiliselt on korrelatsioonid juba tugevamad. Naiste puhul tekkisid kõige paremad korrelatsioonid *GITR* geenis (3. chr1.1139058), *CTLA4* geenis (6. chr2.204734181) ja *FOXP3* geenis (12. chrX.49114806) paikneva CpG saidi (joonisel 15A välja toodud musta kastiga) ning RTE Treg, naiivsete Treg ja üldise Treg rakkude osakaalu vahel. Meestel joonistus välja kõige tugevam seos Treg rakkude osakaaludega samuti *FOXP3* geenis CNS3 piirkonnas paikneval 12. chrX.49114806 CpG saidil (joonisel 15B välja toodud punaste kastiga), kuid seda kõikide uuritavate Treg rakkude osakaalu tunnustega. Mõlema soo näitel tekkisid kõige paremad korrelatsioonid RTE Treg rakkude alampopulatsiooniga.

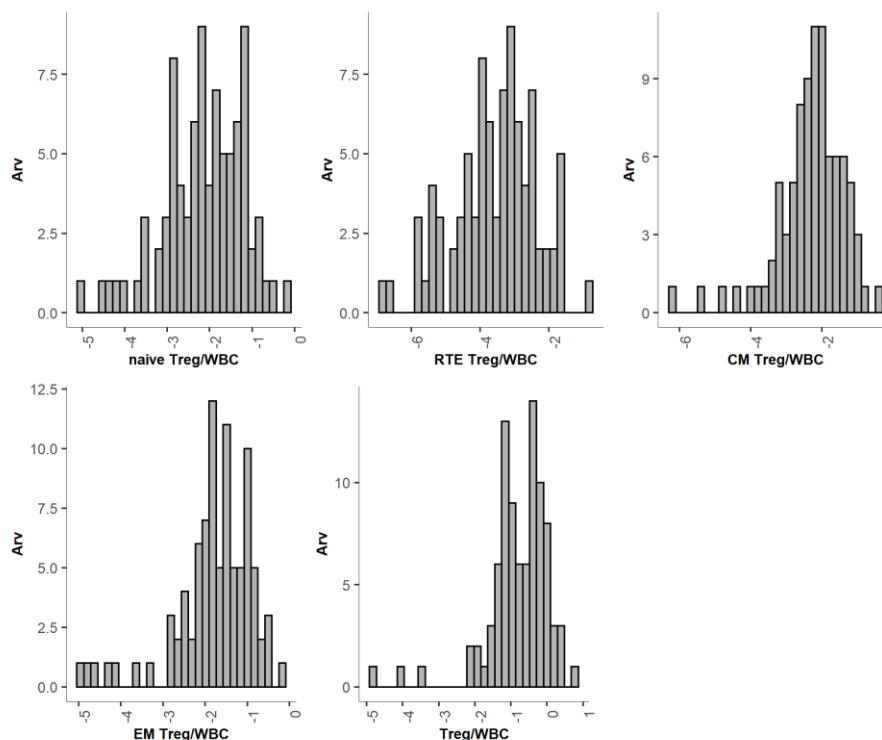
Järgmisena vaadati uuritavate voolutsütomeetria tunnuste ehk Treg rakkude osakaalude väärtuste jaotusi. Eesmärk oli uurida, kas andmed on enam-vähem normaaljaotusega ning kas esineb äärmuslikke väärtuseid. Vastavad histogrammid on välja toodud joonisel 16.



Joonis 16. Uuritavate Treg rakkude populatsioonide andmete jaotused. X-teljel on välja toodud Treg rakupopulatsioonide osakaalud protsentides WBC-dest, y-teljel on kindlasse vahemikku jäävate vaatluste arv.

Eelmiselt jooniselt on näha, et jaotustel kipub olema niinimetatud saba, seda eriti just naiivsete ja RTE Treg rakkude puhul. Kui sõltuv muutuja on sabaga, siis see võib mõjutada lineaarse

regressiooni mudeli toimimist. Seega selleks, et saada parem mudel, prooviti andmeid transformeerida logaritmisega (joonis 17).



Joonis 17. Uuritavate Treg rakkude populatsioonide andmete logaritmitud jaotused. X-teljel on välja toodud Treg rakupopulatsioonide logaritmitud osakaalud WBC-dest, y-teljel on kindlasse vahemikku jäävate vaatluste logaritmitud arv.

Antud juhul on näha, et logaritmine on aidanud varem mainitud naiivsete ja RTE Treg rakkude tunnuste korral, kus andmete jaotus on nüüd rohkem normaaljaotusele sarnasem. Seega edaspidi sobiva mudeli loomisel kasutati logaritmitud naiivsete ja RTE Treg rakkude osakaalude väärtuseid.

Prognosiva mudeli saamiseks jaotati valimi 2 indiviidiid juhuslikkuse alusel kaheks: 75% määrati treeningandmestikuks, mida kasutati mudeli loomiseks, ning 25% andmestikust jäi mudeli prognoosivõime hindamiseks ehk testandmestikuks. Uuritavate ehk sõltuvate tunnustena kasutati Treg rakkude osakaale ning seletavate muutujatena, mis aitaksid kirjeldada uuritava tunnuse varieeruvust, kümnet olulisemat CpG saiti ja faktortunnusena sugu. Parima mudeli saamiseks kasutati kombineeritud sammregressiooni (ingl. k *stepwise regression*), täpsemalt stepAIC meetodit. Tegu on meetodiga, kus alustatakse lihtsast mudelist ning kuhu hakatakse lisama seletavaid muutujaid. Igal sammul kontrollitakse, kas juba mõne lisatud argumendi väljajätmine parandab mudelit (Käärik, 2017). Eesmärk on jõuda statistiliselt olulise

ning võimalikult lihtsa mudelini, mida aitab hinnata Akaike informatsiooni kriteerium^{4,5} (AIC, ingl. k *Akaike information criterion*). AIC lähtub F-statistikust, mis kirjeldab mudeli statistilist olulisust, ja argumentide arvust hinnates informatsioonikadu tulenevalt mudeli lihtsustamisest. Mida väiksem on AIC väärtus, seda parem on mudeli prognoosivõime ning parim sobivus kasutatavale andmestikule.

Uuritava tunnusele võib leida tihtipeale mitu erinevat mudelit sarnase ennustusjõuga ning nendest parima mudeli valimiseks on võimalik kasutada erinevaid lähenemisviise. Võib valida mudeli, mis sisaldab kõige vähem argumente ehk on kõige ökonoomsem või mida on kõige lihtsam interpreteerida. Antud töö raames valiti parim mudel selle juuritud keskmise ruutvea ehk RMSE (ingl. k *root mean squared error*) järgi, mis võrdleb tegelikke ja mudeli ennustatud väärtusi. Lisaks vaadati ka tegelike ja ennustatud väärtuste vahelist korrelatsiooni kasutades Pearsoni korrelatsioonikordajat. Nende tingimuste alusel osutus parimaks mudeliks üldist CD4⁺ Treg rakkude osakaalu ennustav mudel, mille väljund on välja toodud joonisel 18. Teiste loodud mudelite väljundid, kasutatud CpG saidid ja mudeli töökindlus on välja toodud lisades (lisa 5, 6, 7 ja 8).

```
Call:
lm(formula = Treg_WBC ~ chr1.1139058.1139058.GITR.Treg +
chr2.204737686.204737686.CTLA4.Treg +
chrX.49117337.49117337.FOXP3.Treg + chrX.49119236.49119236.FOXP3.Treg,
data = data)

Residuals:
    Min       1Q   Median       3Q      Max
-0.58812 -0.23625 -0.07944  0.10252  1.21008

Coefficients:
                Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept)          7.527606   3.734362   2.016   0.0480 *
chr1.1139058.1139058.GITR.Treg
-0.040538   0.026462  -1.532   0.1304
chr2.204737686.204737686.CTLA4.Treg
-0.053594   0.028446  -1.884   0.0640 .
chrX.49117337.49117337.FOXP3.Treg
 0.024112   0.017492   1.378   0.1728
chrX.49119236.49119236.FOXP3.Treg
-0.009584   0.003721  -2.576   0.0123 *
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 0.3518 on 65 degrees of freedom
Multiple R-squared:  0.1582,    Adjusted R-squared:  0.1064
F-statistic: 3.054 on 4 and 65 DF,  p-value: 0.02278
```

Joonis 18. Välja valitud mudeli väljund Treg rakkude osakaalu ennustamiseks. Väljundi esimeses osas on välja toodud uuritav tunnus ning mudelis kasutatud argumendid (CpG saidid). Tabelis „*Coefficients*“ on kirjas mudeli parameetrid koos statistilise usaldusväarsuse näitajatega. Tulbas „*Estimate*“ on aga välja toodud argumentide regressioonikordajad. Mudeli

⁴ <https://towardsdatascience.com/introduction-to-aic-akaike-information-criterion-9c9ba1c96ced>

⁵ <https://ashutoshr.medium.com/what-is-stepaic-in-r-a65b71c9eeba>

statistilist olulisust näitab F-statistik. Determinatsioonikordaja R^2 näitab, kui palju uuritava tunnuse (antud juhul Treg rakkude osakaalu) hajuvusest mudel ära kirjeldab.

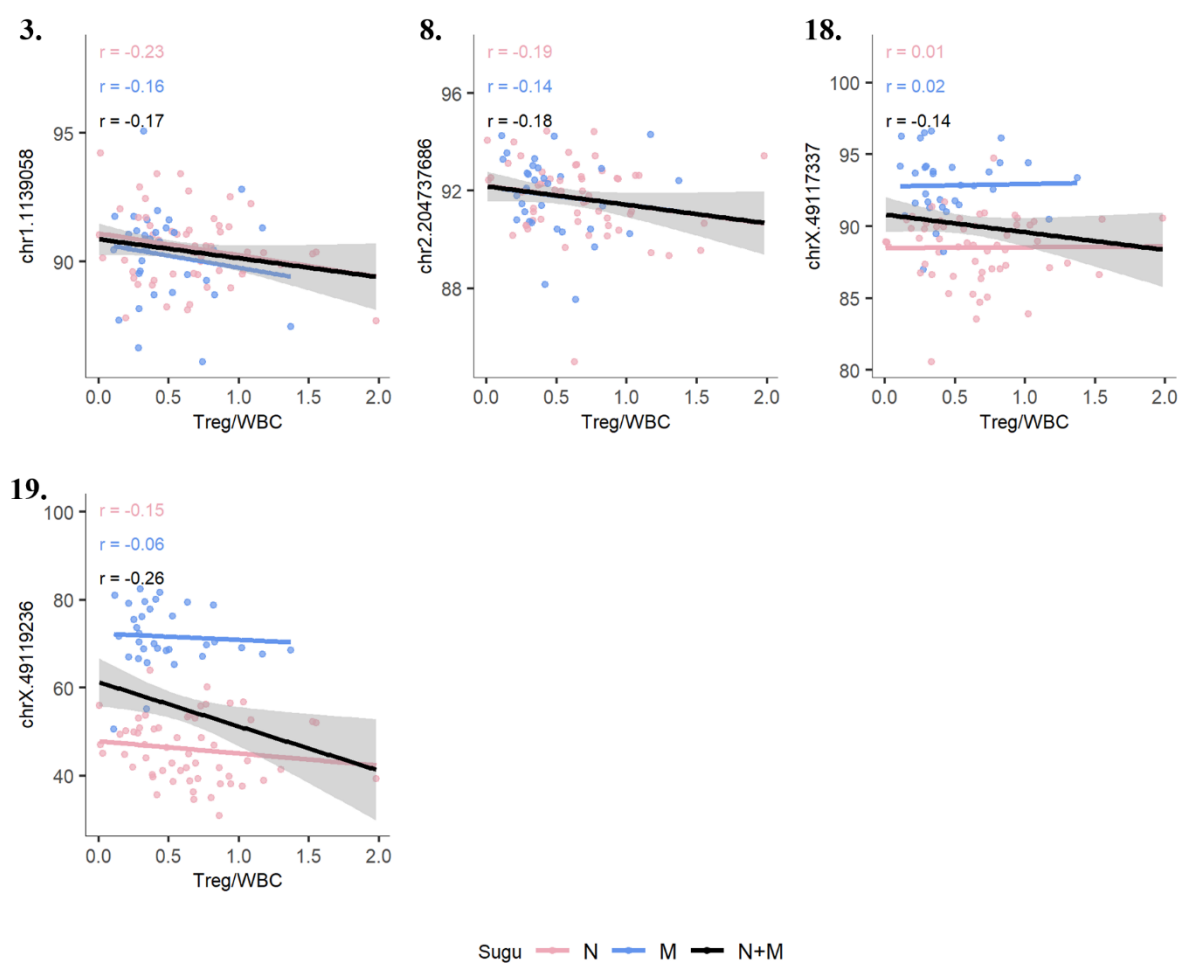
Väljundi esimene osa „Call“ näitab, mis muutujaid on mudelisse kaasatud. Antud mudelis on argumentidena kasutatud nelja CpG saiti (jooniselt 13 saidid 3, 8, 18 ja 19). Tabelis „Coefficients“ on kirjas mudeli parameetrid koos statistilise usaldusvääruse näitajatega. Tulbas „Estimate“ on välja toodud argumentide ehk sõltumatute tunnuste regressioonikordajad, mis näitavad, millisel määral iga argument mõjutab uuritavat tunnust eeldusel, et teised argumendid samal ajal ei muutu.

Mudeli koefitsientide viimases tulbas on välja toodud mudelis kasutatud argumentide hinnangud ehk nende olulisuse tõenäosused. Antud juhul on Treg mudelis ainult ühe CpG saidi metülatsioonitaseme väärtuse statistiline olulisus suurem 0,05, mis tähendab, et teised mudelisse kaasatud argumendid tegelikult Treg rakkude arvu statistiliselt oluliselt ei mõjuta. Mudeli väljundi eelviimases reas on determinatsioonikordaja R^2 väärtus, mis näitab, kui palju uuritava tunnuse (antud juhul Treg rakkude osakaalu) hajuvusest mudel ära kirjeldab. Antud valitud mudeli korral on see ca 16%. Kohandatud R^2 väärtus, mis arvestab ka valimi suurust ja seletavate tunnuste arvu mudelis, on 0,11 ehk antud juhul suudab mudel Treg rakkude hajuvusest kirjeldada 11%. Väljundi viimane rida näitab mudeli statistilist olulisust ehk p-väärtust, mis antud väljavalitud mudeli korral on väiksem kui 0,05.

