

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOGIA INSTITUUT

TARTU ÜLIKOOL  
ARSTITEADUSKOND  
BIOMEDITSIINI INSTITUUT  
MOLEKULAARPATOLOOGIA UURIMISRÜHM

Rudolf Bichele

**RANKL poolt indutseeritud transkriptsioonifaktorite  
tuvastamine tüümuse epiteelis**

Magistritöö

Juhendajad  
PhD Martti Laan  
MSc Sulev Kuuse

TARTU 2013

# Sisukord

Sisukord .....	2
Kasutatud lühendid .....	3
Sissejuhatus .....	5
Kirjanduse ülevaade .....	6
Tuumus .....	6
Tümotsüütide positiivne ja negatiivne selektsioon.....	7
Tuumuse säsi epiteel.....	7
TNF perekonna signalseerimise roll tuumuses.....	9
TNFR signalseerimine.....	10
LT $\beta$ R signalseerimine .....	10
CD40-CD40L signalseerimine .....	11
RANK-RANKL signalseerimine.....	12
Eksperimentaalne osa .....	14
Töö eesmärgid .....	14
Materjalid ja meetodika.....	15
Hiired .....	15
Loote tuumuse organkultuur (FTOC).....	15
Stimulatsioonid TNFSF ligandidega .....	15
Epiteelirakkude sortimine .....	16
RNA eraldamine ja cDNA süntees .....	16
Mikrokiibi analüüs.....	17
Kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon .....	17
Immunofluorestsents mikroskoopia .....	18
Antikehad.....	19
Tulemuste analüüs .....	19
Tulemused .....	20
Stimulatsioonide poolt reguleeritud geenide ekspressioonimustri kirjeldamine .....	20
RANKL poolt spetsiifiliselt indutseeritud geenide tuvastamine .....	23
<i>Cdx1</i> , <i>Insm1</i> ja <i>Utf1</i> ekspressioonimustri kirjeldamine tuumuses.....	29
Arutelu .....	33
Kokkuvõte .....	36
Summary.....	37
Kasutatud kirjandus .....	38

# Kasutatud lühendid

2-DG – 2'-deoksüguanosiin

$\alpha$ LT $\beta$ R – lümfotoksiin beeta retseptori vastane antikeha

AIRE – autoimmuunregulaator (*autoimmune regulator*)

APECED – *autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy*

CCL – C-C motiivi sisaldav kemoliin

CCR – C-C motiivi sisaldava(te) kemoliini(de) retseptor

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

CD40L – CD40 ligand

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

cDNA – komplementaarne DNA (*complementary DNA*)

CK-8 – tsütokeratiin 8 (*cytokeratin 8*)

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

CXCL – C-X-C motiivi sisaldav kemokiin

DAPI – 4',6-diamidino-2-fenüülindool

DETC – dendriitsed epidermaalsed T-rakud (*dendritic epidermal T-cells*)

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

dNTP – desoksüribonukleotiid trifosfaat (*deoxyribonucleotide triphosphate*)

DTT – ditiotreitol (*dithiothreitol*)

EpCAM – epiteelirakkude adhesioonimolekul (*epithelial cell adhesion molecule*)

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

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

HVEM – Herpes simplex viiruse sisenemise mediaator (*Herpes simplex virus entry mediator*)

I $\kappa$ B – kappa-B inhibiitor (*inhibitor of kappa B*)

IKK – I $\kappa$ B kinaas (*I $\kappa$ B kinase*)

KO – *knock out*

LIGHT – „*is homologous to Lymphotoxins, exhibits Inducible expression, and competes with HSV Glycoprotein D for HVEM, a receptor expressed by T-lymphocytes“*

LT $\alpha$  – lümfotoksiin alfa (*lymphotoxin alpha*)

LT $\beta$  – lümfotoksiin beeta (*lymphotoxin beta*)

LTi – lümfoidkoe indutseerija (*lymphoid tissue inducer*)

LT $\beta$ R – lümfotoksiin beeta retseptor (*lymphotoxin beta receptor*)  
MAPK – mitogeeni poolt aktiveeritud valgu kinaas (*mitogen-activated protein kinase*)  
MHC – peamine koosobivuskompleks (*major histocompatibility complex*)  
mTEC – tüümuse säsi epiteelirakk (*medullary thymic epithelial cell*)  
NF- $\kappa$ B – tuumafaktor kapp-B (*nuclear factor kappa-B*)  
NGS – tavaline kitse seerum (*normal goat serum*)  
NIK – tuumafaktor kapp-B indutseeriv kinaas (*NF- $\kappa$ B inducing kinase*)  
qPCR – kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon (*quantitative polymerase chain reaction*)  
RANK – NF- $\kappa$ B retseptori aktivaator (*receptor activator of NF- $\kappa$ B*)  
RANKL – NF- $\kappa$ B retseptori aktivaatori ligand (*receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand*)  
TCR – T-raku retseptor (*T-cell receptor*)  
TNF – tuumori nekroosi faktor (*tumor necrosis factor*)  
TNFR – tuumori nekroosi faktori retseptor (*tumor necrosis factor receptor*)  
TRAF6 – TNF retseptoriga seonduv faktor 6 (*TNF receptor associated factor 6*)  
TSA – koospetsiifiline antigeen (*tissue-specific antigen*)  
UEA1 – Ulex Europeus Agglutinin-1

# Sissejuhatus

Tuumuses leiab aset T-lümfotsüütide küpsemine, mis on aluseks organismi omandatud immuunsüsteemile. Küpsed T-lümfotsüüdid peavad olema võimelised eristama kehaomaseid valke võõrvalkudest ja häired tuumuse talitluses võivad endaga kaasa tuua immuunpuudulikkuse ja autoimmuunhaigusi. Selle tõttu on oluline selgitada välja mehhanismid, mis reguleerivad tuumuses T-rakkude arengut.

T-rakkude võime eristada kehaomaseid valke võõrastest sõltub tuumuse epiteelist, kus teatud säsi rakud (mTECid) suudavad ekspresseerida ning enda pinnal presenteerida arenevatele T-lümfotsüütidele ehk tümotsüütidele tuhandeid valke, mis tavaoludes avalduvad ainult kindlates kudedes. Samuti ekspresseeritakse erinevate tuumuse rakkude poolt kemokiine – väikseid signaalmolekule, mis reguleerivad tümotsüütide migratsiooni tuumuses. Osates neid protsesse manipuleerida, muutuks võimalikuks immuunsüsteemi regulatsioon mitmel seni saavutamatul tasandil.

Praeguseks on näidatud (Akiyama jt., 2006), et tuumuse epiteelis mängib geeniekspressiooni reguleerimises olulist rolli signaliseerimine läbi tuumori nekroosi faktori (TNF) perekonna retseptorite RANK (NF- $\kappa$ B retseptori aktivaator), LT $\beta$ R (lümfotoksiin beeta retseptor), TNFR (tuumori nekroosi faktori retseptor) ja CD40. Samas on informatsioon nende poolt aktiveeritud geenide kohta puudulik ja teadmised sellest, millisel moel nad reguleerivad tuumuse epiteeli küpsemist, on lünklikud.

Antud töös kasutatakse autori poolt bakalaureusetöö raames väljatöötatud ja valideeritud fetaalse tuumuse organkultuuri (FTOC) mudelsüsteemi, mida saab efektiivselt kasutada tuumuse uurimiseks *ex vivo* tingimustes. FTOC võimaldab füsioloogilistele tingimustele lähedases olukorras katsetada spetsiifiliste molekulaarsete signaalide toimet tuumuse epiteelile ning uurida nende poolt indutseeritud spetsiifilist geeniekspressiooni mustrit.

Käesoleva töö eesmärkideks on läbi viia tuumuse organkultuuride stimulatsioon erinevate TNF perekonna retseptorite aktivaatoritega ja tuvastada nende poolt reguleeritud geenid kogu genoomi ulatuses. Kuna eelnevad uuringud annavad alust arvata, et kõige olulisemat rolli küpse tuumuse epiteeli tekkes omab RANK signaliseerimine, on meie siht leida uusi spetsiifiliselt RANK ligandi poolt indutseeritud transkriptsioonifaktoreid, mis võiksid reguleerida mTECide geeniekspressiooni ja selle läbi T-rakkude küpsemist.

# Kirjanduse ülevaade

## Tüümus

Tüümus on üks tsentraalsetest lümfoïdorganitest omandatud immuunsüsteemis, kus toimub T-lümfootsüütide areng ja küpsemine luuüdi päritoluga vereloome eellasrakkudest küpsete T-rakkudeni, mis väljuvad perifeersesse vereringesse.

Korrektne T-rakkude areng tüümuses vajab nii hematopoeetiliste rakkude (sh dendriitrakud ja makrofaagid) kui ka mitte-hematopoeetiliste stroomarakkude poolt moodustatud spetsiifilist keskkonda. Selle keskkonna loomisel on asendamatuks osaks tüümuse epiteeli rakud, mis jagatakse vastavalt nende paiknemisele koore (cTEC – koore epiteelirakk, *cortical epithelial cells*) ja säsi epiteeliks (mTEC – säsi epiteelirakk, *medullary thymic epithelial cells*). Samuti on T-rakkude arenguks vajalik migratsioon tüümuse sisse, selle erinevatesse kompartmentidesse ja lõpuks väljumine perifeersesse vereringesse. Neid protsesse koordineerivad väga suures osas kemokiinid – väikesed rakkude poolt sekreteeritavad tsütokiinid.

Lümfootsüütide eellasrakud sisenevad tüümusesse koore ja säsi piiril kortikomedullaarses tsoonis (Lind jt., 2001), mida vahendavad embrüonaalses eas kemokiinid CCL21 ja CCL25 ning nende vastavad retseptorid CCR7 ja CCR9 (Bleul ja Boehm, 2000; Liu jt., 2005; Wurbel jt., 2001). Kuigi sünnijärgses eas on kemokiinide roll tüümuse koloniseerimises lümfoïdsete prekursorite poolt mõnevõrra ebaselge, on näidatud, et vähemalt osaliselt on see reguleeritud tüümuse endoteeli poolt ekspresseeritava P-selektiini ja selle ligandi PSGL-1 poolt (Rossi jt., 2005).

Tüümusesse sisenenud eellasrakud peavad edasi läbima rea fenotüübilisi muutusi ning mitmed selektsiooni etapid enne väljumist perifeersesse vereringesse.

## **Tümotsüütide positiivne ja negatiivne selektsioon**

Tümotsüütide esialgne areng ja selektsioon toimub tüümuse kooses, kus nad peavad omandama funktsionaalse T-raku retseptori (TCR – T-raku retseptor, *T-cell receptor*), millele järgneb nende positiivne selektsioon. Positiivse selektsiooni käigus toimuvad interaktsioonid värskete tümotsüütide T-raku retseptorite ja stroomarakkude vahel (näiteks cTECid ja dendriittrakud), mis presenteerivad enda pinnal peptiidide kompleksis peamise koesobivuskompleksiga (MHC – peamine koesobivuskompleks, *major histocompatibility complex*). Kui TCR seob peptiid-MHC kompleksi kas või nõrga aviidsusega, saavad tümotsüüdid vajalikud signaalid ellujäämiseks ja edasiseks diferentseerumiseks. Kui nende TCR ei tunne ära ega suuda siduda MHC ja peptiidide kompleksi, lähevad tümotsüüdid apoptoosi (Boehmer jt., 2003).