Sarnaselt CM Treg mudeliga ei võta väljavalitud üldise $CD4^+$ Treg rakkude osakaalu ennustav mudel arvesse soospetsiifilist metüleeritust (faktoritunnusena sugu). Kõige keerulisemaks ehk rohkemate parameetritega mudeliks osutus RTE Treg rakkude osakaalu ennustav mudel. See kasutas viie CpG saidi metülatsiooniväärtuseid ning faktortunnusena sugu (lisa 8A). Kõige lihtsam oli aga EM Treg rakkude osakaalu ennustav mudel, mis kasutas ainult kahe informatiivse CpG saidi metülatsiooniväärtuseid (lisa 6A). Kõige informatiivsemateks CpG saitideks osutusid *FOXP3* geenis CNS2 piirkonnas paiknev 18. chrX.49117337 ja *CTLA4* geenis paiknev 8. chr2.204737686 CpG sait (lisa 3), mida kasutati neljas uuritavas mudelis. Mõlemad CpG saidid olid kaasatud ka üldise $CD4^+$ Treg rakkude osakaalu ennustamisesse.

2.3.5. CD4⁺ Treg rakkude osakaalu ennustamiseks kasutatud CpG saidid

Treg rakkude osakaalude ennustamiseks kasutas mudel kümnest Treg rakkudes diferentsiaalselt metüleeritud CpG saidist nelja kõige informatiivsemat. Viimaste seas oli *GITR* geenis paiknev 3. chr1.1139058 CpG sait, varem mainitud *CTLA4* geenis paiknev 8. chr2.204737686 CpG sait ning ülejäänud kaks kasutatud CpG saiti asusid *FOXP3* geenis. Nende saitide korrelatsioonid Treg rakkude osakaaluga on välja toodud joonisel 19. Korrelatsioone vaadati nii soospetsiifiliselt kui ka kõikidel valimisse 2 kuuluvatel indiviididel üldiselt. Kõige tugevamad seosed CpG saitide metüleerituse ja Treg rakkude osakaalu vahel esinesid meestel.

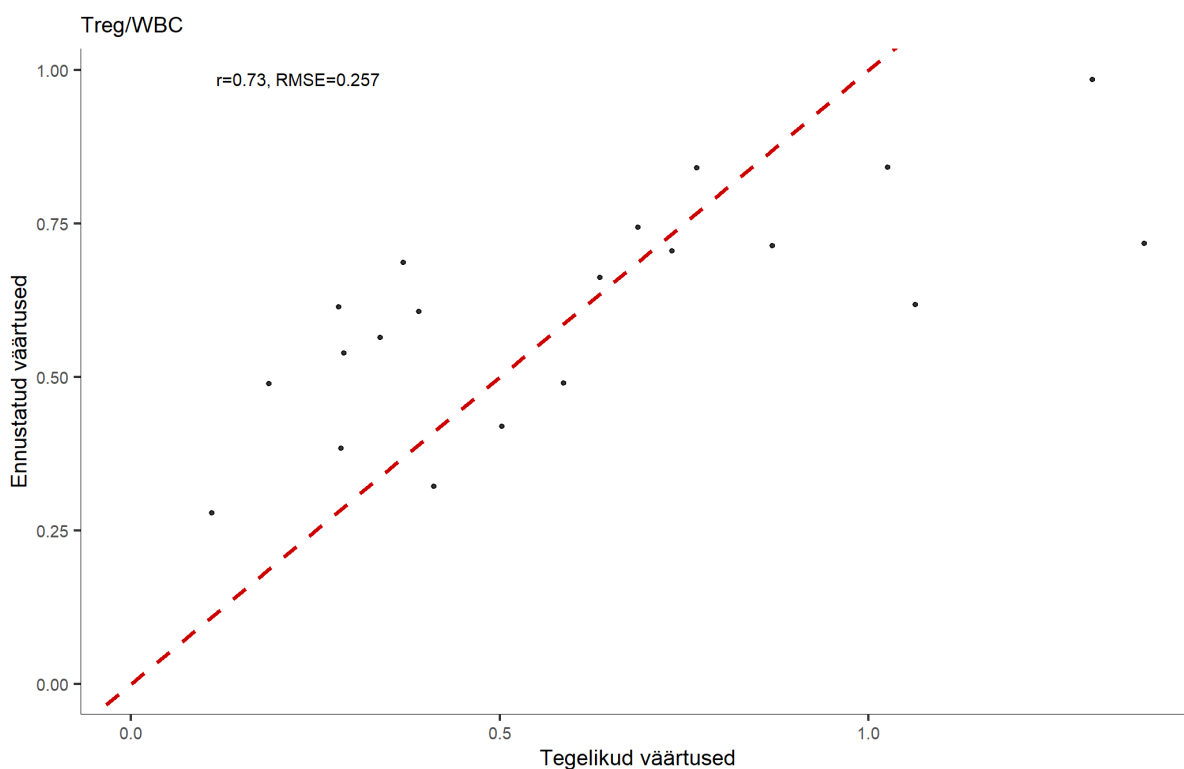


Joonis 19. Treg mudelis kasutatud nelja informatiivsema CpG saidi korrelatsioon uuritava tunnuse ehk Treg rakkude osakaaluga. X-teljel on välja toodud uuritav tunnus (Treg rakkude osakaal WBC-dest) ning y-teljel mudelis kasutatud CpG saidi asukoht kromosoomis. CpG saitide numeratsioon vastab lisas 3 väljatoodule. Värvikoodiga on eristatud meeste ja naiste CpG saitide metüleerituse korrelatsioonid uuritava tunnusega koos ning eraldi. Kasutatud on Pearsoni korrelatsiooni.

2.3.6. CD4⁺ Treg rakkude mudeli töökindluse testimine

Väljavalitud parima mudeli töökindluse ja prognoosivõime uurimiseks võeti appi testandmestik (25% valimi 2 indiviididest). Selleks ennustati mudeli abil testandmestiku kuuluvate indiviidide CD4⁺ Treg rakkude osakaalud WBC-dest ning saadud väärtusi võrreldi tegelike väärtustega. Tulemuste visualiseerimiseks kasutati hajuvusdiagrammi (ingl. k *scatterplot*). Joonisel 20 on näha, et ennustatud ja tegelike väärtuste vahel esineb küllaltki tugev seos ($r = 0,73$), mis viitab, et mudel on informatiivne. Lisaks on näha tendentsi, kus mudel on madalamaid Treg rakkude osakaalude väärtuseid ülehinnanud (tulemused võivad erineda isegi kolmekordselt), samas kui kõrgemaid Treg rakkude osakaale mudel pigem alahindab.

Joonisel on välja toodud ka mudeli RMSE, mis kirjeldab, kui palju ennustatav väärtus erineb tegelikust väärtusest. Mida kõrgem on RMSE, seda halvem mudel on. Antud juhul on RMSE väärtus 0,26, mis üldistatult tähendab, et mudel eksib ennustuse tegemisel keskmiselt 0,26% võrra absoluutarvudes. Näiteks saades Treg rakkude osakaalu ennustuseks 0,5%, võib see tegelikult olla hoopis 0,76%.



Joonis 20. Mudeliga ennustatud Treg osakaalude võrdlus WBC-dest tegelike väärtustega. X-teljel on välja toodud tegelikud ning y-teljel ennustatud Treg rakkude osakaalu väärtused WBC-dest protsentides. Joonisele on märgitud ka kahe uuritava tunnuse korrelatsiooni r ning mudeli RMSE väärtus.

2.4. ARUTELU

Regulatoorsed T-rakud on olnud juba aastakümneid väga populaarne uurimisteema. Esimesed tõendid supressiivsete T-rakkude olemasolust on pärit 1969. aastast (Nishizuka ja Sakakura, 1969). Läbimurre toimus aga 1995. aastal, kui avastati pinnareseptorit CD25 ekspresseeriv CD4⁺ Treg rakkude alampopulatsioon, mis kaitses ilma tüümuseta hiiri autoimmuunsuse eest (Sakaguchi et al., 1995). Pärast seda on läbi viidud väga palju uuringuid arusaamaks antud rakupopulatsiooni olemust, rolli immuunsüsteemi homöostaasi säilitamisel ning autoimmuunsuse ennetamisel. Tänapäevaks ongi just CD4⁺CD25⁺ Treg rakud kõige paremini kirjeldatud regulatoorset aktiivsust omav T-rakkude alampopulatsioon, mis oli ka käesoleva magistritöö fookuses.

Antud magistritöö eesmärgiks oli kirjeldada CD4⁺ Treg rakkude ennustamiseks oluliste CpG saitide metülatsoonitasemete väärtuseid nii erinevates CD4⁺ T-rakupopulatsioonides kui ka soospetsiifiliselt. Lisaks uurida bisulfitsekvenerimise põhise meetodi potentsiaali, mille kasutamisel oleks võimalik määrata vererakkudest isoleeritud DNA-st CD4⁺ Treg rakkude osakaalu DNA metülatsoonimustri põhjal. Selleks kasutati kahte uuritavat valimit. Esimesse valimisse kaasati üheksa indiviidi (viis meest ja neli naist), kelle abil selgitati välja Treg rakkudes diferentsiaalselt metüleeritud CpG saidid. Teise valimi moodustasid 33 meest ja 57 naist, kelle kohta oli teada ka kliiniline taust. Teise valimi indiviidide abil loodi epigeneetikal põhinev mudel.

Vaatluse alla võeti 24 amplikoni, mis sisaldasid 80 CpG saiti. Amplikonid asusid nii Treg rakkude fenotüüpi kirjeldavates geenides (näiteks *GITR*, *FOXP3*, *TIGIT*, *CTLA4*) kui ka teisi T-raku alampopulatsioone kirjeldavates geenides (näiteks *CD8A*, *CD4*, *CD3E*, *CD3G*). Kuna sekveneerimine ei õnnestunud kõigi 24 amplikoni CpG saitidega, siis kaasati analüüsi ainult need CpG saidid, mille sekveneerimisandmed saadi mõlema uuritava valimi indiviidide kohta. Kokku oli selliseid amplikone 7 ning CpG saite nendes 19 (lisa 3).

Antud 19 CpG saiti asusid Treg rakkude signatuurgenides *GITR*, *CTLA4* ja *FOXP3*. Nendest 19 CpG saidist selgitati välja Treg rakkudes diferentsiaalselt metüleeritud CpG saidid, mis omakorda kaasati hiljem bisulfitsekvenerimise põhise mudeli loomisesse. Selliseid saite oli kümme (joonis 13). Esindatud olid kõigi kolme eelnevalt väljatoodud geeni CpG saidid, mis asusid peamiselt geenikehas, introonses alas. Nende hulgas olid ka *FOXP3* CNS2 ja CNS3 piirkonna CpG saidid. Käesoleva magistritöö tulemused kinnitasid, et CD4⁺ Treg rakkude signatuurgenides esineb hüpometülatsoon võrreldes teiste CD4⁺ T-raku alam-

populatsioonidega. *CTLA4* ja *GITR* geenides on see oluline toetamaks Treg rakkudele omase geeniekspressiooni tekkimisest, supressiivset aktiivsust ja stabiilset Treg rakkude pinnamolekulide ekspressiooni (Herppich et al., 2019; Morikawa et al., 2014). Tugev hüpometylatsioon *FOXP3* geeni CpG saitides, just CNS piirkondades, on aga tähtis Treg rakkude funktsioneerimiseks ning *FOXP3* geeni ekspresseerumiseks (Ohkura et al., 2012; Zheng et al., 2010). Erinevalt *CTLA4* ja *GITR* geenidest asub *FOXP3* geen X-kromosoomis, mistõttu võib selle CpG saitide metüleeritus erineda soospetsiifiliselt (Rossetti et al., 2015). Seda võis näha ka antud töö tulemustest, sest sarnaselt varasematele uuringutele kujunes välja trend, kus naistel paistis esinevat kõrgem *FOXP3* geeni CpG saitide metüleerituse tase võrreldes meestega, seda just CNS2 ehk TSDR piirkonnas paiknevatel CpG saitidel (antud töös saidid 17. chrX.49117332 ja 18. chrX.49117337) (Baron et al., 2007; Rossetti et al., 2015). Samas väikese statistilise võimsuse tõttu ei tuvastatud soospetsiifilisi metülatsioonierinevusi.

Nagu varem mainitud, rakutüüpidel on individuaalsed, spetsiifilised metülatsioonimustrid (Farlik et al., 2016) ning nende detekteerimiseks on kolm peamist lähenemisviisi. Nendeks on naatrium-bisulfitöötlusel, restriksiooniensüümil ja afiinsuse rikastamisel (ingl. *k affinity enrichment-based*) põhinevad meetodid. Kõige populaarsem ja enimkasutatav on neist kolmest naatriumbisulfitöötlusel põhinevad meetodid (Pajares et al., 2021). Ka käesolevas töös kasutati bisulfitsekvenceerimist genoomse DNA CpG saitide keskmise metüleerituse hindamiseks. Antud meetodi eelisteks on kiirus ja odav hind, samas võivad puudusteks osutuda madal sensitiivsus suure hulga alleelide ja heterogeensete metülatsioonimustrite tõttu (Jiang et al., 2010).

DNA metülatsiooni väga tugevaks plussiks on selle kvantiseeritavus. Tegu on stabiilsema parameetriga kui mRNA ekspressioon või valgusüntees (Baron et al., 2006), mistõttu on metülatsioonipõhistel mudelitel palju potentsiaali. Ühtlasi oleks DNA metülatsioonipõhine meetod hea ja kiirem alternatiiv senisele voolutsütomeetria analüüsile (Accomando et al., 2014) ning proovidele, mille puhul voolutsütomeetria ei anna täpseid ning usaldusväärseid tulemusi. Üheks selliseks näiteks on külmutatud nabanööri vereproovid, mis sisaldavad multipotentseid tüvirakke, mida kasutatakse tõsiste hematoloogiliste haiguste ravis (Duggleby et al., 2020). Treg rakkude metülatsioonimudelite eelis voolutsütomeetria ees on ka see, et kasutades rakutüübispetsiifilist CpG saitide metüleeritust välistatakse kõiki T-rakke, mis on ajutiselt omandanud Treg-sarnase fenotüübi (Husseiny et al., 2020). Seega perifeersete Treg rakkude detekteerimise täpsus paraneks.