Positiivse selektsiooni läbinud T-rakud liiguvad koorest CCR7 signaalide mõjul edasi tüümuse säsisse (Ueno jt., 2004), kus toimub nende negatiivne selektsioon. Kui positiivse selektsiooni eesmärk on välja valida T-rakud, mille TCR on üldise võimeline ära tundma peamise koesobivuskompleksi molekule ja läbi selle osalema immuunvastuse vahendamises, siis negatiivse selektsiooni käigus on vaja kõrvaldada need tümotsüüdid, mille T-raku retseptorid tunnevad kõrge aviidsusega ära kehaomaste peptiidide kompleksi MHC molekulidega. Korrektne negatiivne selektsioon on vajalik, et vältida autoimmuunsuse teket – olukorda, kus organism läkitab immuunvastuse omaenda kudede suunas.

## **Tüümuse säsi epiteel**

Negatiivses selektsioonis on asendamatud tüümuse säsi epiteelirakud, kus ekspresseeritakse avatud geeniekspressiooni käigus suurt hulka organismile omaseid antigene, mida tavaoludes transkribeeritakse koespetsiifiliselt (TSA – koespetsiifilised antigeenid, *tissue specific antigens*), näiteks insuliin ning kaseiinid (Kyewski ja Klein, 2006). Suur osa TSAde ekspressioonist küpsetes mTECides on transkriptsioonifaktori AIRE (autoimmuunregulaator, *autoimmune regulator*) kontrolli all (Anderson jt., 2002). Huvitaval kombel on samuti AIRE poolt reguleeritud mitmete kemokiinide ekspressioon tüümuses (Laan jt., 2009), mis annab alust arvata, et AIRE osaleb üldisemas mTECi küpsemise programmis ja tüümuse homöostaasis, lisaks otsesele avatud geeniekspressiooni reguleerimisele.

Defektid *AIRE* geenis väljenduvad inimestel harvaesineva haiguse APECED (*autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy*) kujul (Nagamine jt., 1997; Finnish-German APECED Consortium, 1997). Haigust iseloomustab tugev autoimmuunreaktsioon organismi endokriinsete, neuroendokriinsete ja vahel ektodermaalsete kudede vastu. Tüüpilisteks autoimmuunreaktsiooni märklaudadeks on kilpnääre, kõrvakilpnäärmed, pankrease  $\beta$ -rakud, gonaadid, neerupealiste koor ja mao parietaalrakud (Perheentupa, 2006). Samuti esinevad patsientidel nii organspetsiifilised (Alimohammadi jt., 2008; Betterle jt., 2002; Reimand jt., 2008) kui ka tsütokiinide vastased autoantikehad (Meager jt., 2006; Kisand jt., 2010; Puel jt., 2010). APECEDi uurimiseks kasutatakse mudelorganismidena mitut *Aire* KO hiirte liini, kellest kõigil esinevad mingil määral viljatus, autoimmuunsed infiltraadid kudedes ning autoantikehad vereringes, kuid kelle fenotüüp on siiski märgatavalt leebem, kui APECED patsientidel (Hubert jt., 2009).

Tuumuse säsi epiteel on heterogeenne ja koosneb erinevas küpsusastmes olevatest rakkudest. On näidatud, et tuumuses leidub väike hulk epiteeli tüvirakke, mis tõenäoliselt vastutavad epiteelirakkude uuenemise eest (Bonfanti jt., 2010). Epiteelirakkude geeniekspressiooni muster muutub oluliselt küpsemise käigus, mis võimaldab erinevas küpsusastmes rakke kergesti tuvastada. Säsi epiteelile on näiteks omane epiteelirakkude adhesioonimolekuli EpCAM (*epithelial cell adhesion molecule*) kõrge ekspressioon (Nelson jt., 1996), seevastu koore epiteeli markerina kasutatakse pinnavalku Ly51 (Gray jt., 2006). Küpsel säsi epiteelil on mitmeid funktsioonist lähtuvaid markereid, mida on võimalik kasutada nende rakkude tuvastamiseks. Kuna selles staadiumis toimub avatud geeniekspressioon, millest suur osa on *AIRE* kontrolli all (Derbinski jt., 2005), saab seda väga efektiivselt kasutada küpsete mTECide tuvastamiseks. Samuti kasutatakse aglutiniini UEA1 (*Ulex Europaeus Agglutinin-1*), millega on võimalik selektiivselt märgistada küpseid mTECe (Hamazaki jt., 2007). Nii koore kui säsi epiteeli pinnal ekspresseeritakse MHC klass II molekule, kuid küpsete rakkude pinnal on selle ekspressiooni tase oluliselt kõrgem (Gray jt., 2006). Lisaks sellele eristatakse mTECide hilist küpsusfaasi, kus me oleme näidanud, et ei toimu enam avatud geeniekspressiooni ning mille käigus hakkavad rakud ekspresseerima mitmeid keratinotsüütidele omaseid valke ja mida seostatakse Hassali kehade tekkega tuumuses (Wang jt., 2012).

Tuumuse epiteeli küpsemise uurimine on seotud mitmete takistustega. mTECid vajavad siiani arusaamatutel põhjustel tavapärase geeniekspressioonimustri talletamiseks keerukat kolmemõõtmelist keskkonda. Selle tõttu ei anna tuumuse epiteeli rakuliinidega tehtud uuringud palju informatsiooni füsioloogilistes tingimustes toimuvate protsesside kohta, mille pärast



kasutame me oma töös selle asemel hiire fetaalse tüümuse organkultuuri (FTOC – *fetal thymic organ culture*) tehnoloogiat. FTOC seisneb loote tüümuse eemaldamises ja kasvatamises *ex vivo* tingimustes. Selle kaudu säilib tüümuse keerukas kolmemõõtmeline struktuur ja mTECide normaalne geeniekspressiooni muster, kuid samaaegselt võimaldab see laboritingimustes kerge vaevaga manipuleerida tüümuse koega. Autori bakalaureusetöös on eelnevalt seda süsteemi ekstensiivselt valideeritud ning näidatud, et tegu on väga hea mudeliga mTECide küpsemise regulatsiooni uurimiseks.

Kuna negatiivne seleksioon tüümuses sõltub täielikult küpsetest mTECidest, on viimastel aastatel aktiivselt uuritud signaale, mis indutseerivad tüümuse epiteeli küpsemist ja funktsioneerimist. See looks võimaluse kunstlikult reguleerida tüümuse epiteeli küpsemist ja selle kaudu kaudselt reguleerida immuunsüsteemi.

### **TNF perekonna signaliseerimise roll tüümuses**

Tuumori nekroosi faktori perekonnas (TNFSF – *tumor necrosis factor superfamily*) tuntakse 29 retseptorit ja 19 ligandi, mis omavad organismis rohkearvuliselt erinevaid funktsioone. TNF perekonna ligandide seostumine nende retseptoritega võib vallandada rakkudes mitmeid protsesse näiteks jagunemist, diferentseerumist ja apoptoosi, kuid eranditult kõik TNF perekonna ligandid soodustavad mingites tingimustes põletiku teket (Aggarwal jt., 2012). Mitmed TNF perekonna retseptorid (TNFRSF - *tumor necrosis factor receptor superfamily*) aktiveerivad NF- $\kappa$ B (tuumafaktor kappaB, *nuclear factor kappaB*) perekonna transkriptsioonifaktoreid, indutseerides selle kaudu rakkude vastust TNF signaalidele (Vallabhapurapu ja Karin, 2009).

Eristatakse kahte NF- $\kappa$ B rada – klassikaline ja alternatiivne. Klassikalise raja indutseerimise tulemusena liigub tuuma RelA või c-Rel kompleks läbi I $\kappa$ B kinaasi (IKK) aktiveerumise ja fosforüleerimise, samas kui alternatiivse raja aktiveerimine toob kaasa RelB liikumise tuuma, mis eeldab IKK $\alpha$  fosforüleerimist NF- $\kappa$ B indutseeriva kinaasi (NIK) poolt (Hayden ja Ghosh, 2004). Aktiveeritud NF- $\kappa$ B seostub tuumas spetsiifilistele järjestustele geenide promotori või enhanseri alas ja aktiveerib selle kaudu märklaudgeenide transkriptsiooni.

Mitmed uuringud on näidanud, et TNF perekonna retseptorite RANK (NF- $\kappa$ B retseptori aktivaator, *receptor activator of NF- $\kappa$ B*), CD40, TNFR (tuumori nekroosi faktori retseptor, *tumor necrosis factor receptor*) ja LT $\beta$ R (lümfootoksiin beeta retseptor, *lymphotoxin beta receptor*)

signaalid on vajalikud tuumuse arenguks ja funktsioneerimiseks ning järgnevalt käsitletakse neid pikemalt.

### TNFR signaliseerimine

TNFR1 ligand TNF $\alpha$  on ennekõike uuritud kui põletikulisi protsesse indutseeriv ja reguleeriv tsütokiin ja TNF $\alpha$  rolli tuumuses on uuritud minimaalselt.

TNFR1 KO hiirel on tümotsüütide areng ja lümfotsüütide populatsioonid muutumatud võrreldes metsiktüüpi hiirega ja autoreaktiivsete T-lümfotsüütide elimineerimine tuumuses toimub normaalselt (Pfeffer jt., 1993). Huvitaval kombel näitab aga üks hiljutine uuring, et TNF $\alpha$  KO hiirtel on tuumuses mõnevõrra kõrgenenud *Aire* ja mitmete autoantigeenide, näiteks insuliin 2 (*Ins2*), ekspressiooni tase (Levi ja Polychronakos, 2013), kuid praegu on teadmata, kas tegu on otsese või kaudse efektiga tuumuse epiteelile. Seoses sellega oleks oluline uurida TNF $\alpha$  toimet tuumuse kemokiinide ekspressioonile, kuna TNF $\alpha$  omab olulist rolli kemokiinide ekspressioonis põletiku olukorras (Roach jt., 2002).

Erinevalt teistest siin töös käsitletud TNF perekonna retseptoritest aktiveerib TNF $\alpha$  seostumine TNFR1 retseptorile ainult klassikalise NF- $\kappa$ B raja (Karin, 1999). See annab alust arvata, et TNF $\alpha$  reguleerib tuumuse funktsioneerimist mõnevõrra teiste mehhanismide kaudu kui RANK, LT $\beta$ R ja CD40.

### LT $\beta$ R signaliseerimine

Signaliseerimine läbi lümfotoksiin beeta retseptori (LT $\beta$ R) on vajalik eeskätt sekundaarsete lümfoïdkudede arenguks (Randall jt., 2008), kuid kasvav arv uuringuid on lisaks näidanud LT $\beta$ R tähtsust korrektse tuumuse organogeneesis. LT $\beta$  retseptorile on praeguseks kirjeldatud kaks ligandi: heterotrimeeri LT $\alpha$ 1 $\beta$ 2 (koosneb ühest lümfotoksiin  $\alpha$  ja kahest LT $\beta$  subühikust) ning LIGHT homotrimeeri (Browning jt., 1993; Zhai jt., 1998), mille kaudu käib nii klassikalise kui alternatiivse NF- $\kappa$ B raja aktivatsioon (Schneider jt., 2004; Dejardin jt., 2002). LIGHT omab ka teist retseptorit, HVEM (*Herpes simplex virus entry mediator*), mille kaudu käib klassikalise NF- $\kappa$ B raja aktivatsioon.