Juba on astunud ka esimesi samme Treg rakkude metülatsioonipõhiste mudelite loomise suunas. Enamik uuringutest on markerina kasutanud *FOXP3* geenis paiknevat TSDR piirkonna demetüleeritust ja meetodina metülatsioonispetsiifilist kvantitatiivset polümeraasi ahelreaktsiooni. Seni loodud mudelid on kinnitanud, et TSDR demetülatsioon on väga hea marker Treg rakkude ennustamiseks (Sehouli et al., 2011) ning et metülatsioonipõhisel mudelil on hea sensitiivsus ja spetsiifilisus (Barzaghi et al., 2012). Samas võib nende mudelite limitatsiooniks olla potentsiaalne meeste ja naiste CpG saitide demetüleerituse erinevus TSDR piirkonnas tulenevalt XCI-st (Rossetti et al., 2015; Wieczorek et al., 2009). Olukorra parandamiseks on kasutatud erinevaid lähenemisviise: naiste puhul on tulemust parandatud faktoriga 2 (Wieczorek et al., 2009) või kui meeste ja naiste Treg rakkude osakaaludes erinevusi ei olnud, siis käsitleti neid mudelis ühtemoodi (Barzaghi et al., 2012). Lisaks on soovitatud Treg rakkude ennustamist/loendust teha soospetsiifiliselt (Duggleby et al., 2020). Kuna molekulaarpatoloogia uurimisgrupi kogemuste põhjal on metülatsioonispetsiifiline kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon varieeruva tulemusega ning pole kõige parem meetod metülatsiooni hindamiseks, siis on antud töös mindud bisulfitsekvencerimise teed.

Epigeneetikal põhineva mudeli arendamiseks kasutati lineaarset regressiooni ning lõppmudelini jõuti kasutades sammregressiooni, täpsemalt stepAIC meetodit. Selleks kaasati varem valimi 1 abil välja selgitatud kümme Treg rakkudes diferentsiaalselt demetüleeritud CpG saiti ning faktortunnusena sugu. Sõltuva tunnusena kasutati Treg rakkude üldosakaalu kõigist valgetest vererakkudest või alatüüpide osakaalusid (nTreg, RTE Treg, CM Treg ja EM Treg rakke). Parim mudel valiti selle juuritud ruutkeskmise vea ehk RMSE (ingl. k *root mean squared error*) alusel. Selleks osutus üldist CD4⁺ Treg rakkude osakaalu prognoosiv mudel, millel oli ühtlasi kõige tugevam seos ennustatud ja tegelike väärtuste vahel (joonis 20). Antud mudel kasutas Treg rakkude ennustamiseks kümnest CpG saidist nelja. Kõik neli CpG saiti asusid Treg rakkude funktsioneerimiseks olulistest geenides: üks asus *GITR*, üks *CTLA4* geenis ning ülejäänud kaks *FOXP3* geenis (üks nendest CNS2 piirkonnas). Tulemustest oli näha, et väga madalaid Treg rakkude osakaalusid väljavalitud mudel ülehindab ja kõrgemaid Treg rakkude osakaale alahindab.

Nagu varem mainitud oli väljavalitud mudeli tegelike ja ennustatud väärtuste suhe kõige tugevam. See sisaldas võrreldes teiste potentsiaalsete mudelitega üldiselt rohkem parameetreid. Teadupoolest lisab iga parameeter keerulisust juurde ning see võib suurendada mudeli viga väikese valimi korral. Mida lihtsam on mudel, seda väiksem on hindamisviga. Väga oluline on prognoosiva mudeli arendamisel tähelepanu pöörata ka kasutatavatele CpG saitidele.

Varasemalt oli välja toodud, et algselt oli antud katse raames plaanitud kaasata CpG saite ka teistest T-raku alampopulatsioonide kirjeldavatest geenidest. Lõpuks saadi edasi liikuda ainult Treg raku fenotüübiga seotud geenides paiknevate CpG saitidega. Kindlasti oleks see kasuks tulnud, kui oleks olnud valida suurema hulga CpG saitide seast ka teistes geenidest (seal hulgas teistest Treg rakkudele omastest signatuurgeenidest), sest väga suure tõenäosusega võib ka nende hulgas olla informatiivsed CpG saite, mis aidanuks Treg mudeli täpsusele kaasa.

CpG saitide kõrval on oluline ka valimi valik. Käesolevas töös kuulusid mudeli loomiseks kasutatud valimisse üle 65-aastased invidiidid, Treg rakkudes diferentsiaalselt metüleeritud CpG saitide väljaselgitamiseks kasutati aga valimit, mille keskmine vanus oli 30 eluaastat. Kuigi Treg rakkude populatsiooni suurus on rangelt reguleeritud, siis vanematel inimestel (üle 60-aastastel) on täheldatud Treg rakkude osakaalu tõusu (Santner-Nanan et al., 2008). Lisaks on näidatud seda ka kasvaja ja põletike korral (Belkaid and Rouse, 2005), mille esinemine on sagedasem eelkõige vanuritel. Näiteks oli ca kolmandikul valimisse 2 kuuluvatel invidiididel vähemalt üks kasvaja (sagedasemad olid eritus- ja seedeelundkonnakasvajad, meestel eesnäärme kasvaja) ja/või põletikuline haigus (kõige rohkem esines dermatiiti). Tulemusi võis mõjutada ka naissoost invidiidide ülekaal kasutatud valimis, kus naised oli pea poole võrra rohkem võrreldes meestega. Ideaalis võinuks mudeli treenimiseks kasutatud invidiidid olla vanuselisel ja sooliselt sobitatud ning kahe uuritava valimi invidiidide keskmised vanused sarnasemad.

Käesolev töö näitas, et bisulfitsekveneerimisel põhineval metülatsioonimudelil võiks kindlasti olla potentsiaali CD4⁺ Treg rakkude ennustamisel valgetest vererakkudest. See võiks olla kiire alternatiiv kallile ja aeganõudvale voolutsütomeetria analüüsile. Lisaks võib selle täiendamine ja parandamine võimaldada jälgida patoloogilise Treg rakkude üle- või alahulgaga seotud haiguste kulgu, prognoosi ja ravivastust meditsiinilises diagnostikas.

KOKKUVÕTE

Antud magistritööl oli kaks eesmärki. Esimene eesmärk oli kirjeldada CD4⁺ Treg rakkude ennustamiseks oluliste CpG saitide metülatsioonitasemete väärtuseid nii eri CD4⁺ T-rakupopulatsioonides kui ka uurida soospetsiifilisi erinevusi. Selleks kaasati uuringu valimisse Tartu Ülikooli verekeskuse 9 vabatahtlikku patsienti (5 meest ja 4 naist), kelle verest eraldati Ficoll-gradient-tsentrifugimisega perifeerse vere mononukleaarsed rakud (PBMC). PBMC-d sortidit nelja alamrakupopulatsiooni: Tn, Treg, Th1 ja Th17. Seejärel eraldati uuritavatest rakupopulatsioonidest gDNA ning analüüsiti valitud CpG saitide metülatsioonitaseme väärtuseid. Analüüsi kaasati 19 CpG saiti, millest osutusid CD4⁺ Treg rakkude väärtuste ennustamiseks olulisteks 10 CpG saiti. Antud CpG saidid asusid Treg fenotüüpi kirjeldavates geenides *GITR*, *CTLA4* ja *FOXP3*. Oodatud tulemusena olid need Treg rakkudes hüpometüleeritud. Soospetsiifilist metülatsioonierinevusi väikese statistilise võimsuse tõttu ei tuvastatud, kuid oli näha oodatult trendi eelkõige X-kromosoomil paikneva *FOXP3* geeni korral, kus CpG saitide metüleeritus paistis naiste puhul kõrgem.

Töö teine eesmärk oli uurida bisulfitsekveneerimise põhise meetodi potentsiaali, mille kasutamisel oleks võimalik määrata vererakkudest isoleeritud DNA-st Treg rakkude osakaalu DNA metülatsioonimustri põhjal. Uurimusse kaasati TÜ Kliinikumi sisekliinikust ja nahahaiguste kliinikust 33 meest ja 57 naist, kelle voolutsütomeetria ja DNA metülatsiooni põhjal loodi ennustavad mudelid. Mudelit prooviti arendada nii üldise Treg rakkude osakaalu kui ka Treg alatüüpide (naiivsed Treg, RTE Treg, CM Treg ja EM Treg rakkude) ennustamiseks. Kõige paremaks mudeliks osutus siiski üldist Treg rakkude osakaalu ennustav mudel, mis kasutas kümnest Treg rakkudele olulistest CpG saitidest nelja. Kuna mudeliga ennustatud ja tegelike väärtuste korrelatsioon oli suhteliselt tugev ($r=0.73$), siis näitas antud analüüs, et bisulfitsekveneerimisel põhineval metülatsioonimudelil on potentsiaali CD4⁺ Treg rakkude ennustamiseks.

DNA methylation pattern-based analysis of CD4⁺ regulatory T cells

Anella Salmistu

SUMMARY

Regulatory T cells (Treg cells) form a specialized subpopulation of T cells that maintain immunological tolerance. They actively suppress the activation of the immune system and thus prevent pathological self-reactivity. The differentiation, function, and stability of Treg cells are controlled by transcription factor FOXP3. Treg cells are also characterized by high expression of surface molecules like GITR and CTLA-4. Cell type specific gene expression is regulated by DNA methylation, which is the best-studied epigenetic modification. Moreover, it can be used as a biomarker to differentiate between cell populations and predict proportions of cell types. Since *FOXP3* gene is encoded by the X chromosome, CpG sites of *FOXP3* gene might be differentially methylated in males and females.

The purpose of the current thesis was to study the changes in DNA methylation levels of the selected CpG sites for prediction of CD4⁺ Treg cells in different CD4⁺ cell subset and also to characterize methylation level differences between males and females. Current study included 9 individuals (5 men and 4 females) from Blood Center of Tartu University Hospital. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from buffy coats by Ficoll density gradient centrifugation and separated into four CD4⁺ T cell subpopulations (Treg, Tn, Th1, Th17) by FACS. After gDNA purification, the methylation pattern of different cell types was determined via bisulfite sequencing. Site-specific DNA methylation of 19 CpG sites was analyzed from white blood cells. Out of 19 CpG sites 10 sites were deemed relevant for predicting CD4⁺ Treg cells percentages. It was found that all these sites were in Treg phenotype describing genes like *GITR*, *CTLA4* and *FOXP3* and were hypomethylated in Treg cells. As expected, a trend implying gender-specific DNA methylation was found mostly in *FOXP3* gene, where the methylation of CpG sites seemed to be higher in females, however statistical power was not sufficient to obtain more conclusive results.

The second aim of the thesis was to study the potential of epigenetic-based approach to predict the proportion of CD4⁺ Treg cells using the DNA methylation-based model. These predictive models were developed for overall proportion of CD4⁺ Treg cells, as well as for subpopulations of CD4⁺ Treg cells (naïve Treg, RTE Treg, CM Treg and EM Treg cells). The best predictive model was found for overall Treg cells, and it used four CpG sites out of 10. As the correlation between predicted and actual CD4⁺ Treg values was quite strong ($r=0.73$), this thesis illustrates

the possibility to use bisulfite sequencing-based DNA methylation model for predicting CD4⁺ Treg cells.

TÄNUSÕNAD

Eelkõige soovin tänada oma juhendajaid Liina Tserelit ja Ahto Salumetsa, kes olid käesoleva magistritöö valmimisel suureks abiks. Suurimad tänusõnad lähevad Liina Tserelile, kes oli abiks katsete planeerimisel ja läbiviimisel. Suur tänu ka Ahto Salumetsale, kes oli toeks tulemuste analüüsimisel. Aitäh ka kõigile teistele molekulaarpatoloogia uurimisgrupi liikmetele, kelle poole sain alati küsimustega pöörduda, ning lähedastele nende julgustuse ja toetuse eest.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Accomando, W.P., Wiencke, J.K., Houseman, E.A., Nelson, H.H., Kelsey, K.T. (2014). Quantitative reconstruction of leukocyte subsets using DNA methylation. *Genome Biol.* 15, R50.
- Arpaia, N., Green, J.A., Moltedo, B., Arvey, A., Hemmers, S., Yuan, S., Treuting, P.M., Rudensky, A.Y. (2015). A Distinct Function of Regulatory T Cells in Tissue Protection. *Cell* 162, 1078–1089.
- Arruvito, L., Sanz, M., Banham, A.H., Fainboim, L. (2007). Expansion of CD4+CD25+ and FOXP3+ Regulatory T Cells during the Follicular Phase of the Menstrual Cycle: Implications for Human Reproduction. *J. Immunol.* 178, 2572–2578.
- Arvey, A., van der Veecken, J., Plitas, G., Rich, S.S., Concannon, P., Rudensky, A.Y. (2015). Genetic and epigenetic variation in the lineage specification of regulatory T cells. *eLife* 4, e07571.
- Babraham Bioinformatics (2017). GitHub repository, <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/bismark/>. Version 0.19.0.
- Babraham Bioinformatics (2019). Github repository, <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>. Version 0.11.9.
- Bacchetta, R., Barzaghi, F., Roncarolo, M.-G. (2018). From IPEX syndrome to FOXP3 mutation: a lesson on immune dysregulation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1417, 5–22.
- Baron, U., Floess, S., Wieczorek, G., ... Huehn, J. (2007). DNA demethylation in the human FOXP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3+ conventional T cells. *Eur. J. Immunol.* 37, 2378–2389.
- Baron, U., Turbachova, I., Hellwag, A., Eckhardt, F., Berlin, K., Hoffmüller, U., Gardina, P., Olek, S. (2006). DNA Methylation Analysis as a Tool for Cell Typing. *Epigenetics* 1, 56–61.
- Bartolomei, M.S., Oakey, R.J., Wutz, A. (2020). Genomic imprinting: An epigenetic regulatory system. *PLOS Genet.* 16, e1008970.
- Barzaghi, F., Passerini, L., Gambineri, E., ... Bacchetta, R. (2012). Demethylation analysis of the FOXP3 locus shows quantitative defects of regulatory T cells in IPEX-like syndrome. *J. Autoimmun.* 38, 49–58.