Puuduliku LT $\beta$ R signaliseerimisega hiirtel on häiritud tuumuse struktuur ja vähenenud mTEC' de hulk. On mainimist väärt, et LT $\beta$ R KO hiire fenotüüp on tugevam kui LT $\beta$ <sup>-/-</sup>LIGHT<sup>-/-</sup>

hiirel, mis viitab sellele, et seni tundmatu signaal on osaliselt võimeline kompenseerima  $LT\beta$  ja LIGHT puudulikkust tüümuses (Boehm jt., 2003).  $LT\beta R$  signaliseerimisele on omistatud pigem kaudne roll tüümuse epiteeli küpsemises. Näiteks on  $LT\beta R$  puudulike hiirte ebanormaalne tüümuse struktuur osaliselt seletatav asjaoluga, et  $LT\beta R$  reguleerib tüümuses kemokiini CCL19 ekspressiooni (Seach jt., 2008), mille puudumisel on häiritud positiivse selektsiooni läbinud tümotsüütide migreerumine tüümuse koorest säsisse (Ueno jt., 2004). Selle tulemusena ei toimu tüümuses vajalikku rakkudevahelist signaalide ülekannet arenevate T-lümfotsüütide ja säsi epiteeli rakkude vahel. Samuti on näidatud, et signaliseerimine läbi  $LT\beta R$  indutseerib tüümuse säsi epiteelis RANK ekspressiooni (Mouri jt., 2011), millel on omakorda näidatud otsene roll mTEC' de küpsemise regulatsioonis.

### CD40-CD40L signaliseerimine

CD40-CD40L signaliseerimine on leidnud kajastust eeskätt oma rollis omandatud immuunvastuse regulatsioonis, kus see vastutab B-rakkude, makrofaagide ja dendriitrakkude aktivatsiooni eest (Elgueta jt., 2009). Samas on mitmed uuringud näidanud CD40 ja CD40L rolli ka tüümuse epiteeli arengu regulatsioonis.

Nii CD40 kui CD40L KO hiirtel on vähenenud mTEC' de arv (Akiyama jt., 2008), samas kui CD40L üleekspressioon toob kaasa märkimisväärse tüümuse koore osa vähenemise ja selle arvelt säsi suhtelise suurenemise. Kuigi CD40L KO hiirtel on tüümuses vähem mTEC'e, on säsi struktuur histoloogiliselt normaalne (Dunn jt., 1997), mis on andnud alust arvata, et CD40 ja CD40L omavad tüümuses pigem epiteeli küpsemist toetavat funktsiooni ja tegu ei ole võtmesignaaliga tüümuse arengus. Seda toetab ka asjaolu, et kuigi CD40 ekspresseeritakse hiire tüümuses juba varajases embrüonaalses eas, muutub CD40 ligand tuvastatavaks alles tiinuse lõppfaasides, kõige varem 17 tiinuspäeval, jõudes platoole pärast sündi. See omakorda viitab, et CD40-CD40L signaliseerimine omandab tähtsuse alles sünnijärgselt. Näiteks on demonstreeritud, et CD40-CD40L signaliseerimine võib pärast sündi osaliselt kompenseerida RANK/RANKL puudulikkusest tingitud defekte mTECide arengus (Desanti jt., 2012). Kuna ka CD40 kaudu signaliseerimine aktiveerib nii klassikalist kui alternatiivset NF- $\kappa$ B rada (Coope jt., 2002), on tõenäoline, et nende signaalide poolt reguleeritud geenid võivad osaliselt kokku langeda. Samuti on hiljuti näidatud, et CD40 ekspressioon on vähemalt osaliselt RANK signaliseerimise kontrolli all (Desanti jt., 2012).

Vastupidiselt RANK-RANKL signalseerimisele on CD40-CD40L seostatud eeskätt MHC klass II madalalt ekspresseerivate (MHC II<sup>low</sup>) mTEC populatsiooni arenguga, millele viitab vähenenud MHC II<sup>low</sup> epiteeli hulk CD40L KO hiirtel (Gray jt., 2006; Akiyama jt., 2008).

### RANK-RANKL signalseerimine

NF- $\kappa$ B retseptori aktivaator (RANK, *receptor activator of NF- $\kappa$ B*) ja selle ligand RANKL reguleerivad mitmete organite arengut ning funktsioneerimist. Kuna RANK puudulikkusega (RANK KO) hiirtel esineb raskekujuline osteoporoos (Dougall jt., 1999), on paljud uuringud keskendunud selle raja funktsioonidele luukoe morfogeneesis läbi tema toime osteoklastide arengule. Nende uuringute tulemusena on praeguseks välja töötatud RANKL neutraliseerivate antikehade teraapia, mida rakendatakse kliiniliselt muuhulgas osteoporoosi ja reumatoidse artriidi ravis (Romas, 2009).

Immuunsüsteemis seisneb RANK-RANKL signalseerimise olulisus eeskätt nii primaarsete kui sekundaarsete lümfoidsete organite arengu ja talitluse regulatsioonis. RANK ja RANKL KO hiirtel ei arene lümfisõlmi (Kong jt., 1999; Dougall jt., 1999), mida on seostatud lümfoidkoe indutseerija rakkude (LTi – *lymphoid tissue inducer cells*) drastiliselt langenud võimega koloniseerida piirkondi, kus peaksid hakkama arenema lümfisõlmed (LTi rakkudelt saadavad signaalid on vajalikud varajases lümfisõlmede arengus) (Kim jt., 2000). Kuigi samadelt rakkudelt saadavate signaalide olulisust on näidatud ka tüümuse organogeneesis (Rossi jt., 2007), areneb RANKL KO hiirtel siiski tüümus. Tüümuses on RANK detekteeritav nii embrüonaalses eas kui ka sünnijärgselt (Akiyama jt., 2008) ja mitmed hiljutised tööd on näidanud, et RANK-RANKL signalseerimine on spetsiifiliselt vajalik tüümuse säsi epiteeli arengus, eeskätt just küpsete mTEC'de tekkeks (Rossi jt., 2007; Akiyama jt., 2008; Hikosaka jt., 2008).

Nii RANK kui RANKL KO hiirtel on tüümus oluliselt väiksem kui metsiktüüpi pesakonnakaaslastel (Kong jt., 1999; Dougall jt., 1999), kus kõige olulisemaks erinevuseks tüümuse rakulises koostises on küpsete mTEC'de arvu märkimisväärne langus. Embrüonaalses eas puuduvad küpsed mTEC'id täielikult, kuid sünnijärgselt areneb siiski väike hulk Aire<sup>+</sup> epiteeli rakke, mille põhjuseks peetakse RANKL signaali puudumise osalist kompensatsiooni CD40-CD40L signaalide poolt. Edasist kinnitust sellele teooriale pakub asjaolu, et hiirtel, kellel puuduvad nii funktsionaalne RANKL kui ka CD40 (RANKL<sup>-/-</sup>CD40<sup>-/-</sup>), puuduvad küpsed mTEC'id täielikult ning nende tüümuse morfoloogia on tugevalt häiritud.

RANK puudumine tuumuses on võimeline indutseerima autoimmuunsust, mida on näidatud põletikuliste infiltraatide ja autoantikehade tekkega immuunpuudulikus hiires, kellele on siirdatud RANK KO hiire tuumus. See autoimmuunne fenotüüp on oluliselt tugevam RANKL<sup>-/-</sup> CD40<sup>-/-</sup> hiire tuumuse puhul, mis annab edasist kinnitust nende signaalide koostööle normaalse tuumuse funktsiooni tagamisel sünnijärgses eas (Akiyama jt., 2008).

Tuumuses saab epiteel RANKL signaali mitmetelt erinevatelt rakutüüpidelt ja nende rakkude vahetamine muutub olulisel määral erinevates arenguetappides. Embrüonaalses arengus on näidatud, et esimestena pakuvad arenevale epiteelile RANKL signaali L<sub>Ti</sub> rakud, mis lokaliseeruvad areneva tuumuse piirkonda (Rossi jt., 2007). Ühe hiljutise uuringu kohaselt ekspresseerivad embrüonaalses tuumuses RANKL ka  $\gamma\delta$  T-rakkude hulka kuuluvad dendriitsed epidermaalsed T-rakud (DETC – dendritic epidermal T-cells) (Roberts jt., 2012). Seevastu hilisemates arenguetappides tuleb põhiosa RANKL signaalist tõenäoliselt positiivse selektsiooni läbinud tükotsüütidelt ning  $\gamma\delta$  T-rakke ega L<sub>Ti</sub> rakke ei ole otseselt vaja sünnijärgses eas tuumuse säsi kujunemiseks (Hikosaka jt., 2008).

Rakus aktiveerib RANK-RANKL interaktsioon NF- $\kappa$ B ja MAPK (Mitogeen-aktiveeritud proteiini kinaas, *Mitogen-activated protein kinase*) signaalirajad, millest esimene on mTECide arengus peamise tähtsusega. Samuti aktiveeritakse negatiivne tagasisidemehhanism, mille käigus sünteesitakse OPG (*Osteoprotegerin*), mis töötab RANKL „libaretseptorina“ (Aoki jt., 2010). RANK signaliseerimine aktiveerib nii klassikalise kui alternatiivse NF- $\kappa$ B raja (Novack jt., 2003) ja kuigi nii mTEC’de kui osteoklastide diferentseerumises on RANK-RANKL interaktsioonid üliolulised, on klassikalise ja alternatiivse NF- $\kappa$ B raja rollid nendes rakkudes selgelt erinevad. Näiteks hiirtel, kellel on defektid alternatiivses NF- $\kappa$ B rajas (RelB KO ja *aly / aly* hiir, kellel on rikitud NIK funktsioon läbi ühe punktmutatsiooni), on osteoklastide teke ja areng normaalne või minimaalselt häiritud (Novack jt., 2003). Samas puuduvad nendel hiirtel täielikult mTECid, mis viitab alternatiivse NF- $\kappa$ B raja asendamatusel mTEC’de diferentseerumises (Burkly jt., 1995; Kajiura jt., 2004). Klassikalise raja tähtsusele viitab asjaolu, et TRAF6 (Tuumori nekroosi faktori retseptoriga seostuv faktor 6, *tumor necrosis factor receptor-associated factor 6*) puudulikel hiirtel, kellel on rikitud klassikalise NF- $\kappa$ B raja aktivatsioon, esinevad defektid tuumuse struktuuris ning samuti puuduvad küpsed mTECid (Akiyama jt., 2005).

Samas on siiani ebaselge, milline funktsioon on erinevatel NF- $\kappa$ B radadel mTECi küpsemise ja korrektse talitluse seisukohast oluliste geenide ekspressioonis. On väga vähe uuritud, millised geenid on spetsiifiliselt reguleeritud RANK signaliseerimise poolt ning mis on nende funktsioon tuumuses.

# Eksperimentaalne osa

## *Töö eesmärgid*

Kuigi praeguseks on osaliselt teada molekulaarsed signaalid, mis reguleerivad tüümuse organogeneesi ja talitlust, on selles valdkonnas endiselt väga palju vastamata küsimusi. Käesolevas töös keskendume me tüümuse epiteelile nende rakkude tsentraalse rolli tõttu normaalse T-rakulise immuunsuse kujunemisel. Tüümuse epiteeli küpsemise seisukohast on näidatud mitmete TNF perekonna ligandide ja retseptorite olulisust, millest kõige tähtsamaks peetakse RANK-RANKL signaliseerimist, kuid teadmised nende signaalradade poolt reguleeritud geenidest on väga puudulikud. Oma tööga soovime me aidata paremini mõista mehhanisme, läbi mille käib nende unikaalsete rakkude küpsemise regulatsioon.