- Belkaid, Y., Rouse, B.T. (2005). Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nat. Immunol.* 6, 353–360.
- Belsky, D.W., Caspi, A., Arseneault, L., ... Moffitt, T.E. (2020). Quantification of the pace of biological aging in humans through a blood test, the DunedinPoAm DNA methylation algorithm. *eLife* 9, e54870.
- Belz, G.T., Masson, F. (2010). Interleukin-2 Tickles T Cell Memory. *Immunity* 32, 7–9.
- Bennett, C.L., Christie, J., Ramsdell, F., Brunkow, M.E., Ferguson, P.J., Whitesell, L., Kelly, T.E., Saulsbury, F.T., Chance, P.F., Ochs, H.D. (2001). The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat. Genet.* 27, 20–21.
- Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* 16, 6–21.
- Boehncke, W.-H., Brembilla, N.C. (2019). Autoreactive T-Lymphocytes in Inflammatory Skin Diseases. *Front. Immunol.* 10.
- Booth, N.J., McQuaid, A.J., Sobande, T., ... Vukmanovic-Stejic, M. (2010). Different Proliferative Potential and Migratory Characteristics of Human CD4+ Regulatory T Cells That Express either CD45RA or CD45RO. *J. Immunol.* 184, 4317–4326.
- Boyman, O., Sprent, J. (2012). The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 180–190.
- Carrel, L., Willard, H.F. (2005). X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females. *Nature* 434, 400–404.
- Chatila, T.A., Blaeser, F., Ho, N., Lederman, H.M., Voulgaropoulos, C., Helms, C., Bowcock, A.M. (2000). JM2, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity–allergic dysregulation syndrome. *J. Clin. Invest.* 106, R75–R81.
- Chen, B.H., Marioni, R.E., Colicino, E., ... Horvath, S. (2016). DNA methylation-based measures of biological age: meta-analysis predicting time to death. *Aging* 8, 1844–1859.
- Chen, C., Rowell, E.A., Thomas, R.M., Hancock, W.W., Wells, A.D. (2006). Transcriptional regulation by Foxp3 is associated with direct promoter occupancy and modulation of histone acetylation. *J. Biol. Chem.* 281, 36828–36834.

- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., Wahl, S.M. (2003). Conversion of Peripheral CD4⁺CD25⁻ Naive T Cells to CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cells by TGF- β Induction of Transcription Factor Foxp3. *J. Exp. Med.* 198, 1875–1886.
- Chen, X., Oppenheim, J.J. (2011). Resolving the identity myth: key markers of functional CD4⁺FoxP3⁺ regulatory T cells. *Int. Immunopharmacol.* 11, 1489–1496.
- Clark, L.B., Appleby, M.W., Brunkow, M.E., Wilkinson, J.E., Ziegler, S.F., Ramsdell, F. (1999). Cellular and Molecular Characterization of the scurfy Mouse Mutant. *J. Immunol.* 162, 2546–2554.
- Consonni, F., Favre, C., Gambineri, E. (2021). IL-2 Signaling Axis Defects: How Many Faces? *Front. Pediatr.* 9, 669298.
- Curiel, T.J., Coukos, G., Zou, L., ... Zou, W. (2004). Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat. Med.* 10, 942–949.
- Dor, Y., Cedar, H. (2018). Principles of DNA methylation and their implications for biology and medicine. *The Lancet* 392, 777–786.
- Dowle, M., Srinivasan, A. (2021). data.table: Extension of „data.frame“. R package version 1.14.0.
- Duggleby, R.C., Tsang, H.P., Strange, K., McWhinnie, A., Lamikanra, A.A., Roberts, D.J., Hernandez, D., Madrigal, J.A., Danby, R.D. (2020). Enumerating regulatory T cells in cryopreserved umbilical cord blood samples using FOXP3 methylation specific quantitative PCR. *PLOS ONE* 15, e0240190.
- Edelblum, K.L. (2016). Dissecting the Requirement for Secondary Lymphoid Organs in Peripheral Regulatory T-Cell Development. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* 2, 253–254.
- Fantini, M.C., Becker, C., Monteleone, G., Pallone, F., Galle, P.R., Neurath, M.F. (2004). Cutting Edge: TGF- β Induces a Regulatory Phenotype in CD4⁺CD25⁻ T Cells through Foxp3 Induction and Down-Regulation of Smad7. *J. Immunol.* 172, 5149–5153.
- Farlik, M., Halbritter, F., Müller, F., ... Bock, C. (2016). DNA Methylation Dynamics of Human Hematopoietic Stem Cell Differentiation. *Cell Stem Cell* 19, 808–822.
- Feng, Y., van der Veen, J., Shugay, M., ... Rudensky, A.Y. (2015). A mechanism for expansion of regulatory T-cell repertoire and its role in self-tolerance. *Nature* 528, 132–136.

- Fontenot, J.D., Gavin, M.A., Rudensky, A.Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4 + CD25 + regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 4, 330–336.
- Fontenot, J.D., Rasmussen, J.P., Gavin, M.A., Rudensky, A.Y. (2005). A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 6, 1142–1151.
- Frommer, M., McDonald, L.E., Millar, D.S., Collis, C.M., Watt, F., Grigg, G.W., Molloy, P.L., Paul, C.L. (1992). A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 1827–1831.
- Gregg, R., Smith, C.M., Clark, F.J., Dunnion, D., Khan, N., Chakraverty, R., Nayak, L., Moss, P.A. (2005). The number of human peripheral blood CD4+CD25high regulatory T cells increases with age. *Clin. Exp. Immunol.* 140, 540–546.
- Guerri, L., Peguillet, I., Geraldo, Y., Nabti, S., Premel, V., Lantz, O. (2013). Analysis of APC Types Involved in CD4 Tolerance and Regulatory T Cell Generation Using Reaggregated Thymic Organ Cultures. *J. Immunol.* 190, 2102–2110.
- Hannum, G., Guinney, J., Zhao, L., ... Zhang, K. (2013). Genome-wide Methylation Profiles Reveal Quantitative Views of Human Aging Rates. *Mol. Cell* 49, 359–367.
- Haribhai, D., Williams, J.B., Jia, S., ... Williams, C.B. (2011). A Requisite Role for Induced Regulatory T cells in Tolerance Based on Expanding Antigen Receptor Diversity. *Immunity* 35, 109–122.
- Heinaru, A., 2012. *Geneetika õpik*. Tartu Ülikooli Kirjastus.
- Herppich, S., Toker, A., Pietzsch, B., Kitagawa, Y., Ohkura, N., Miyao, T., Floess, S., Hori, S., Sakaguchi, S., Huehn, J. (2019). Dynamic Imprinting of the Treg Cell-Specific Epigenetic Signature in Developing Thymic Regulatory T Cells. *Front. Immunol.* 10.
- Horvath, S. (2013). DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol.* 14, R115.
- Houseman, E.A., Accomando, W.P., Koestler, D.C., Christensen, B.C., Marsit, C.J., Nelson, H.H., Wiencke, J.K., Kelsey, K.T. (2012). DNA methylation arrays as surrogate measures of cell mixture distribution. *BMC Bioinformatics* 13, 86.

- Husseiny, M.I., Fahmy, A., Du, W., Gu, A., Garcia, P., Ferreri, K., Kandeel, F. (2020). Development of Quantitative Methylation-Specific Droplet Digital PCR (ddMSP) for Assessment of Natural Tregs. *Front. Genet.*
- Illingworth, R., Kerr, A., DeSousa, D., ... Bird, A. (2008). A Novel CpG Island Set Identifies Tissue-Specific Methylation at Developmental Gene Loci. *PLoS Biol.* 6, e22.
- Itoh, M., Takahashi, T., Sakaguchi, N., Kuniyasu, Y., Shimizu, J., Otsuka, F., Sakaguchi, S. (1999). Thymus and Autoimmunity: Production of CD25+CD4+ Naturally Anergic and Suppressive T Cells as a Key Function of the Thymus in Maintaining Immunologic Self-Tolerance. *J. Immunol.* 162, 5317–5326.
- Janson, P.C.J., Winerdal, M.E., Marits, P., Thörn, M., Ohlsson, R., Winqvist, O. (2008). FOXP3 Promoter Demethylation Reveals the Committed Treg Population in Humans. *PLoS ONE* 3.
- Jiang, M., Zhang, Y., Fei, J., Chang, X., Fan, W., Qian, X., Zhang, T., Lu, D. (2010). Rapid quantification of DNA methylation by measuring relative peak heights in direct bisulfite-PCR sequencing traces. *Lab. Invest.* 90, 282–290.
- Jiang, P., Lo, Y.M.D. (2016). The Long and Short of Circulating Cell-Free DNA and the Ins and Outs of Molecular Diagnostics. *Trends Genet.* 32, 360–371.
- Jjingo, D., Conley, A.B., Yi, S.V., Lunyak, V.V., Jordan, I.K. (2012). On the presence and role of human gene-body DNA methylation. *Oncotarget* 3, 462–474.
- Kassambara, A. (2020). ggpubr: „ggplot2“ Based Publication Ready Plots. R package version 0.4.0.
- Kim, H.-P., Leonard, W.J. (2007). CREB/ATF-dependent T cell receptor–induced FoxP3 gene expression: a role for DNA methylation. *J. Exp. Med.* 204, 1543–1551.
- Kitagawa, Y., Ohkura, N., Kidani, Y., ... Sakaguchi, S. (2017). Guidance of regulatory T cell development by Satb1-dependent super-enhancer establishment. *Nat. Immunol.* 18, 173–183.
- Kolde, R. (2019). pheatmap: Pretty Heatmaps. R package version 1.0.12.
- Konkel, J.E., Jin, W., Abbatiello, B., Grainger, J.R., Chen, W. (2014). Thymocyte apoptosis drives the intrathymic generation of regulatory T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, E465–E473.
- Kressler, C., Gasparoni, G., Nordström, K., ... Polansky, J.K. (2021). Targeted De-Methylation of the FOXP3-TSDR Is Sufficient to Induce Physiological FOXP3 Expression but Not a Functional Treg Phenotype. *Front. Immunol.* 11.

- Krueger, F. (2020). GitHub repository, <https://github.com/FelixKrueger/TrimGalore>. Version 0.6.6.
- Kuhn, M. (2020). caret: Classification and Regression Training. R package version 6.0-86.
- Käärik, E. (2017). Loengukonspekt "Andmeanalüüs II (MTMS.01.007)". Tartu Ülikool.
- Lafaille, M.A.C. de, Lino, A.C., Kutchukhidze, N., Lafaille, J.J. (2004). CD25⁻ T Cells Generate CD25⁺Foxp3⁺ Regulatory T Cells by Peripheral Expansion. *J. Immunol.* 173, 7259–7268.
- Lal, G., Zhang, N., van der Touw, W., Ding, Y., Ju, W., Bottinger, E.P., Reid, St.P., Levy, D.E., Bromberg, J.S. (2009). Epigenetic Regulation of Foxp3 Expression in Regulatory T Cells by DNA Methylation. *J. Immunol.* 182, 259–273.
- Lee, W., Lee, G.R. (2018). Transcriptional regulation and development of regulatory T cells. *Exp. Mol. Med.* 50, e456–e456.
- Levine, M.E., Lu, A.T., Quach, A., ... Horvath, S. (2018). An epigenetic biomarker of aging for lifespan and healthspan (preprint). *Epidemiology*.
- Li, E., Zhang, Y. (2014). DNA Methylation in Mammals. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6.
- Li, X., Liang, Y., Leblanc, M., Benner, C., Zheng, Y. (2014). Function of a foxp3 cis-element in protecting regulatory T cell identity. *Cell* 158, 734–748.
- Lin, W., Haribhai, D., Relland, L.M., Truong, N., Carlson, M.R., Williams, C.B., Chatila, T.A. (2007). Regulatory T cell development in the absence of functional Foxp3. *Nat. Immunol.* 8,
- Lio, C.-W.J., Hsieh, C.-S. (2008). A Two-Step Process for Thymic Regulatory T Cell Development. *Immunity* 28, 100–111.
- Lu, A.T., Quach, A., Wilson, J.G., ... Horvath, S. (2019). DNA methylation GrimAge strongly predicts lifespan and healthspan. *Aging* 11, 303–327.
- Lucca, L.E., Dominguez-Villar, M. (2020). Modulation of regulatory T cell function and stability by co-inhibitory receptors. *Nat. Rev. Immunol.* 20, 680–693.
- Marzese, D.M., Hoon, D.S.B. (2015). Emerging technologies for studying DNA methylation for the molecular diagnosis of cancer. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 15, 647–664.
- McHugh, R.S., Whitters, M.J., Piccirillo, C.A., Young, D.A., Shevach, E.M., Collins, M., Byrne, M.C. (2002). CD4⁺CD25⁺ Immunoregulatory T Cells: Gene Expression Analysis

- Reveals a Functional Role for the Glucocorticoid-Induced TNF Receptor. *Immunity* 16, 311–323.
- McMurphy, A.N., Gillies, J., Gizzi, M.C., ... Levings, M.K. (2013). A novel function for FOXP3 in humans: intrinsic regulation of conventional T cells. *Blood* 121, 1265–1275.
- Mikami, N., Kawakami, R., Chen, K.Y., Sugimoto, A., Ohkura, N., Sakaguchi, S. (2020). Epigenetic conversion of conventional T cells into regulatory T cells by CD28 signal deprivation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 117, 12258–12268.
- Minskaia, E., Saraiva, B.C., Soares, M.M.V., Azevedo, R.I., Ribeiro, R.M., Kumar, S.D., Vieira, A.I.S., Lacerda, J.F. (2018). Molecular Markers Distinguishing T Cell Subtypes With TSDR Strand-Bias Methylation. *Front. Immunol.*
- Morikawa, H., Ohkura, N., Vandenberg, A., ... Hayashizaki, Y. (2014). Differential roles of epigenetic changes and Foxp3 expression in regulatory T cell-specific transcriptional regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 5289–5294.
- Morikawa, H., Sakaguchi, S. (2014). Genetic and epigenetic basis of Treg cell development and function: from a FoxP3-centered view to an epigenome-defined view of natural Treg cells. *Immunol. Rev.* 259, 192–205.
- Mottet, C., Uhlig, H.H., Powrie, F. (2003). Cutting Edge: Cure of Colitis by CD4+CD25+ Regulatory T Cells. *J. Immunol.* 170, 3939–3943.
- Murawski, M.R., Litherland, S.A., Clare-Salzler, M.J., Davoodi-Semiromi, A. (2006). Upregulation of Foxp3 Expression in Mouse and Human Treg Is IL-2/STAT5 Dependent. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1079, 198–204.
- Nedoszytko, B., Sokołowska-Wojdyło, M., Renke, J., ... Nowicki, R.J. (2017). The role of regulatory T cells and genes involved in their differentiation in pathogenesis of selected inflammatory and neoplastic skin diseases. Part III: Polymorphisms of genes involved in Tregs' activation and function. *Adv. Dermatol. Allergol. Dermatol. Alergol.* 34, 517–525.
- Nie, J., Li, Y.Y., Zheng, S.G., Tsun, A., Li, B. (2015). FOXP3+ Treg Cells and Gender Bias in Autoimmune Diseases. *Front. Immunol.* 6.
- Nishizuka, Y., Sakakura, T. (1969). Thymus and Reproduction: Sex-Linked Dysgenesis of the Gonad after Neonatal Thymectomy in Mice. *Science* 166, 753–755.

- Nocentini, G., Giunchi, L., Ronchetti, S., Krausz, L.T., Bartoli, A., Moraca, R., Migliorati, G., Riccardi, C. (1997). A new member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor family inhibits T cell receptor-induced apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 6216–6221.
- Ohkura, N., Hamaguchi, M., Morikawa, H., ... Sakaguchi, S. (2012). T Cell Receptor Stimulation-Induced Epigenetic Changes and Foxp3 Expression Are Independent and Complementary Events Required for Treg Cell Development. *Immunity* 37, 785–799.
- Ohkura, N., Sakaguchi, S. (2020). Transcriptional and epigenetic basis of Treg cell development and function: its genetic anomalies or variations in autoimmune diseases. *Cell Res.* 30, 465–474.
- Ohkura, N., Sakaguchi, S. (2010). Regulatory T cells: roles of T cell receptor for their development and function. *Semin. Immunopathol.* 32, 95–106.
- Ono, M. (2020). Control of regulatory T-cell differentiation and function by T-cell receptor signalling and Foxp3 transcription factor complexes. *Immunology* 160, 24–37.
- Ono, M., Yaguchi, H., Ohkura, N., Kitabayashi, I., Nagamura, Y., Nomura, T., Miyachi, Y., Tsukada, T., Sakaguchi, S. (2007). Foxp3 controls regulatory T-cell function by interacting with AML1/Runx1. *Nature* 446, 685–689.
- Ouyang, W., Beckett, O., Ma, Q., Li, M.O. (2010). Transforming Growth Factor- β Signaling Curbs Thymic Negative Selection Promoting Regulatory T Cell Development. *Immunity* 32, 642–653.
- Pajares, M.J., Palanca-Ballester, C., Urtasun, R., Alemany-Cosme, E., Lahoz, A., Sandoval, J. (2021). Methods for analysis of specific DNA methylation status. *Methods, Advance Epigenetics Methods in Biomedicine* 187, 3–12.
- Passerini, L., Allan, S.E., Battaglia, M., Di Nunzio, S., Alstad, A.N., Levings, M.K., Roncarolo, M.G., Bacchetta, R. (2008). STAT5-signaling cytokines regulate the expression of FOXP3 in CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells and CD4⁺CD25⁻ effector T cells. *Int. Immunol.* 20, 421–431.
- Pere, H., Tanchot, C., Bayry, J., Terme, M., ... Tartour, E. (2012). Comprehensive analysis of current approaches to inhibit regulatory T cells in cancer. *Oncoimmunology* 1, 326–333.
- Polansky, J.K., Kretschmer, K., Freyer, J., Floess, S., Garbe, A., Baron, U., Olek, S., Hamann, A., von Boehmer, H., Huehn, J. (2008). DNA methylation controls Foxp3 gene expression. *Eur. J. Immunol.* 38, 1654–1663.

- Rainbow, D.B., Yang, X., Burren, O., ... Wicker, L.S. (2015). Epigenetic analysis of regulatory T cells using multiplex bisulfite sequencing. *Eur. J. Immunol.* 45, 3200–3203.
- R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Romano, M., Fanelli, G., Albany, C.J., Giganti, G., Lombardi, G. (2019). Past, Present, and Future of Regulatory T Cell Therapy in Transplantation and Autoimmunity. *Front. Immunol.* 10.
- Ronchetti, S., Ricci, E., Petrillo, M.G., Cari, L., Migliorati, G., Nocentini, G., Riccardi, C. (2015). Glucocorticoid-Induced Tumour Necrosis Factor Receptor-Related Protein: A Key Marker of Functional Regulatory T Cells. *J. Immunol. Res.* 2015.
- Rosenblum, M.D., Way, S.S., Abbas, A.K. (2016). Regulatory T cell memory. *Nat. Rev. Immunol.* 16, 90–101.
- Rossetti, M., Spreafico, R., Saidin, S., ... Albani, S. (2015). Ex Vivo–Expanded but Not In Vitro–Induced Human Regulatory T Cells Are Candidates for Cell Therapy in Autoimmune Diseases Thanks to Stable Demethylation of the FOXP3 Regulatory T Cell–Specific Demethylated Region. *J. Immunol.* 194, 113–124.
- RStudio Team (2021). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA.
- Rubtsov, Y.P., Niec, R., Josefowicz, S., Li, L., Darce, J., Mathis, D., Benoist, C., Rudensky, A.Y. (2010). Stability of the regulatory T cell lineage in vivo. *Science* 329, 1667–1671.
- Sakaguchi, S., Miyara, M., Costantino, C.M., Hafler, D.A. (2010). FOXP3 + regulatory T cells in the human immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 490–500.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., Toda, M. (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, 1151–1164.
- Sanchez, A.M., Zhu, J., Huang, X., Yang, Y. (2012). The Development and Function of Memory Regulatory T Cells after Acute Viral Infections. *J. Immunol.* 189, 2805–2814.
- Santner-Nanan, B., Seddiki, N., Zhu, E., Quent, V., Kelleher, A., de St Groth, B.F., Nanan, R. (2008). Accelerated age-dependent transition of human regulatory T cells to effector memory phenotype. *Int. Immunol.* 20, 375–383.

- Sasidharan Nair, V., Toor, S.M., Taha, R.Z., Shaath, H., Elkord, E. (2018). DNA methylation and repressive histones in the promoters of PD-1, CTLA-4, TIM-3, LAG-3, TIGIT, PD-L1, and galectin-9 genes in human colorectal cancer. *Clin. Epigenetics* 10, 104.
- Schmidl, C., Klug, M., Boeld, T.J., Andreesen, R., Hoffmann, P., Edinger, M., Rehli, M. (2009). Lineage-specific DNA methylation in T cells correlates with histone methylation and enhancer activity. *Genome Res.* 19, 1165–1174.
- Sehouli, J., Loddenkemper, C., Cornu, T., ... Olek, S. (2011). Epigenetic quantification of tumor-infiltrating T-lymphocytes. *Epigenetics* 6, 236–246.
- Sekiya, T., Nakatsukasa, H., Lu, Q., Yoshimura, A. (2016). Roles of transcription factors and epigenetic modifications in differentiation and maintenance of regulatory T cells. *Microbes Infect.* 18, 378–386.
- Setoguchi, R., Hori, S., Takahashi, T., Sakaguchi, S. (2005). Homeostatic maintenance of natural Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *J. Exp. Med.* 201, 723–735.
- Shevach, E.M., Thornton, A.M. (2014). tTregs, pTregs, and iTregs: similarities and differences. *Immunol. Rev.* 259, 88–102.
- Shevryev, D., Tereshchenko, V. (2020). Treg Heterogeneity, Function, and Homeostasis. *Front. Immunol.*
- Singh, R.P., Bischoff, D.S. (2021). Sex Hormones and Gender Influence the Expression of Markers of Regulatory T Cells in SLE Patients. *Front. Immunol.* 12, 619268.
- Slowikowski, K. (2021). ggrepel: Automatically Position Non-Overlapping Text Labels with „ggplot2“. R package version 0.9.1.
- Smigiel, K.S., Richards, E., Srivastava, S., Thomas, K.R., Dudda, J.C., Klonowski, K.D., Campbell, D.J. (2013). CCR7 provides localized access to IL-2 and defines homeostatically distinct regulatory T cell subsets. *J. Exp. Med.* 211, 121–136.
- Spreafico, R., Rossetti, M., Broek, T. van den, Jansen, N.J.G., Zhang, H., Moshref, M., Prakken, B., Loosdregt, J. van, Wijk, F. van, Albani, S. (2014). A sensitive protocol for FOXP3 epigenetic analysis in scarce human samples. *Eur. J. Immunol.* 44, 3141–3143.

- Tai, X., Erman, B., Alag, A., ... Singer, A. (2013). Foxp3 transcription factor is pro-apoptotic and lethal to developing regulatory T cells unless counterbalanced by cytokine survival signals. *Immunity* 38, 1116–1128.
- Thornton, A.M., Korty, P.E., Tran, D.Q., Wohlfert, E.A., Murray, P.E., Belkaid, Y., Shevach, E.M. (2010). Expression of Helios, an Ikaros Transcription Factor Family Member, Differentiates Thymic-Derived from Peripherally Induced Foxp3⁺ T Regulatory Cells. *J. Immunol.* 184, 3433–3441.
- Tommasini, A., Ferrari, S., Moratto, D., Badolato, R., Boniotto, M., Pirulli, D., Notarangelo, L.D., Andolina, M. (2002). X-chromosome inactivation analysis in a female carrier of FOXP3 mutation. *Clin. Exp. Immunol.* 130, 127–130.
- Tone, Y., Furuuchi, K., Kojima, Y., Tykocinski, M.L., Greene, M.I., Tone, M. (2008). Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer. *Nat. Immunol.* 9, 194–202.
- Tosello, V., Odunsi, K., Souleimanian, N.E., Lele, S., Shrikant, P., Old, L.J., Valmori, D., Ayyoub, M. (2008). Differential expression of CCR7 defines two distinct subsets of human memory CD4⁺CD25⁺ Tregs. *Clin. Immunol.* 126, 291–302.
- Valmori, D., Merlo, A., Souleimanian, N.E., Hesdorffer, C.S., Ayyoub, M. (2005). A peripheral circulating compartment of natural naive CD4⁺ Tregs. *J. Clin. Invest.* 115, 1953–1962.
- Vang, K.B., Yang, J., Mahmud, S.A., Burchill, M.A., Vegoe, A.L., Farrar, M.A. (2008). Interleukin-2, -7 and -15, but not TSLP, Redundantly Govern CD4⁺Foxp3⁺ Regulatory T Cell Development. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 181, 3285–3290.
- Venables, W. N. ja Ripley, B. D. (2002). *Modern Applied Statistics with S*. Fourth Edition. Springer, New York.
- Weidner, C.I., Lin, Q., Koch, C.M., ... Wagner, W. (2014). Aging of blood can be tracked by DNA methylation changes at just three CpG sites. *Genome Biol.* 15, R24.
- Weist, B.M., Kurd, N., Boussier, J., Chan, S.W., Robey, E.A. (2015). Thymic regulatory T cell niche size is dictated by limiting IL-2 from antigen-bearing dendritic cells and feedback competition. *Nat. Immunol.* 16, 635–641.
- Wickham, H., François, R., Henry, L. and Müller, K. (2021). *dplyr: A Grammar of Data Manipulation*. R package version 1.0.5.

- Wickham, H., Seidel, D. (2020). scales: Scale Functions for Visualization. R package version 1.1.1.
- Wickham, H. (2016). ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag New York. R package version 3.1.0.
- Wieczorek, G., Asemissen, A., Model, F., ... Olek, S. (2009). Quantitative DNA Methylation Analysis of FOXP3 as a New Method for Counting Regulatory T Cells in Peripheral Blood and Solid Tissue. *Cancer Res.* 69, 599–608.
- Williams, L.M., Rudensky, A.Y. (2007). Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3. *Nat. Immunol.* 8, 277–284.
- Wing, J.B., Tanaka, A., Sakaguchi, S. (2019). Human FOXP3+ Regulatory T Cell Heterogeneity and Function in Autoimmunity and Cancer. *Immunity* 50, 302–316.
- Yagi, H., Nomura, T., Nakamura, K., ... Sakaguchi, S. (2004). Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int. Immunol.* 16, 1643–1656.
- Yamaguchi, T., Kishi, A., Osaki, M., Morikawa, H., Prieto-Martin, P., Wing, K., Saito, T., Sakaguchi, S. (2013). Construction of self-recognizing regulatory T cells from conventional T cells by controlling CTLA-4 and IL-2 expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, E2116–E2125.
- Yang, X., Han, H., De Carvalho, D.D., Lay, F.D., Jones, P.A., Liang, G. (2014). Gene Body Methylation Can Alter Gene Expression and Is a Therapeutic Target in Cancer. *Cancer Cell* 26, 577–590.
- Zhang, Y., Maksimovic, J., Naselli, G., Qian, J., Chopin, M., Blewitt, M.E., Oshlack, A., Harrison, L.C. (2013). Genome-wide DNA methylation analysis identifies hypomethylated genes regulated by FOXP3 in human regulatory T cells. *Blood* 122, 2823–2836.
- Zheng, Y., Josefowicz, S., Chaudhry, A., Peng, X.P., Forbush, K., Rudensky, A.Y. (2010). Role of conserved non-coding DNA elements in the Foxp3 gene in regulatory T-cell fate. *Nature* 463, 808–812.
- Zheng, Y., Rudensky, A.Y. (2007). Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage. *Nat. Immunol.* 8, 457–462.