Käesoleva töö konkreetseteks eesmärkideks oli:

- Viia läbi stimulatsioonikatsed erinevate TNF perekonna ligandidega või nende kombinatsioonidega (RANKL, CD40L, LIGHT, TNF $\alpha$ ,  $\alpha$ LT $\beta$ R, RANKL+CD40L ja RANKL+ $\alpha$ LT $\beta$ R) tüümuse organkultuuris.
- Stimulatsioonikatsete tulemusena saadud geneetilise materjali baasil viia läbi ekspresioonikiibi analüüs, et leida üle kogu genoomi need geenid, mille ekspressiooni tase on reguleeritud kindlate stimulantide poolt.
- Tuvastada geenid, mis on tüümuses reguleeritud spetsiifiliselt RANKL poolt ning nende seast leida uusi gene, mis võiksid omada rolli tüümuse epiteeli küpsemise regulatsioonis.
- Kirjeldada tuvastatud geenide ekspresioonimustrit tüümuses.

# ***Materjalid ja metoodika***

## Hiired

Katsetes kasutati C57Bl/6I liini metsiktüüpi ja Aire KO hiiri (Tartu Ülikool, TÜ MRI vivaarium ning TÜ arstiteaduskonna Biomeedikumi vivaarium). Aire KO hiired genereeriti Walter and Eliza Hall instituudis (Melbourne, Austraalia), kasutades homoloogilist rekombinatsiooni C57BL/6 hiire embrüonaalsetes tüvirakkudes (Hubert jt., 2009). Kindla vanusega hiire embrüote saamisel postuleeriti embrüonaalseks päevaks 0,5 (E0,5) päev, mille hommikul tuvastati emasel hiirel vaginaalne limakork. Loomkatsete tegemiseks andis loa Põllumajandusministeeriumi Loomkatse läbiviimise loakomisjon (luba nr. 43).

## Loote tuumuse organkultuur (FTOC)

Tiined hiired hukati vahetult enne embrüote eemaldamist tservikaalse dislokatsiooni teel. Embrüonaalse tuumuse sagarad eraldati ükshaaval teravatipuliste pintsettidega ning kasvatati MF-Millipore™ membraanfiltritel poori läbimõõduga 0,8 µm (EMD Millipore) gaasi ja vedeliku piirpinnal. Filtrid olid asetatud Artiwrap käsna (Medipost Ltd.) peale DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, PAA) söötmes, millele oli tootja poolt lisatud 4,5g/L glükoosi, L-glutamiini ja naatrium püruvaati. Söötmele lisati mahu järgi 10% FBS (*Fetal bovine serum*, veise loote seerum; PAA). Söötmesse olid lisatud ka antibiootikumid streptomütsiin (0,1 mg/ml), penitsiliin (100 U/ml) ja amfoteritsiin B (0,25 µg/ml) (kõik PAA).

Stimulatsioonikatsetele eelnevalt kasvasid sagarad 6 päeva 2'-deoksüguanosiini (Sigma-Aldrich) sisaldaval söötmel (1,35 mM), et vähendada/kõrvaldada hematopoeetilist päritolu rakkudelt saadavad signaalid.

## Stimulatsioonid TNFSF ligandidega

Stimulatsioonikatsed viidi läbi embrüonaalse tuumuse sagaratega, mis olid kasvanud 6 päeva 2'-deoksüguanosiini sisaldaval söötmel. Kuue päeva möödudes tõsteti sagarad uutele membraanidele ja lasti kasvada 48h kindlas kontsentratsioonis stimulante sisaldaval söötmel. Stimulatsioonides kasutatavad ained ja nende kontsentratsioonid söötmes on toodud tabelis 1. Stimulandiga LIGHT lisati söötmesse 2,5 µg/ml polyHis peptiidi.

**Tabel 1.** Stimulatsioonikatsetes kasutatavad ained ja nende kontsentratsioonid.

<b>Aine</b>	<b>Kontsentratsioon</b>
TNF $\alpha$	50 ng/ml
LIGHT	50 ng/ml
CD40L	10 ng/ml
RANKL	0,5 $\mu$ g/ml
$\alpha$ LT $\beta$ R	2 $\mu$ g/ml

### Epiteelirakkude sortimine

Kümnelt 6-8 nädala vanuselt C57BL/6 hiirelt eemaldati tüümused, mis purustati mehaaniliselt skalpelli või kääridega jääkülmas PBSis, et vabastada võimalikult palju tümotsüüte. Edasi purustatud tüümuse tükid disagregeriti mehaaniliselt GenteMACS C-tuubide abiga (Miltenyi Biotech), millele järgnes 3x30 minutit ensümaatilist töötlust PBSis, mis sisaldas 0,5 mg/ml kollageenaas/dispaasi (Roche) ja 5  $\mu$ g/ml DNaseI (AppliChem). Ensümaatilise töötlustulemusena vabanenud rakud koguti kokku ja sorteeriti AutoMACS (Miltenyi Biotech) masinaga, kasutades CD45 mikrokerasid, et puhastada välja TECid. Eraldatud CD45<sup>-</sup> rakud märgistati PerCP-anti-CD45 (kloon 30-F11), FITC-anti-Ly51 (kloon 6C3) (mõlemad BD Bioscience) ja Alexa Fluor 647-anti-EpCAM (kloon G8.8) konjugeeritud antikehadega ja sorteeriti läbivoolu tsütofluorimeetriga FACS Vantage (BD). cTEC fraktsiooniks sorteeriti CD45<sup>-</sup> Ly51<sup>+</sup> EpCAM<sup>+</sup> ja mTEC fraktsiooniks CD45<sup>-</sup> Ly51<sup>-</sup> EpCAM<sup>+</sup> rakud. Kui sooviti mTEC fraktsiooni edasi lahutada MHC klass II ekspressiooni järgi, märgistati see enne sortimist anti-MHC-APC antikehadega (Miltenyi Biotech).

### RNA eraldamine ja cDNA süntees

Tüümuse sagaratest RNA eraldamiseks purustati need mehaaniliselt 500-1000  $\mu$ l TRIZOL'i (Invitrogen) keskkonnas. (Olukorras, kus koheselt ei järgnenud RNA eraldamine, talletati proove selle etapi järel -80 °C juures.) Seejärel lisati proovidele kloroformi (200  $\mu$ l kloroformi 1 ml TRIZOL'i kohta), segati põhjalikult ja 5 minuti möödudes tsentrifuugiti 12000 rpm juures (Eppendorf centrifuge 5415R) 15 minutit. Vesifaas tõsteti uude tuubi ja lisati sellele võrdses mahus 70% etanooli. Edasi puhastati RNA RNeasy Micro kitiga (Qiagen) vastavalt tootja protokollile. RNA säilitati -80 °C juures. cDNA sünteesimiseks kasutati *SuperScript III*



pöördranskriptaasi (Invitrogen). 12 µl reaktsioonisegu kohta võeti 200-500 ng eraldatud RNAd, 1 µl (500 µg/ml) oligo(dT) 18 praimerit (Invitrogen) ja 1 µl 10 mM dNTP segu (Fermentas). Praimerite seondumiseks inkubeeriti proove 5 min 65 °C juures, mille järel hoiti tuubid vähemalt 1 min jääl. cDNA sünteesi alustamiseks lisati proovidele 4 µl 5× First Strand puhvrit, 1 µl 0.1 M DTT, 1 µl ribonukleasi inhibiitorit *RiboLock* (40 U/µl; Fermentas) ja 1 µl *SuperScript III* pöördranskriptaasi (200 U/µl). Proove inkubeeriti 60 min 50 °C, seejärel reaktsioon peatati, tõstes temperatuuri 15 minutiks 70 °C peale. cDNA säilitati -20 °C või -80° juures edaspidiseks kasutamiseks.

### Mikrokiibi analüüs

Mikrokiibi analüüs viidi läbi kasutades Illumina MouseRef-8 v2.0 Expression BeadChip® ekspressioonikiipi ja kiipide analüüsiks Illumina HiScan kiibilugejat. RNA amplifikatsiooni jaoks kasutati TargetAmp™ Nano Labeling Kit tehnoloogiat, algmaterjali koguseks võeti 300 ng totaal-RNA'd. RNA kvaliteet määrati enne ja pärast amplifikatsiooni Agilent RNA 6000 Nano Kit abiga Agilent 2100 bioanalüsaatoril. Iga stimulatsiooni analüüs kiibil viidi läbi kahe kordusena, enne tulemuste analüüsi normaliseeriti saadud andmed kui *rank invariant*. Kahe stimulatsiooni geeniekspressiooni mustri võrdlemisel vaadeldi ainult gene, millest vähemalt ühel juhul jäi detektsiooni p-väärtus kiibil alla 0,01 (ekspresseeritud usaldusväärselt üle taustsignaali). Et täpsustada RANKL poolt indutseeritud geenide ekspressioonimustrit tüümuse strooma rakkudes, uurisime me nende ekspressiooni ka Derbinski jt. (2005) poolt läbiviidud mikrokiibi katsetes, kus lisaks tüümuse epiteeli fraktsioonidele on esindatud ka mitmed hematopoeetilised rakutüübid.

### Kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon

Kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon (qPCR) viidi läbi geenispetsiifiliste praimeritega (toodud tabelis 2) ViiA7 Real-Time PCR System masinal (Applied Biosystems), kasutades Maxima™ SYBR Green/ROX qPCR Master Mixi (Fermentas). 10 µl qPCR segu sisaldas 0,5 µl cDNA-d, 9,3 µl 2× Maxima™ SYBR Green/ROX qPCR Master Mix-i (Fermentas), 0,1 µl 5 mM *forward* praimerit ning 0,1 µl 5 mM *reverse* praimerit. Proovid kanti 384 auguga qPCR plaadile (Applied Biosystems) 10 µl kaupa kolme paralleelse kordusena, võimalike kontaminatsioonide tuvastamiseks kasutati kõikide praimerite suhtes kontrollproovina 0,5 µl MQ vett. Kõikide proovide korral normaliseeriti tulemused koduhoidja geeni CK-8 ekspressiooni järgi.