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

1. <http://genome.ucsc.edu/> (kasutatud 26.10.2020)
2. <http://primer3.ut.ee/> (kasutatud 26.10.2020)
3. <https://tcalculator.neb.com/#!/main> (kasutatud 26.10.2020)
4. <https://towardsdatascience.com/introduction-to-aic-akaike-information-criterion-9c9ba1c96ced> (kasutatud 25.04.2022)
5. <https://ashutoshtr.medium.com/what-is-stepaic-in-r-a65b71c9eeba> (kasutatud 25.04.2022)

LISAD

Lisa 1. Valimisse 2 kuuluvate indiviidide voolutsütomeetria analüüs.

Voolutsütomeetria analüüsiks kasutati PBMC-sid, mis olid eelnevalt eraldatud täisverest kasutades Ficoll-gradient-tsentrifugimist. Rakkude sulatamiseks kasutati sooja RPMI 1640 rakusöödet. Seejärel tsentrifugiti 10 minutit 200 rcf juures toatemperatuuril. Supernatant eemaldati ning rakud võeti üles 800 µl seerumivabas söötmes. Saadud rakususpensioonid jagati 400 µl kaupa kahte 5 ml katsutisse tekitades ühest proovist kaks proovi. Viimasteks olid T-raku ja müeloidset päritolu supressorakkude (MDSC, ingl. k. *myeloid-deriver suppressor cells*) proovid, millest sooviti omakorda voolutsütomeetria analüüsiga välja selgitada nende alampopulatsioonide suurused. Proovid tsentrifugiti 200 rcf juures 10 min toatemperatuuril, supernatant eemaldati ning rakud võeti üles 55 µl FcR blokaatori (BD Biosciences, USA) ja seerumivaba söötme lahuses (suhe 1:10). Rakususpensioone inkubeeriti jääl 5 minutit ning seejärel märgistati rakkude pinnamarkerid. T-raku ja MDSC proovidele lisati 50 µl antikehade kokteili (BioLegend, USA), mis on välja toodud tabelis 10.

Tabel 10. T-raku ja MDSC proovidele lisatavad antikehade segud.

T-rakk		MDSC	
Antikeha	Fluorokroom	Antikeha	Fluorokroom
CD25	FITC	CD33 1:10	FITC
HLA-DR	PerCP-Cy5.5	CD3	BV650
CD31 1:10	APC	CD19	APC
CD4 1:10	AF700	CD56	APC-Cy7
CD27	BV510	CD11b	BV421
PD1	BV605	HLA-DR	BV510
CD3	BV650	CD45 1:10	BV711
CD57	PE	CD15	PE
CCR7	PE-Dazzle	CD14 1:10	PE-Dazzle
CD28 1:10	PE-Cy5	CD16 1:10	AF700
CD45RA 1:10	PE-Cy7		
CD8	BUV395		

Pärast antikeha segude lisamist inkubeeriti proove toatemperatuuril 20 minutit pimedas. Järgnes pesuetapp, kus rakke pesti 1 ml külma RB puhvriga, tsentrifugiti 5 minutit 350 rcf juures toatemperatuuril ning supernatant eemaldati. Antud pesuetappi korrati veel kaks korda. MDSC proovid võeti üles 200 µl RB puhvril ning asetati jääle. T-raku proovidele lisati veel 50 µl sekundaarset antikeha CD127 biotin/BV421 SA 1:10 (BioLegend, USA) lahendust ning inkubeeriti 15 minutit 4°C juures pimedas. Seejärel pesti rakke 200 µl RB lahusega, tsentrifugiti 5 minutit 500 rcf juures toatemperatuuril ning supernatant eemaldati. Antud

pesuetappi korrati veel üks kord. Ka T-raku proovid võeti üles 200 µl RB lahuses. Seejärel loendati rakke voolutsütomeetriga LSRFortessa (BD Biosciences, USA) kasutades tarkvara BD FACSDiva (BD Biosciences, USA).

Lisa 2. Töös uuritud CpG saidid, kasutatud praimerid ja amplikonide pikkused. Primeripaarid 1-8 on autori enda disainitud, primeripaarid 9-24 olid varasemalt disainitud Tartu Ülikooli molekulaarpatoloogia uurimisrühma teiste liikmete poolt.

Nr	Asukoht kromosoomis	Geen	CpG sait	Primeri 5' → 3' järjestus		Pikkus (nt)
				F	R	
1	chr1.1139061	<i>GITR</i>	cg19413397	F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGAC AGGGTTAGTAAGGGAGGAAGGGG	209
				R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGA CAGACCCTACTCCCCTAACCAACA	
2	chr2.204734182	<i>CTLA4</i>	cg26091609	F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGAC AGAGGTGAGGGTTAGGGAAGGA	198
				R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGA CAGTCCCTTCCACCAAACCACTT	
3	chr2.204737672	<i>CTLA4</i>	cg14288266	F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGAC AGTTTTATTTGTTTGTGTATTTGGGG	184
				R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGA CAGTCCCAACTCTATCTTTCTACTCCT	
4	chrX.49119237	<i>FOXP3</i>	-	F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGAC AGGGAATGGAGGTATGGAGAGGT	156
				R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGA CAGACCAAACCTATCTAAAACAAACCCA	
5	chrX.49117333	<i>FOXP3</i> CNS2	-	F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGAC AGGAGGAAGAGAAGAGGGTAGA	183
				R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGA CAGTACCACATCCACCAACACCC	
6	chrX.49114821	<i>FOXP3</i> CNS3	-	F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGAC AGAGGAAGAAGAGGAGGTATGGGT	206
				R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGA CAGACCCTTAACCCATCCCCAAA	
7	chrX.49114546	<i>FOXP3</i>	cg06767008	F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGAC AGTTGTTATATGGGGATGGGGA	192
				R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGA CAGTCCCCACCTACCAAACCTCA	
8	chrX.49114763	<i>FOXP3</i>	-	F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGAC AGTGGGTTTAGGGTTTTATTTGTAGT	210
				R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGA CAGACACCCAAAACCTCAAACCT	

9	chr2.87012810	CD8A	cg00219921	F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAAGAGAC AGGAGATGGTATGGGTGTTTTTAG	188
				R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGA CAGCCACAAAAATCACAACTATTATA	
10	chr2.87020937	CD8A	cg25939861	F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAAGAGAC AGTGTGATGATGGTTAGATTTGGGG	193
				R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGA CAGACCACCCACTAACTAACACT	
11	chr14.25079357	GZMH	cg02150910	F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAAGAGAC AGTGGGGTTAGAGTATAAGATGGT	152
				R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGA CAGACTACTAAAACAAATCCAACCTC	
12	chr17.38710321	CCR7	cg23663547	F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAAGAGAC AGTGGAGTTTAGAGTGTGGTTTTGA	167
				R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGA CAGACACACTCATCCCCTCACTT	
13	chr12.4915878	-	cg26215982	F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAAGAGAC AGAGTTTTGTTTGAAGGGTGGT	216
				R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGA CAGTCAAACCAATCCTAACAAAACA	
14	chr12.68551656	IFNG	cg01940810	F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAAGAGAC AGGTTTATTTTTGGAGAATAAATGTTTTG	212
				R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGA CAGCATAAATATCAAATTTTTCAATAACAAC	
15	chr17.79921716	-	cg04467549	F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAAGAGAC AGGGGTGATAATAGTGTTTTTGTTAGA	243
				R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGA CAGATTCAACATACAACTCCAT	
16	chr13.113834332	PCID2	cg06567722	F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAAGAGAC AGAAGAGGTTTTGTAGGTGAT	182
				R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGA CAGAAAACAACCTACTACTACTACA	
17	chr3.114012834	TIGIT	cg13669740	F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAAGAGAC AGATGTAGTTTGTGATTTTGTGAT	217
				R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGA CAGCAAATATAACCTCTTCTACCACT	
18	chr12.6898501	CD4	cg05044173	F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAAGAGAC AGGTTTGTGGTTTATTATTGTTGT	217
				R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGA CAGAAATCAAACCTACTACTACTATT	
19	chr12.6898786	CD4	cg13512987	F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAAGAGAC AGATTGGGTTTTTGGTTGTAGAG	167
				R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGA CAGTCTAACCACTTACCTCTAAAC	

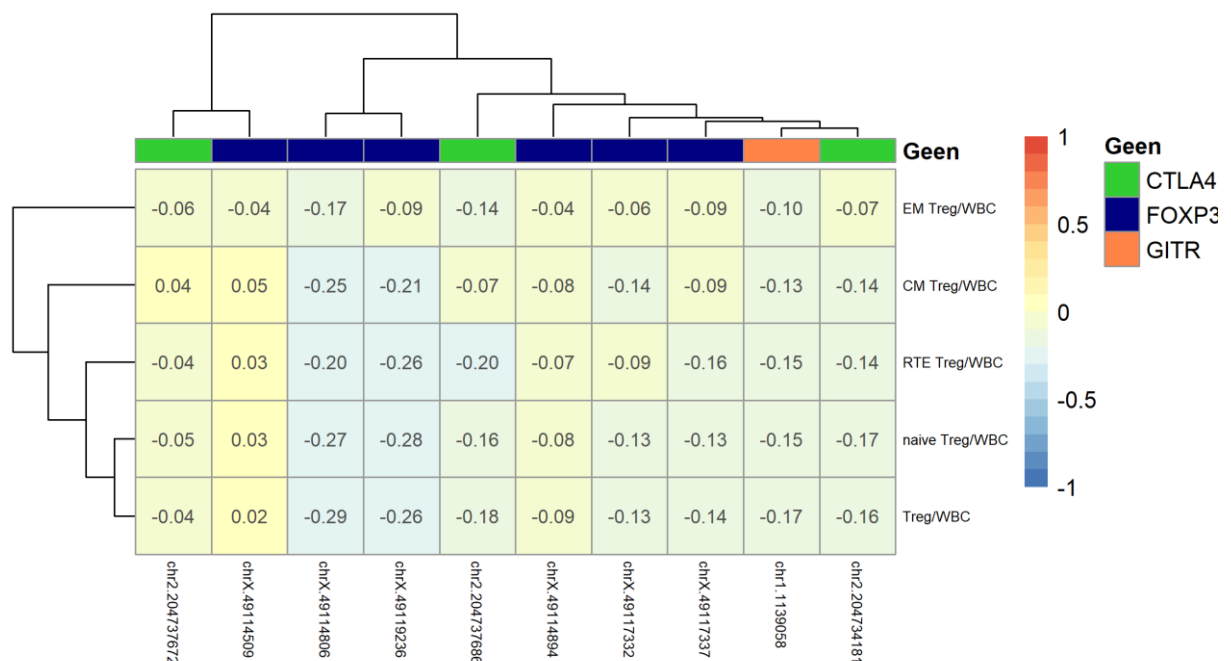
20	chrX.49117250	FOXP3	-	F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAAGAGAC AGGGGTTTGTATTTGGGTTTTGTTGT	181
				R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAAGAGA CAGTCTACCCTCTTCTCTTCCTCT	
21	chr11.118175632	CD3E	cg24612198	F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAAGAGAC AGAGAAGTAGTAAGTTTGTGGT	193
				R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAAGAGA CAGACTCCATCCTACTCACCTAAT	
22	chr11.118213330	CD3D	cg24841244	F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAAGAGAC AGAAGGGTAGTTAGTATTAGGTTAG	177
				R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAAGAGA CAGCAACTCTCACCCAACTAATAA	
23	chr11.118214927	CD3G	cg07545925	F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAAGAGAC AGGAGTTTTTGAGTGGGAATTTAGTA	205
				R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAAGAGA CAGTCCACCCTCTACTACAAATAT	
24	chr1.118215113	CD3G	cg15880738	F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAAGAGAC AGGGTTGGTTGGTTGGTTGGTTGT	157
				R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAAGAGA CAGAACAACCAAACCCTTCCCCT	

Lisa 3. Töös analüüsitud 19 CpG saiti, nende asukoht kromosoomis ja amplikoni info. Tabelis on välja toodud info, mis amplikonist antud CpG saidid pärinevad. Amplikonide kohta leiab täpsemat informatsiooni lisast 2.

Nr	CpG saidi asukoht kromosoomis	Geen	Amplikon
1.	chr1.1139052	<i>GITR</i>	1
2.	chr1.1139054	<i>GITR</i>	1
3.	chr1.1139058	<i>GITR</i>	1
4.	chr1.1139061	<i>GITR</i>	1
5.	chr1.1139080	<i>GITR</i>	1
6.	chr2.204734181	<i>CTLA4</i>	2
7.	chr2.204737672	<i>CTLA4</i>	3
8.	chr2.204737686	<i>CTLA4</i>	3
9.	chrX.49114509	<i>FOXP3</i>	7

10.	chrX.49114545	<i>FOXP3</i>	7
11.	chrX.49114762	<i>FOXP3</i>	8
12.	chrX.49114806	<i>FOXP3</i>	8
13.	chrX.49114811	<i>FOXP3</i>	8
14.	chrX.49114820	<i>FOXP3</i>	8
15.	chrX.49114847	<i>FOXP3</i>	8
16.	chrX.49114894	<i>FOXP3</i>	8
17.	chrX.49117332	<i>FOXP3</i>	5
18.	chrX.49117337	<i>FOXP3</i>	5
19.	chrX.49119236	<i>FOXP3</i>	4

Lisa 4. Korrelatsioonimaatriks Treg rakkudes diferentsiaalselt metüleeritud kümne CpG saidi ja Treg rakkude osakaalude vahel. Reas on välja toodud erinevad Treg rakkude alampopulatsioonide nimed, kus Treg/WBC tähistab üldist Treg rakkude osakaalu valgetest vererakkudest. EM, CM, RTE ja naive tähistavad Treg rakkude alampopulatsioone. Tulbas on CpG saidi asukoht kromosoomis. Värvikoodiga on eristatud geen ja korrelatsiooniväärtus. Üks kast vastab ühe uuritava CpG saidi ja Treg rakkude osakaalu seosele. Kasutatud on Pearsoni korrelatsiooni.