**Tabel 2.** Töös kasutatud DNA praimerid.

Praimer ( <i>F</i> – forward/ <i>R</i> – reverse)	Järjestus
Aire <i>F</i>	5'-TCCTCAATGAGCACTCATTGAC-3'
Aire <i>R</i>	5'-CCACCTGTCATCAGGAAGAG-3'
Cdx1 <i>F</i>	5'-GTACATCACTATCCGGCGCA-3'
Cdx1 <i>R</i>	5'-ACCAGATCTTTACCTGCCGC--3'
CK2-8 <i>F</i>	5'-AGGAGCTCATTCCGTAGCTG-3'
CK2-8 <i>R</i>	5'-TCTGGGATGCAGAACATGAG-3'
H2 <i>F</i>	5'-CTCAGAAATAGCAAGTCAGTC-3'
H2 <i>R</i>	5'-AATCTCAGGTTCCAGTG-3'
Insm1 <i>F</i>	5'-TACAGCTCCCCGGGCCTGAC-3'
Insm1 <i>R</i>	5'-ACTCTAGCAGGCCGGACGCA-3'
Utf1 <i>F</i>	5'-GGGTTTCGCCCGCTCTACT-3'
Utf1 <i>R</i>	5'-GCTCGGCCTCTTGCTCCACCG -3'

### Immunofluorestsents mikroskoopia

Noore hiire tüümus kiirkülmutati tahke CO<sub>2</sub> ja etanooli segu abiga TissueTek (Vogel) keskkonnas ning plokist valmistati 5 µm paksused lõigud, mida talletati -80°C juures. Immunofluorestsents analüüsiks sulatati ja kuivatati lõigud 20 minutit õhu käes ning fikseeriti 20 min 4% formaldehüüdiga. Pärast PBS pesu permeabiliseeriti ja blokeeriti koelõike 0,5% Triton X lahusega PBSis, mis sisaldas lisaks 1% tavalist kitse seerumit (NGS). Permeabiliseerimisele ja blokeerimisele järgnes PBS pesu, pärast mida inkubeeriti lõike primaarse antikehaga 1h toatemperatuuril või +4°C üleöö. UTF1- ja EpCAM-vastase primaarse antikeha puhul kasutati 1:500 ja CDX1 antikehaga 1:2000 lahjendust. Sellele järgnes taas PBS pesu ja 1h toatemperatuuril inkubeerimist sekundaarse antikehaga. UEA1 ja CDX1/UTF1 ko-lokalisatsiooni määramiseks lisati sekundaarsele antikehale UEA1-FITC konjugaati. Sekundaarsete antikehade puhul kasutati 1:2000 lahjendusi ning UEA1-FITC konjugaadi puhul 1:1000 lahjendust. Pärast töötlust sekundaarse antikehaga pesti lõigud PBSiga, värviti 10 min DAPIga ning pikemaks säilitamiseks kaeti klaasidega Dako Fluorescent Mounting Media keskkonnas. Mikroskoopimisel kasutati Olympus IX70 fluorestsentsmikroskoopi.

## Antikehad

Töös kasutati kommertsiaalselt saadavate primaarste antikehadena: küüliku polükloonaalne anti-UTF1 (Abcam), roti monokloonaalne anti-EpCAM genereeriti töögrupisiselt G8.8 hübriidoomi rakuliinist (Developmental Studies HybridomaBank, University of Iowa, USA). Küüliku polükloonaalset anti-CDX1 antikeha jagasid meiega lahkelt David Lohnes ja kolleegid Ottawa ülikoolist, kelle laboris see antikeha on valmistatud. Sekundaarsete antikehadena kasutati polükloonaalset kitses valmistatud rotivastast antikeha (konjugeeritud Alexa Fluor 488) ja küülikuvastast polükloonaalset antikeha (konjugeeritud Alexa Fluor 594). Kõikide antikehadega viidi läbi kontrollkatsed, et veenduda nende spetsiifilisuses. Lisaks kasutati küpse mTEC markerina FITC-konjugeeritud UEA1 (Ulex Europeanus Agglutinin-1) (Vector).

## Tulemuste analüüs

Mikrokiibi tulemuste analüüsimiseks kasutati Illumina GenomeStudio tarkvara. Graafikute joonistamiseks kasutati GraphPad Prism 5 ning erinevad diagrammid koostati SmartDraw 2013 ja Cytoscape 3.0.1 abiga. Jooniste modifitseerimiseks ja paneelide kombineerimiseks kasutati Adobe Photoshop ja Adobe Illustrator programme. qPCR tulemused analüüsiti ViiA7 tarkvara ning MS Excel 2003 ja 2010 abiga.

# Tulemused

## Stimulatsioonide poolt reguleeritud geenide ekspressioonimustri kirjeldamine

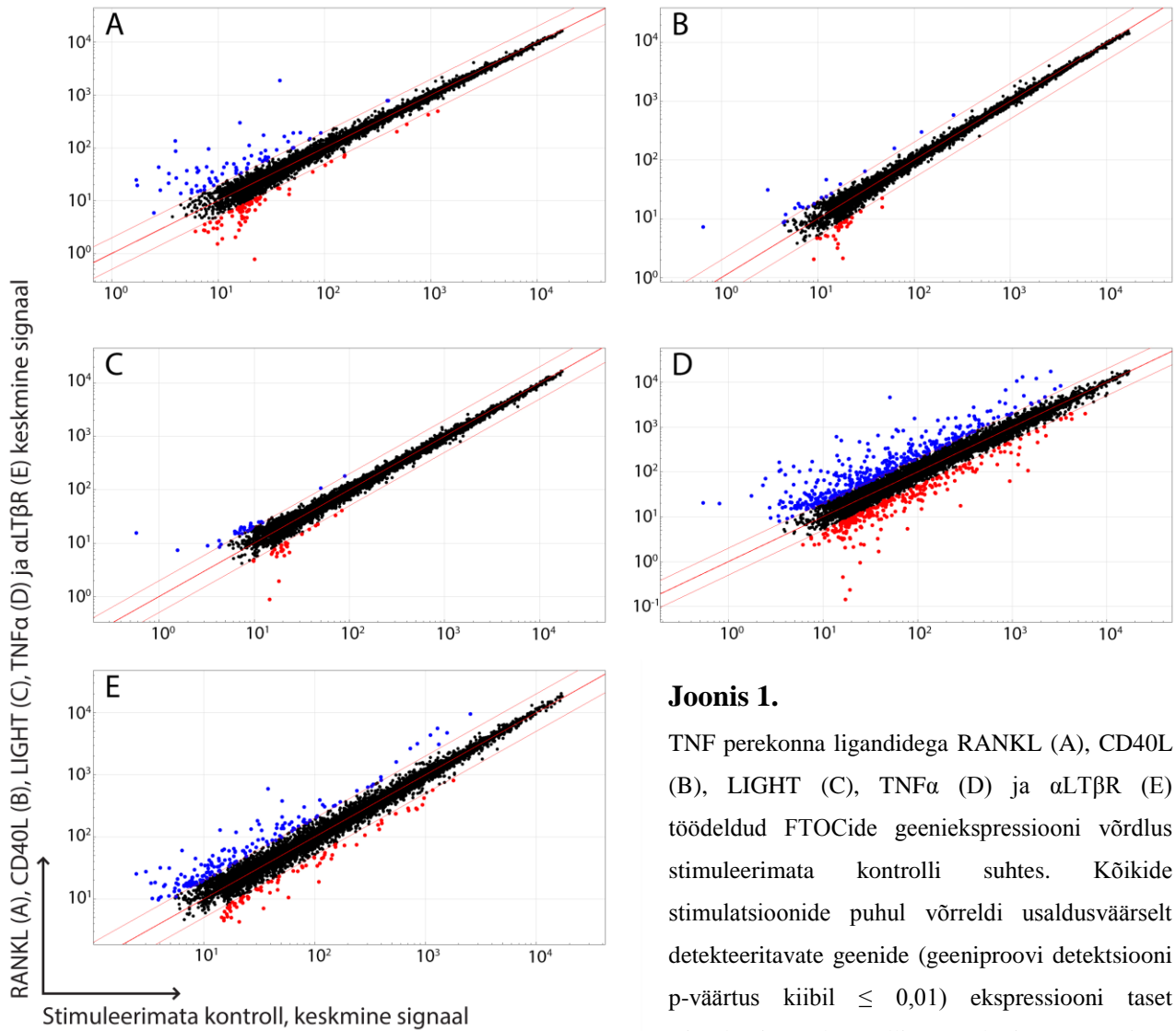
Et selgitada välja geenid, mis on reguleeritavad kindlate TNF perekonna ligandide poolt, viidi läbi mRNA ekspressiooni analüüs hiire loote tuumuse organkultuuris (FTOC). Organkultuure stimuleeriti 48h valikuliselt üksikute TNFSF ligandidega (RANKL, CD40L, LIGHT, TNF $\alpha$  ja LT $\beta$ R vastane agonistlik antikeha –  $\alpha$ LT $\beta$ R) pärast töötlust 2' deoksüguanosiiniga (2-DG). 2-DG töödeldud organkultuuris (2-DG FTOC) kõrvaldatakse koest hematopoeetilist päritolu rakud (näiteks ebaküpsed T-lümfotsüüdid), et nende kaudu saadavad TNFSF signaalid ning mRNA kontaminatsioon edasistes analüüsides oleks minimaalne.

Kõikidest usaldusväärse ekspressioonitasemega geenidest (detektsiooni p-väärtus kiibil  $\leq 0,01$ ) tuvastati need, mille ekspressiooni tase muutus vähemalt kaks korda kõrgemaks või madalamaks võrreldes stimuleerimata kontrolliga (Joonis 1). Me leidsime, et erinevate TNFSF signaalide poolt reguleeritavate geenide arv on märkimisväärselt erinev (Tabel 3). Kõige ulatuslikumat mõju geeniekspressioonile tuumuses avaldas TNF $\alpha$ , reguleerides kokku enam kui 600 geeni ekspressiooni taset. Kõige väiksem efekt ilmnis CD40 ligandiga stimulatsioonil, mille puhul täheldasime muutust 49 geeni ekspressiooni tasemes.

**Tabel 3.**

Stimulatsioonide toimel üles- ja allareguleeritud geenide hulk võrreldes stimuleerimata kontrolliga.

	Üles-reguleeritud	Alla-reguleeritud
RANKL	72	79
CD40L	20	29
LIGHT	31	28
TNF $\alpha$	363	273
$\alpha$ LT $\beta$ R	171	78



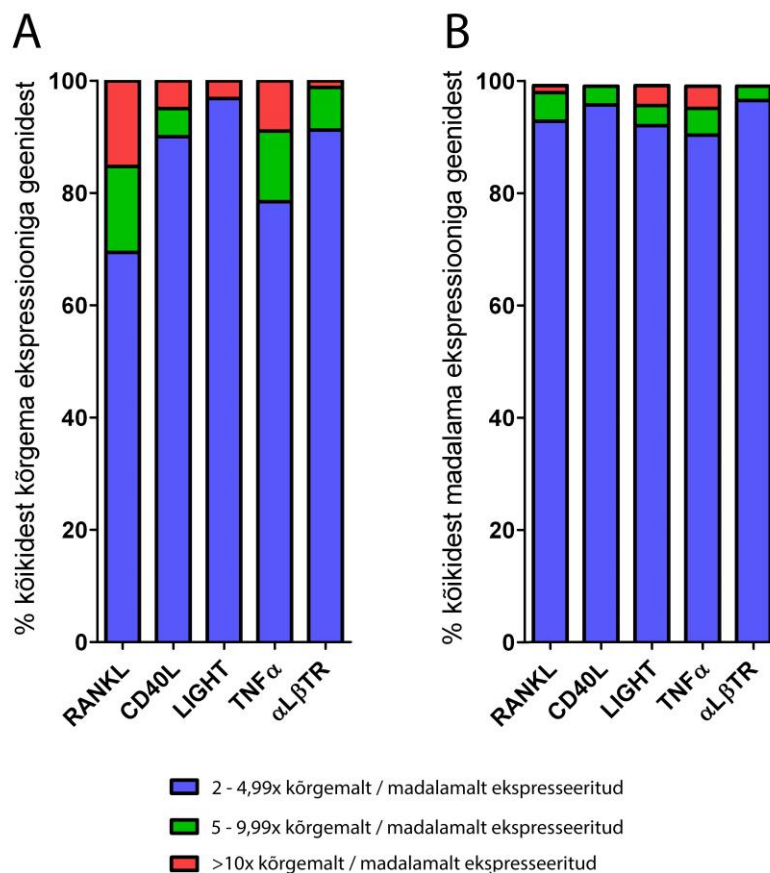
**Joonis 1.**

TNF perekonna ligandidega RANKL (A), CD40L (B), LIGHT (C), TNF $\alpha$  (D) ja  $\alpha$ LT $\beta$ R (E) töödeldud FTOCide geeniekspressiooni võrdlus stimuleerimata kontrolli suhtes. Kõikide stimuleerimata puhul võrreldi usaldusväärset detekteeritavate geenide (geeniproovi detektsiooni p-väärtus kiibil  $\leq 0,01$ ) ekspressiooni taset stimuleerimata kontrolliga. Keskmine punane joon kujutab sirget, millele langevad identse ekspressioonitasemega geenid mõlemas proovis. Sellest vasakule / ülespoole jäävad geenid, mis on stimuleerimata tagajärjel kõrgemalt ekspresseeritud ja paremale / allapoole geenid, mis on kõrgemalt ekspresseeritud kontrolliproovis (stimuleerimata tulemusena ekspressiooni tase langenud). Keskmisest punasest joonest kahele poole jäävad punased sirged moodustavad koridori, kuhu langevad geenid, mille ekspressioon ei ole muutunud kontrolliga võrreldes üle kahe korra. Kontrolliga võrreldes vähemalt kaks korda kõrgemalt ekspresseeritud geenid on tähistatud siniste täppidena ja vähemalt kaks korda madalamalt ekspresseeritud geenid punaste täppidena.

Stimuleeritud proovide keskmine signaal kiibil Y-teljel, stimuleerimata kontrolli keskmine signaal kiibil X teljel. Telgede skaala on logaritmitud.

Märkimisväärselt erines stimulantide poolt reguleeritud geenide ekspressiooni taseme muutus (Joonis 2). Kõikide stimulantide puhul jäi enamiku indutseeritud geenide ekspressiooni taseme muutus võrdlemisi madalaks (2 – 4,99 korda). Siiski tuli välja selge erinevus kõrgemalt ülesreguleeritud geenide osakaalus erinevate stimuleerimata puhul. Ekspressiooni tase tõusis

üle 5 korra peaaegu kolmandikul (30.5%) kõikidest RANKL poolt indutseeritud geenidel ja ligi viiendikul (21.6%) TNF $\alpha$  poolt indutseeritud geenidel. Teiste stimulantidega jäi üle 5 korra kõrgemalt ekspresseeritud geenide osakaal madalamaks – CD40L 10%,  $\alpha$ LT $\beta$ R 8,8% ja LIGHT 3,2%. Allareguleeritud geenide osas taolist erinevust ei täheldatud ning kõikide stimulantide puhul oli üle 90% geenide ekspressioon muutunud alla 5 korra.



## Joonis 2.

Stimulatsioonide tulemusena tõusnud (A) ja langenud (B) ekspressioonitasemega geenide suhteline muutus võrreldes stimuleerimata kontrolliga. Tõusnud ekspressioonitasemega geenidest enamik muutus vähem kui 5 korda, kuid üle viie korra suurenenud ekspressiooniga geenide osakaal erines märkimisväärselt stimulatsioonide vahel. Suurima osa moodustasid >5 korra tõusnud ekspressioonitasemega geenid (diagrammil märgitud rohelise ja punase tulba fraktsioonina) RANKL ja TNF $\alpha$  stimulatsioonide järgselt, kus kõikidest indutseeritud geenidest moodustasid nad vastavalt 30,5% ja 21,6%, kõige vähem kõrgelt indutseeritud geene ilmses LIGHT stimulatsiooni tulemusena (3,2%). Stimulatsioonide tulemusena langenud ekspressioonitasemega geenide hulgas taolisi erinevusi ei täheldatud.

On oluline mainida, et nii RANKL, TNF $\alpha$  kui  $\alpha$ LT $\beta$ R indutseerisid paljude kemokiinide ekspressiooni: RANKL – CCL5 ja CXCL10, TNF $\alpha$  – CCL2, 3, 4, 5, 7, 9, 11, 19 ja 21 ning CXCL1, 2, 4, 9, 10 ja 16 ning  $\alpha$ LT $\beta$ R – CCL 5, 19 ja 21 ning CXCL 9 ja 10.

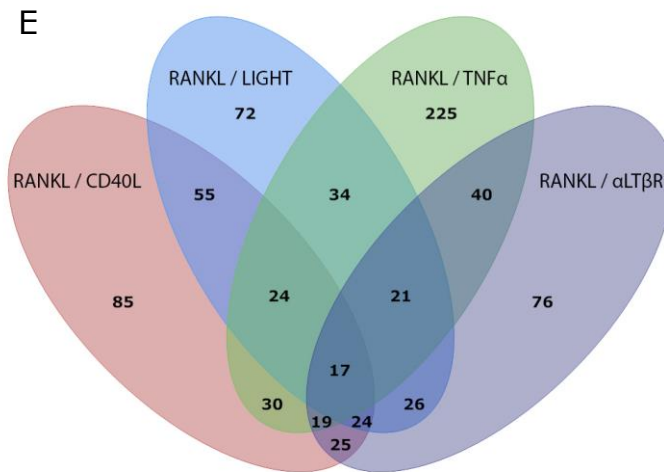
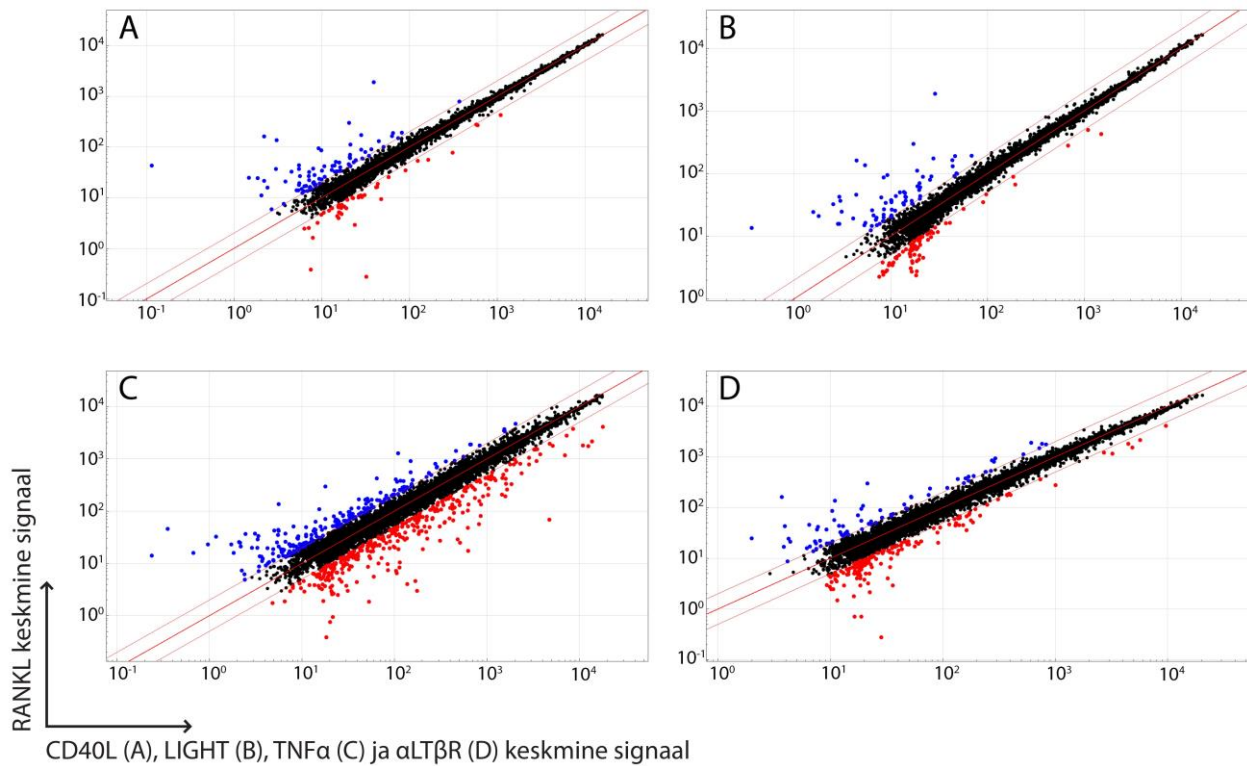
## **RANKL poolt spetsiifiliselt indutseeritud geenide tuvastamine**

Kuna kõik uuritavad TNF retseptorite ligandid töötavad läbi NF- $\kappa$ B aktivatsiooni, on oodata nende poolt reguleeritud geenide osalist kokkulangevust. Kuna RANK-RANKL signaliseerimine on tüümuse säsi epiteeli küpsemises kriitilise tähtsusega, soovisime me tuvastada geenid, mis on spetsiifiliselt indutseeritud selle signaalraja kaudu. Selle jaoks võrdlesime me RANKL stimulatsiooni järgset geeniekspressiooni mustrit teiste stimulantidega töödeldud FTOC*i* geenide ekspresioonitaseme vastu (Joonis 3). Kõige rohkem erinevalt ekspresseeritud gene ilmnes TNF $\alpha$  ja RANKL vahel, kus kokku lahknes 554 geeni ekspresiooni muster – 225 geeni oli kõrgemalt ekspresseeritud RANKL ja 329 TNF $\alpha$  töötluse järgselt. Teiste stimulatsioonidega võrreldes oli RANKL poolt indutseeritud geenide arv sarnane – 85 (CD40L), 72 (LIGHT) ja 76 ( $\alpha$ LT $\beta$ R).

Eelduste kohaselt peaksid spetsiifiliselt RANKL poolt indutseeritud geenid olema kõrgenenud ekspresioonitasemega võrdluses kõikide teiste TNFSF ligandide stimulatsioonidega. Sellest lähtuvalt otsustasime me tuvastada geenid, mille ekspressioon oleks muutunud *ainult* RANK ligandiga stimuleerimise tulemusena. (Joonis 3, E). Kokku leidsime me 17 geeni, mille ekspresiooni tase tõusis RANKL-spetsiifiliselt vähemalt 2 korda kõikide teiste uuritud stimulantide suhtes.

Füsioloogilistes tingimustes saavad mTEC*i*d tümotsüütidelt korraga mitmeid signaale, mille kaudu reguleeritakse nende geeniekspressiooni. Eelnevatest uuringutest on selgunud, et RANK, CD40 ja LT $\beta$ R kaudu toimuva signaliseerimise vahendusel toimub kooperatiivne mTEC*i* küpsemise regulatsioon. Sellest tulenevalt soovisime uurida, kas nende ligandidega kostimulatsioonide käigus indutseeritakse embrüonaalses tüümuses geenide ekspresiooni, mille ekspresiooni tase üksikute ligandidega stimulatsioonil ei muutu. Selle jaoks me viisime läbi kostimulatsioonid, kus lisaks RANK ligandile lisati söötmesse CD40L (RANKL+CD40L) või  $\alpha$ LT $\beta$ R (RANKL+ $\alpha$ LT $\beta$ R) ja võrdlesime nende poolt indutseeritud geeniekspressiooni mustrit teiste stimulantide omaga.

Nii RANKL+CD40L (Joonis 4) kui RANKL+ $\alpha$ LT $\beta$ R puhul (Joonis 5) indutseeriti kostimulatsioonide tulemusena rohkema arvu geenide ekspressioon kui ainult RANK ligandiga ja see efekt oli märkimisväärselt suurem RANKL+ $\alpha$ LT $\beta$ R kostimulatsiooniga. Huvitaval kombel, võrreldes eelmises analüüsis leitud geenidega, jäi CD40L lisamisel praktiliselt muutumatuks spetsiifiliselt indutseeritud geenide kompleks.