Lisa 5. Naiivsete Treg rakkude mudeli väljund, selles kasutatud CpG saidid ning mudeli töökindlus. **A.** naiivsete Treg (joonistel naive Treg) ehk nTreg rakkude mudeli väljundi esimeses osas on välja toodud uuritav tunnus ning mudelis kasutatud argumendid. Tabelis „Coefficients“ on kirjas mudeli parameetrid koos statistilise usaldusväarsuse näitajatega. Tulbas „Estimate“ on aga välja toodud argumentide regressioonikordajad. Mudeli statistilist olulisust näitab F-statistik. Determinatsioonikordaja R^2 näitab, kui palju uuritava tunnuse (antud juhul nTreg rakkude osakaalu) hajuvusest mudel ära kirjeldab. **B.** nTreg mudelis kasutatud informatiivsemate CpG saitide korrelatsioon nTreg rakkude osakaaluga. X-teljel on välja toodud uuritav tunnus (nTreg rakkude osakaal WBC-dest) ning y-teljel mudelis kasutatud CpG saidi asukoht kromosoomis. CpG saitide numeratsioon vastab lisas 3 väljatoodule. Värvikoodiga on eristatud meeste ja naiste CpG saitide metüleerituse korrelatsioonid uuritava tunnusega koos ning eraldi. Kasutatud on Pearsoni korrelatsiooni. **C.** Mudeliga ennustatud nTreg osakaalude võrdlus WBC-dest tegelike väärtustega. X-teljel on välja toodud tegelikud ning y-teljel ennustatud nTreg rakkude osakaalu väärtused. Joonisele on märgitud ka kahe uuritava tunnuse korrelatsiooni r ning mudeli RMSE väärtus.

A. Call:
`lm(formula = naive_Treg_WBC_log ~ Sugu + chr2.204737686.204737686.CTLA4.Treg + chrX.49114806.49114806.FOXP3.Treg + chrX.49117337.49117337.FOXP3.Treg, data = data)`

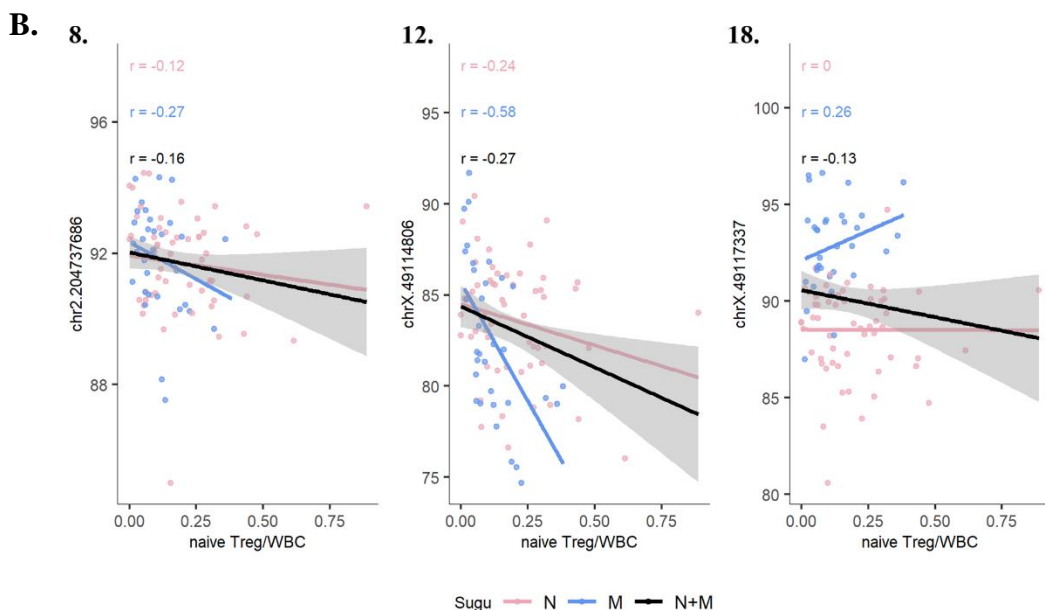
Residuals:
 Min 1Q Median 3Q Max
 -2.96608 -0.50369 -0.02964 0.52806 1.88973

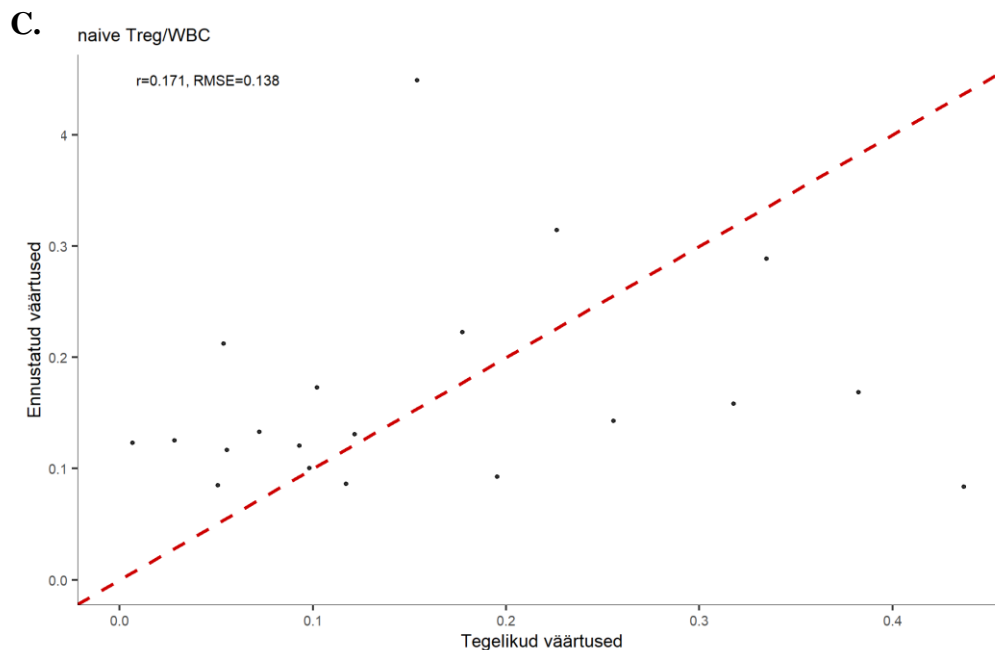
Coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	9.76831	7.80753	1.251	0.215368
SuguN	1.05777	0.29594	3.574	0.000668 ***
chr2.204737686.204737686.CTLA4.Treg	-0.12199	0.08430	-1.447	0.152643
chrX.49114806.49114806.FOXP3.Treg	-0.12203	0.03249	-3.756	0.000372 ***
chrX.49117337.49117337.FOXP3.Treg	0.09736	0.05003	1.946	0.055983 .

 Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 0.8826 on 65 degrees of freedom
 Multiple R-squared: 0.3255, Adjusted R-squared: 0.284
 F-statistic: 7.842 on 4 and 65 DF, p-value: 3.202e-05





Lisa 6. EM Treg rakkude mudeli väljund, selles kasutatus CpG saidid ning mudeli töökindlus. **A.** EM Treg rakkude mudeli väljundi esimeses osas on välja toodud uuritav tunnus ning mudelis kasutatud argumendid. Tabelis „Coefficients“ on kirjas mudeli parameetrid koos statistilise usaldusväärsuse näitajatega. Tulbas „Estimate“ on aga välja toodud argumentide regressioonikordajad. Mudeli statistilist olulisust näitab F-statistik. Determinatsioonikordaja R^2 näitab, kui palju uuritava tunnuse (antud juhul EM Treg rakkude osakaalu) hajuvusest mudel ära kirjeldab. **B.** EM Treg mudelis kasutatud informatiivsemate CpG saitide korrelatsioon EM Treg rakkude osakaaluga. X-teljel on välja toodud uuritav tunnus (EM Treg rakkude osakaal WBC-dest) ning y-teljel mudelis kasutatud CpG saidi asukoht kromosoomis. CpG saitide numeratsioon vastab lisas 3 väljatoodule. Värvikoodiga on eristatud meeste ja naiste CpG saitide metüleerituse korrelatsioonid uuritava tunnusega koos ning eraldi. Kasutatud on Pearsoni korrelatsiooni. **C.** Mudeliga ennustatud EM Treg osakaalude võrdlus WBC-dest tegelike väärtustega. X-teljel on välja toodud tegelikud ning y-teljel ennustatud EM Treg rakkude osakaalu väärtused. Joonisele on märgitud ka kahe uuritava tunnuse korrelatsiooni r ning mudeli RMSE väärtus.

A. Call:
`lm(formula = EM_Treg_WBC ~ chr1.1139058.1139058.GITR.Treg +
chr2.204737686.204737686.CTLA4.Treg,
data = data)`

Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-0.19167	-0.08866	-0.03902	0.07011	0.41390

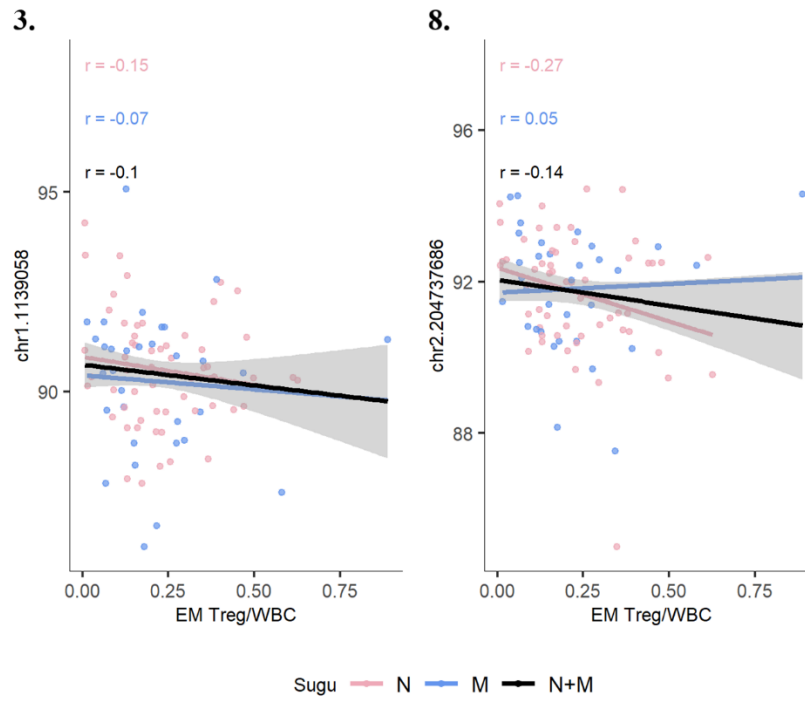
Coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	4.39451	1.35772	3.237	0.00188 **
chr1.1139058.1139058.GITR.Treg	-0.01871	0.01003	-1.866	0.06645 .
chr2.204737686.204737686.CTLA4.Treg	-0.02703	0.01042	-2.595	0.01160 *

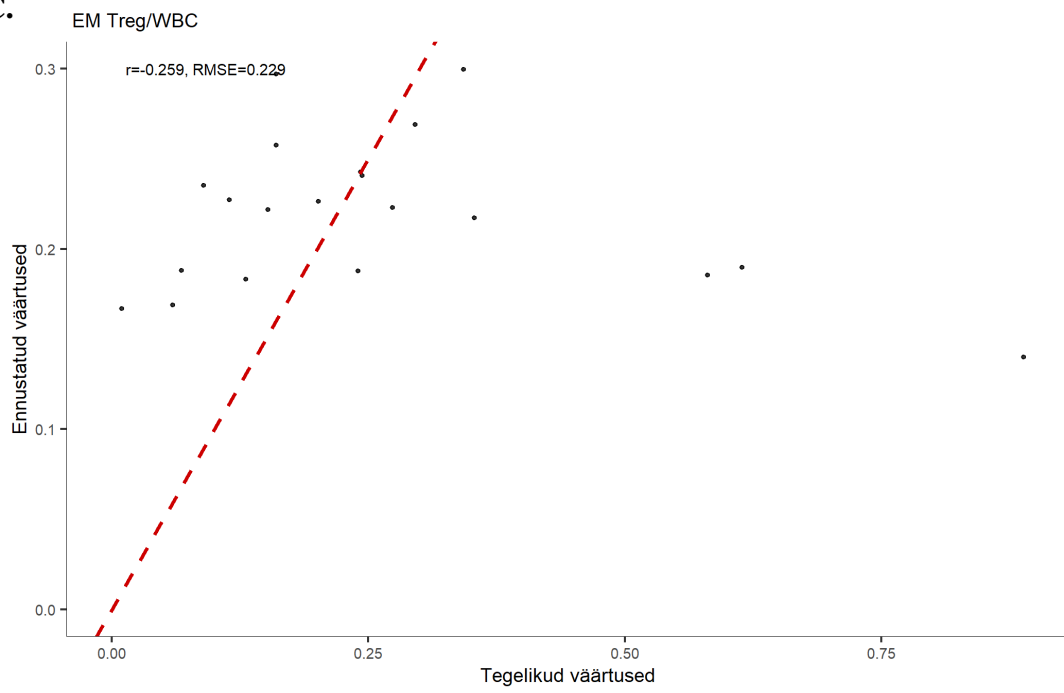
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 0.1403 on 67 degrees of freedom
Multiple R-squared: 0.1259, Adjusted R-squared: 0.09984
F-statistic: 4.826 on 2 and 67 DF, p-value: 0.01101

B.



C.