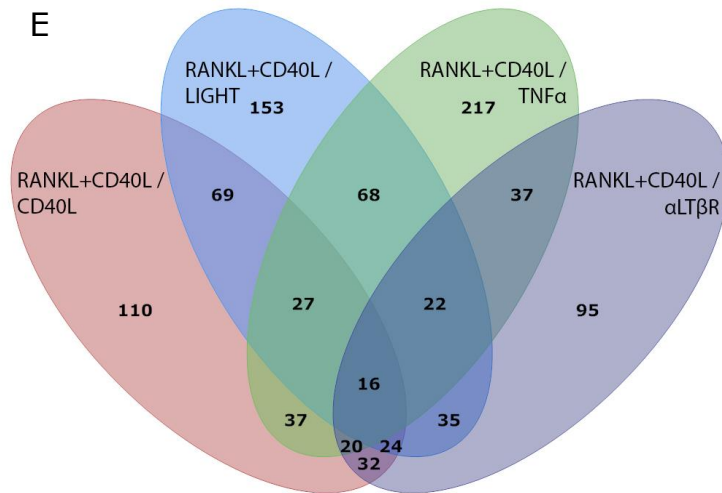
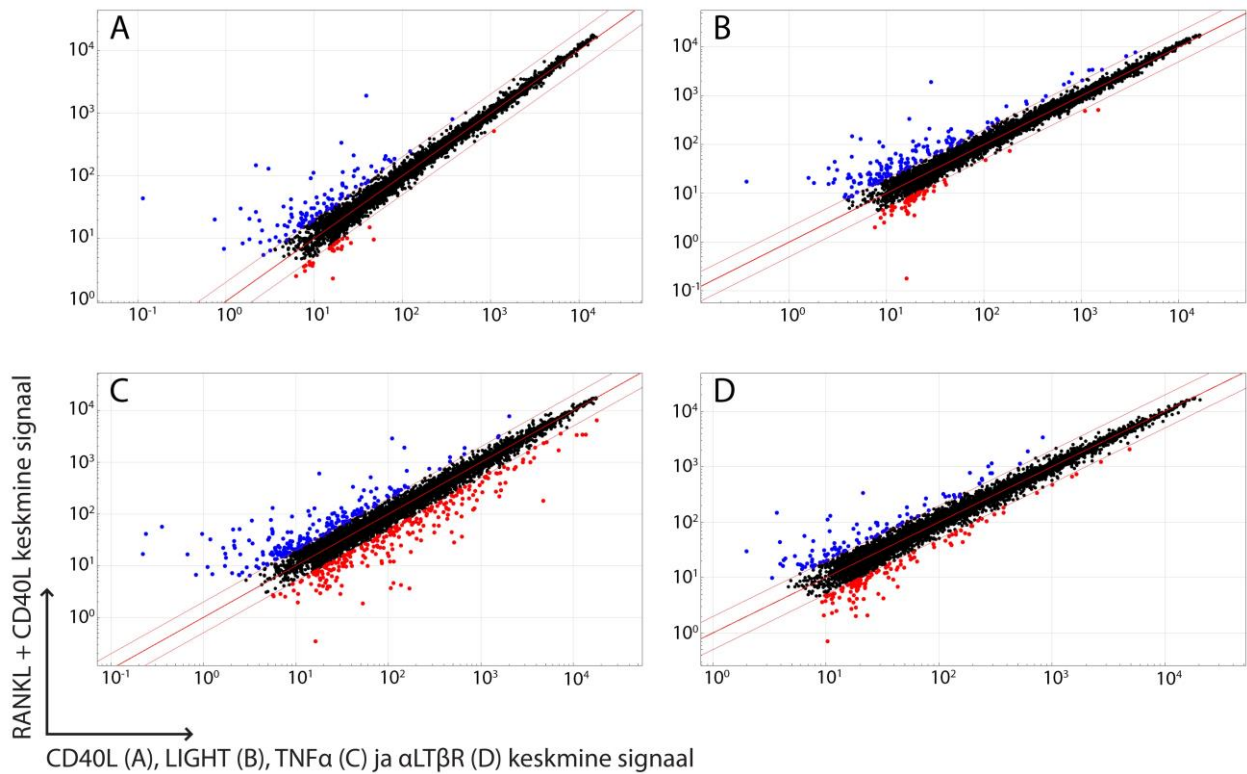


### Joonis 3.

TNF perekonna ligandidega CD40L (A), LIGHT (B), TNF $\alpha$  (C) ja  $\alpha$ LT $\beta$ R (D) töödeldud FTOCide geeniekspressiooni võrdlus RANK ligandiga stimuleeritud FTOCi geeni-ekspressiooni suhtes. Võrreldud on usaldusväärselt detekteeritavate geenide (geeniproovi detektsiooni p-väärtus kiibil  $\leq 0,01$ ) ekspressioonimustri erinevust RANKL ja teiste TNFSF ligandide vahel. Keskmine punane joon kujutab sirget, millele langevad identse ekspressioonitasemega geenid mõlemas proovis. Sellest vasakule / ülespoole jäävad geenid, mille

ekspressiooni tase on kõrgem RANKL stimulatsiooni tagajärjel ja paremale / allapoole geenid, mis on kõrgemalt ekspresseeritud võrreldava TNFSF ligandiga stimulatsiooni tulemusena. Keskmisest punasest joonest kahele poole jäävad punased sirged moodustavad koridori, kuhu langevad geenid, mille ekspressioon ei ole muutunud võrreldava proovi suhtes üle kahe korda. RANKL töötuse tulemusena vähemalt kaks korda kõrgemalt ekspresseeritud geenid on tähistatud siniste täppidena ja teiste stimulantidega vähemalt kaks korda kõrgemalt ekspresseeritud geenid punaste täppidena. RANK ligandiga stimuleeritud proovide keskmine signaal kiibil Y-teljel, teiste stimulatsioonide keskmine signaal kiibil X teljel. Telgede skaala on logaritmitud. (E) RANKL stimulatsioonide tulemusena kõrgemalt ekspresseeritud geenide võrdlus. Iga ovaal kujutab ühe stimulandi suhtes vähemalt kaks korda kõrgemalt ekspresseeritud geene (tähistatud siniste täppidega paneelides A-D) ning ovaalide kattuvad piirkonnad ühiseid geene nende vahel. Kokku tuvastasime me 17 geeni, mille ekspressioon oli tõusnud vähemalt kaks korda võrreldes stimulatsioonidega kõikide teiste TNF perekonna ligandidega.





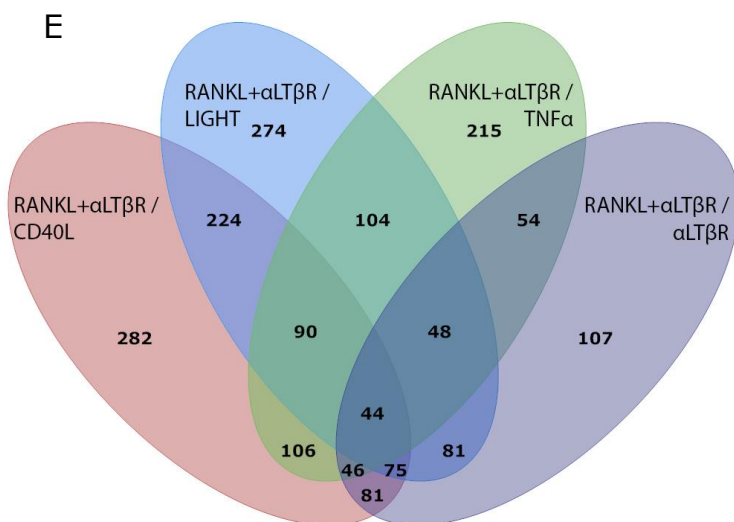
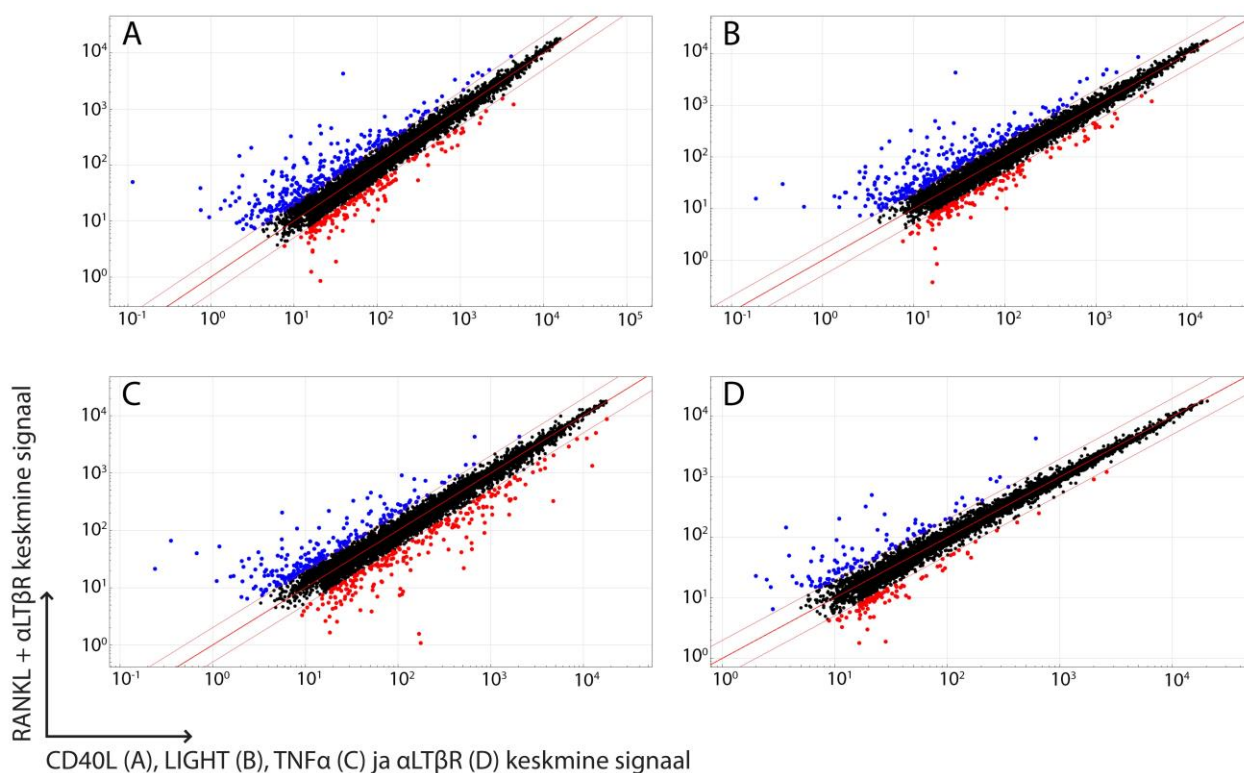
#### Joonis 4.

TNF perekonna ligandidega CD40L (A), LIGHT (B), TNF $\alpha$  (C) ja  $\alpha$ LT $\beta$ R (D) töödeldud FTOCide geeniekspressiooni võrdlus RANKL ja CD40 ligandiga stimuleeritud FTOCi (RANKL+CD40L) geeniekspressiooni suhtes. Kriteeriumid ja tähistused samad, mis joonisel 3. RANKL+CD40L stimuleeritud proovide keskmine signaal kiibil Y-teljel, teiste stimulatsioonide keskmine signaal kiibil X teljel.