Lisa 7. CM Treg rakkude mudeli väljund, selles kasutatud CpG saidid ning mudeli töökindlus. A. CM Treg rakkude mudeli väljundi esimeses osas on välja toodud uuritav tunnus ning mudelis kasutatud argumendid. Tabelis „Coefficients“ on kirjas mudeli parameetrid koos statistilise usaldusväärsuse näitajatega. Tulbas „Estimate“ on aga välja toodud argumentide regressioonikordajad. Mudeli statistilist olulisust näitab F-statistik. Determinatsioonikordaja R^2 näitab, kui palju uuritava tunnuse (antud juhul CM rakkude osakaalu) hajuvusest mudel ära kirjeldab. **B.** CM mudelis kasutatud informatiivsemate CpG saitide korrelatsioon CM Treg rakkude osakaaluga. X-teljel on välja toodud uuritav tunnus (EM Treg rakkude osakaal WBC-dest) ning y-teljel mudelis kasutatud CpG saidi asukoht kromosoomis. CpG saitide numeratsioon vastab lisa 3 väljatoodule. Värvikoodiga on eristatud meeste ja naiste CpG saitide metüleerituse korrelatsioonid uuritava tunnusega koos ning eraldi. Kasutatud on Pearsoni korrelatsiooni. **C.** Mudeliga ennustatud EM Treg osakaalude võrdlus WBC-dest tegelike väärtustega. X-teljel on välja toodud tegelikud ning y-teljel ennustatud EM Treg rakkude osakaalu väärtused. Joonisele on märgitud ka kahe uuritava tunnuse korrelatsiooni r ning mudeli RMSE väärtus.

A.

```
Call:
lm(formula = CM_Treg_WBC ~ Sugu + chrX.49114806.49114806.FOXP3.Treg +
    chrX.49117337.49117337.FOXP3.Treg, data = data)
```

Residuals:

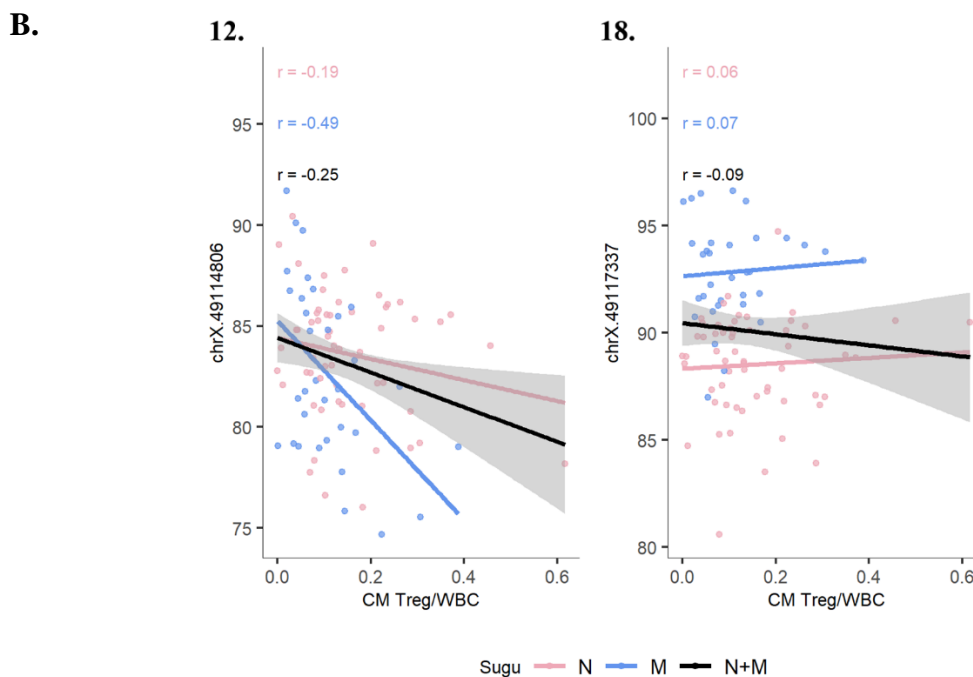
Min	1Q	Median	3Q	Max
-0.17118	-0.05918	-0.02657	0.05694	0.38229

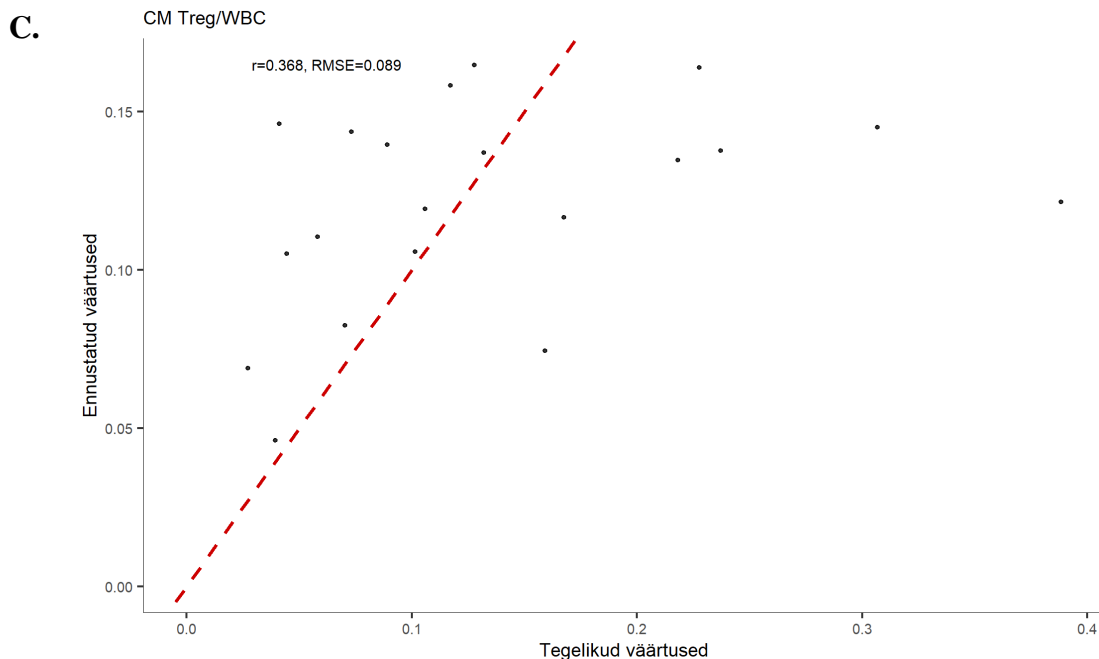
Coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	0.158280	0.540023	0.293	0.77037
SuguN	0.098883	0.036256	2.727	0.00817 **
chrX.49114806.49114806.FOXP3.Treg	-0.009833	0.003652	-2.693	0.00898 **
chrX.49117337.49117337.FOXP3.Treg	0.008241	0.005487	1.502	0.13790

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 0.1054 on 66 degrees of freedom
Multiple R-squared: 0.1642, Adjusted R-squared: 0.1262
F-statistic: 4.321 on 3 and 66 DF, p-value: 0.007653





Lisa 8. RTE Treg rakkude mudeli väljund, selles kasutatud CpG saidid ning mudeli töökindlus. A. RTE Treg rakkude mudeli väljundi esimeses osas on välja toodud uuritav tunnus ning mudelis kasutatud argumendid. Tabelis „Coefficients“ on kirjas mudeli parameetrid koos statistilise usaldusväärsuse näitajatega. Tulbas „Estimate“ on aga välja toodud argumentide regressioonikordajad. Mudeli statistilist olulisust näitab F-statistik. Determinatsioonikordaja R^2 näitab, kui palju uuritava tunnuse (antud juhul RTE Treg rakkude osakaalu) hajuvusest mudel ära kirjeldab. **B.** RTE Treg mudelis kasutatud informatiivsemate CpG saitide korrelatsioon RTE Treg rakkude osakaaluga. X-teljel on välja toodud uuritav tunnus (RTE Treg rakkude osakaal WBC-dest) ning y-teljel mudelis kasutatud CpG saidi asukoht kromosoomis. CpG saitide numeratsioon vastab lisa 3 väljatoodule. Värvikoodiga on eristatud meeste ja naiste CpG saitide metüleerituse korrelatsioonid uuritava tunnusega koos ning eraldi. Kasutatud on Pearsoni korrelatsiooni. **C.** Mudeliga ennustatud RTE Treg osakaalude võrdlus WBC-dest tegelike väärtustega. X-teljel on välja toodud tegelikud ning y-teljel ennustatud RTE Treg rakkude osakaalu väärtused. Joonisele on märgitud ka kahe uuritava tunnuse korrelatsiooni r ning mudeli RMSE väärtus.

A.

```

call:
lm(formula = RTE_Treg_WBC_log ~ Sugu + chr1.1139058.1139058.GITR.Treg +
  chr2.204737686.204737686.CTLA4.Treg + chrX.49114509.49114509.FOXP3.Treg +
  chrX.49114806.49114806.FOXP3.Treg + chrX.49117337.49117337.FOXP3.Treg,
  data = data)

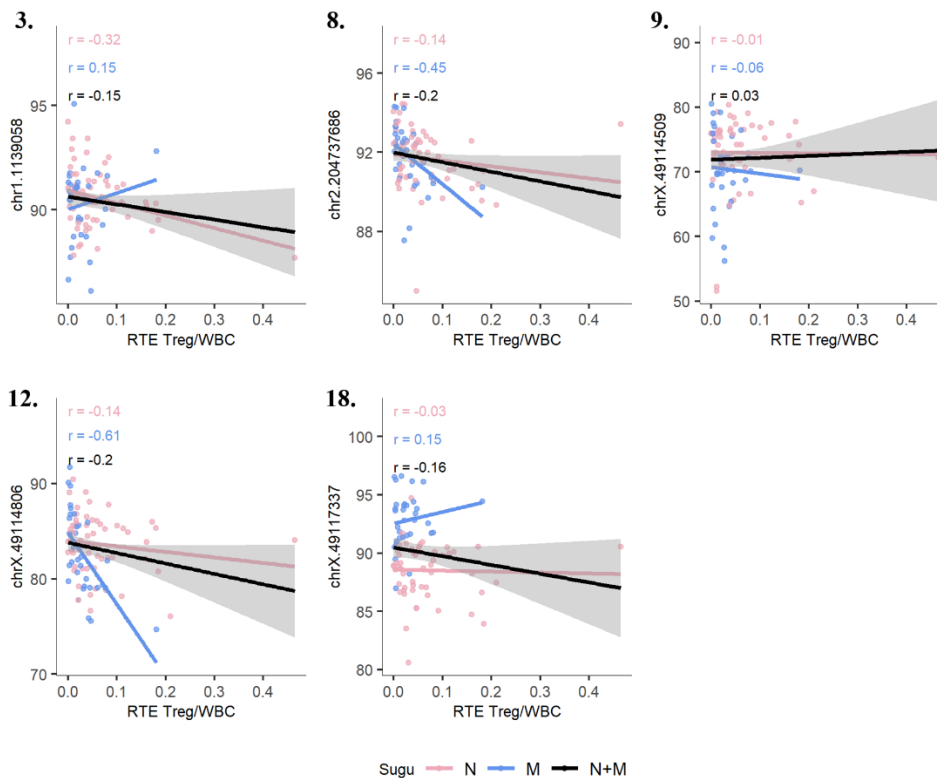
Residuals:
    Min       1Q   Median       3Q      Max
-1.83664 -0.54382 -0.04753  0.66429  2.39328

Coefficients:
                Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept)      29.60260    11.04616   2.680  0.00939 **
SuguN             1.25294     0.34621   3.619  0.00059 ***
chr1.1139058.1139058.GITR.Treg
-0.14991     0.08344  -1.797  0.07718 .
chr2.204737686.204737686.CTLA4.Treg
-0.24197     0.08180  -2.958  0.00435 **
chrX.49114509.49114509.FOXP3.Treg
 0.03985     0.02525   1.578  0.11954
chrX.49114806.49114806.FOXP3.Treg
-0.10043     0.04009  -2.505  0.01484 *
chrX.49117337.49117337.FOXP3.Treg
 0.08064     0.05528   1.459  0.14956
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

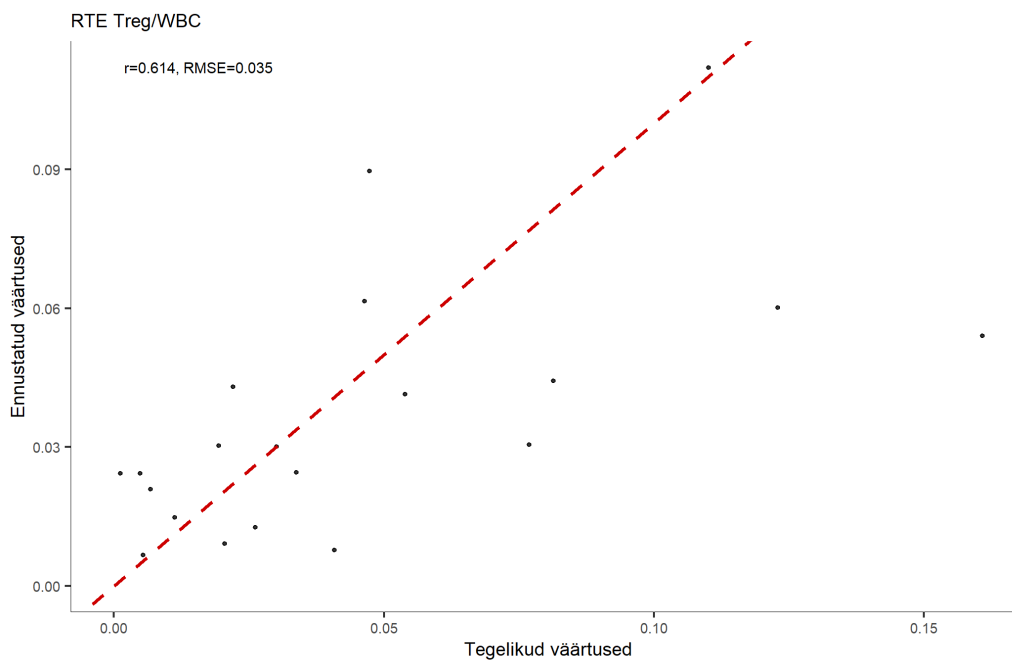
Residual standard error: 0.9926 on 63 degrees of freedom
Multiple R-squared:  0.3828, Adjusted R-squared:  0.324
F-statistic: 6.513 on 6 and 63 DF, p-value: 2.203e-05

```

B.



C.



LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Anella Salmistu,

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

„DNA metülatsioonipõhine CD4⁺ reguleerivate T-rakkude analüüs“,

mille juhendajad on Liina Tserel ja Ahto Salumets,

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

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Anella Salmistu

30.05.2022