(E) RANKL+CD40L stimulatsioonide tulemusena kõrgemalt ekspresseeritud geenide võrdlus. Iga ovaal kujutab ühe stimulandi suhtes vähemalt kaks korda kõrgemalt ekspresseeritud geene (tähistatud siniste täppidega paneelides A-D) ning ovaalide kattuvad piirkonnad ühiseid geene nende vahel. Kokku tuvastasime me 16 geeni, mille ekspressioon oli RANKL+CD40L stimulatsiooni tulemusena tõusnud vähemalt kaks korda võrreldes stimulatsioonidega kõikide teiste TNF perekonna ligandidega.

Kokku leidsime me 16 geeni, mille ekspressioon oli tõusnud RANKL+ CD40L stimulatsiooni puhul võrreldes teiste TNFSF ligandidega (Joonis 4, E). Erinevalt RANKL+CD40L kostimulatsioonist suurendas  $\alpha$ LT $\beta$ R lisamine RANK ligandile olulisel määral

geenide arvu, mis oli üles reguleeritud võrreldes kõikide teiste stimulatsioonidega. Kokku tuvastasime me 44 geeni, mis olid indutseeritud RANKL ja  $\alpha$ LT $\beta$ R poolt (Joonis 5, E).



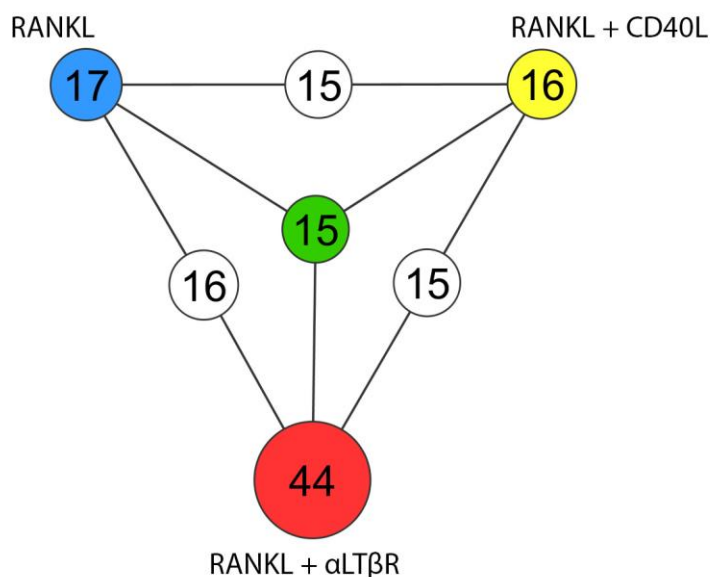
### Joonis 5.

TNF perekonna ligandidega CD40L (A), LIGHT (B), TNF $\alpha$  (C) ja  $\alpha$ LT $\beta$ R (D) töödeldud FTOCide geeniekspressiooni võrdlus RANKL ja LT $\beta$ R vastase agonistliku antikehaga stimuleeritud FTOCi (RANKL+  $\alpha$ LT $\beta$ R) geeniekspressiooni suhtes. Kriteeriumid ja tähistused on samad, mis joonisel 3. RANKL+ $\alpha$ LT $\beta$ R stimuleeritud proovide keskmine signaal kiibil Y-teljel, teiste stimulatsioonide keskmine signaal kiibil X teljel.

(E) RANKL+ $\alpha$ LT $\beta$ R stimulatsioonide tulemusena kõrgemalt ekspresseeritud geenide võrdlus. Iga ovaal kujutab ühe stimulandi suhtes vähemalt kaks korda kõrgemalt ekspresseeritud geene (tähistatud siniste täppidega paneelides A-D) ning ovaalide kattuvad piirkonnad ühiseid geene nende vahel. Kokku tuvastasime me 44 geeni, mille ekspressioon oli RANKL+ $\alpha$ LT $\beta$ R stimulatsiooni tulemusena tõusnud vähemalt kaks korda võrreldes stimulatsioonidega kõikide teiste TNF perekonna ligandidega.

44 geenist, mis olid üles reguleeritud RANKL+ $\alpha$ LT $\beta$ R kostimulatsiooniga, olid 7 tükki unikaalsed ja nende ekspressioon ei olnud tõusnud eraldi RANKL ega  $\alpha$ LT $\beta$ R stimulatsiooni tagajärjel. Nende seas leidis ka üks transkriptsioonifaktor – *Tfap2c* (*transcription factor AP-2, gamma*), mille funktsioon ja ekspressioonimuster tuumuses on teadmata. Samas viitab see võimalusele, et korrektne geeniekspressiooni regulatsioon tuumuses vajab mitme signaali samaaegset presenteerimist.

Lõpliku spetsiifiliselt RANKL poolt indutseeritud geenide nimekirjana kasutati neid gene, mille ekspressiooni tase oli tõusnud nii puhtalt RANK ligandiga stimulatsioonil kui ka kostimulatsioonide puhul  $\alpha$ LT $\beta$ R ja CD40 ligandiga (Joonis 6).



### Joonis 6.

RANKL stimulatsiooni, RANKL+CD40L ja RANKL+ $\alpha$ LT $\beta$ R kostimulatsioonide tulemusena indutseeritud geenide kokkulangevus. Võrreldud on gene, mille ekspressioon oli RANKL (sinine), RANKL+CD40L (kollane) või RANKL+ $\alpha$ LT $\beta$ R (punane) stimulatsioonide tulemusena tõusnud vähemalt kaks korda võrreldes stimulatsioonidega kõikide teiste TNF perekonna ligandidega. Valgete ringidega on tähistatud ühiste geenide arv kahe (ko)stimulatsioonide vahel ja

rohelisega geenid, mille ekspressioon on indutseeritud nii RANKL, RANKL+CD40L kui RANKL+ $\alpha$ LT $\beta$ R stimulatsioonidega (nimekiri kõikides stimulatsioonides indutseeritud geenidest on toodud Tabelis 4).

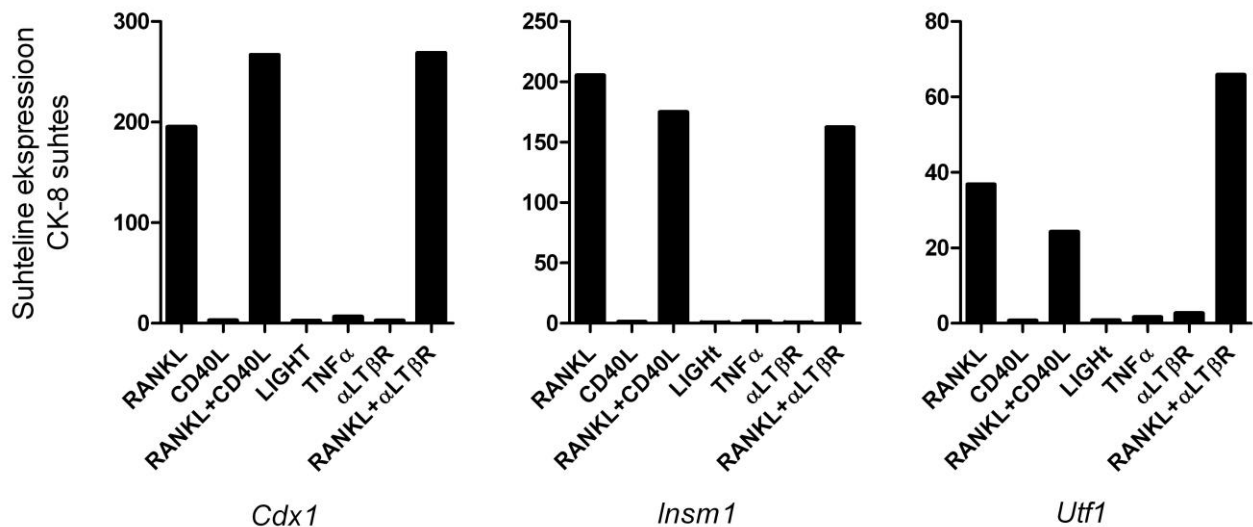
Erinevate stimulatsioonide kaudu indutseeritud geenide kõrvutamise tulemusena tuvastasime me 15 geeni, mille ekspressioon oli rangelt seotud RANKL signaliseerimisega (Tabel 4). 15 geenist kolmandiku (5 geeni) moodustasid erinevad transkriptsioonifaktorid. RANKL-spetsiifiliselt oli muutunud Aire ekspressioon, mis viitab RANKL võtmerollile avatud geeniekspressiooni reguleerimises. Samuti oli spetsiifiliselt tõusnud *Tnfrsf11b* (teise nimega OPG – *Osteoprotegerin*) ekspressiooni tase, mis näitab, et antud süsteemis töötab korrektselt RANK-RANKL signaliseerimise negatiivse tagasiside mehhanism. Et leida uusi transkriptsioonifaktoreid, mis võiksid omada rolli tuumuse epiteeli küpsemise regulatsioonis, uurisime me nelja

geeni (*Cdx1*, *Insm1*, *Irf4* ja *Utf1*) ekspressioonimustrit tuumuses Derbinski jt. (2005) poolt läbiviidud mikrokiibi analüüsis. *Irf4* oli kõrgelt ekspresseeritud lisaks epiteelile ka tuumuse dendriitrakkudes, seevastu *Cdx1*, *Insm1* ja *Utf1* olid ekspresseeritud küllalt spetsiifiliselt tuumuse epiteelis. Me valideerisime *Cdx1*, *Insm1* ja *Utf1* ekspressiooni meie poolt läbiviidud stimulatsioonikatsetes kvantitatiivse polümeraasi ahelreaktsiooniga ning leidsime kinnitust sellele, et tegu on spetsiifiliselt ja tugevalt RANKL poolt indutseeritud geenidega (Joonis 7). Nendest tulemustest lähtuvalt otsustasime me süvendatult kirjeldada nende kolme geeni ekspressiooni tuumuse epiteelis.

**Tabel 4.**

RANKL poolt spetsiifiliselt indutseeritud geenid.

<b>Geeni sümbol</b>	<b>Ametlik geeni nimetus</b>
<i>Aif1l</i>	<i>Allograft Inflammatory Factor 1-Like</i>
<i>Aire</i>	<i>Autoimmune Regulator</i>
<i>Cdx1</i>	<i>Caudal Type Homeobox 1</i>
<i>Il4i1</i>	<i>Interleukin 4 Induced 1</i>
<i>Insm1</i>	<i>Insulinoma-Associated 1</i>
<i>Irf4</i>	<i>Interferon Regulatory Factor 4</i>
<i>Kynu</i>	<i>Kynureninase</i>
<i>Nptx2</i>	<i>Neuronal Pentraxin II</i>
<i>Pglyrp1</i>	<i>Peptidoglycan Recognition Protein 1</i>
<i>Prg2</i>	<i>Proteoglycan 2, Bone Marrow (Natural Killer Cell Activator, Eosinophil Granule Major Basic Protein)</i>
<i>Slc4a8</i>	<i>Solute Carrier Family 4, Sodium Bicarbonate Cotransporter, Member 8</i>
<i>Spock3</i>	<i>Sparc/Osteonectin, Cwcv And Kazal-Like Domains Proteoglycan (Testican) 3</i>
<i>Tnfrsf11b</i>	<i>Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily, Member 11b (teise nimega OPG – Osteoprotegerin)</i>
<i>Ttn</i>	<i>Titin</i>
<i>Utf1</i>	<i>Undifferentiated Embryonic Cell Transcription Factor 1</i>



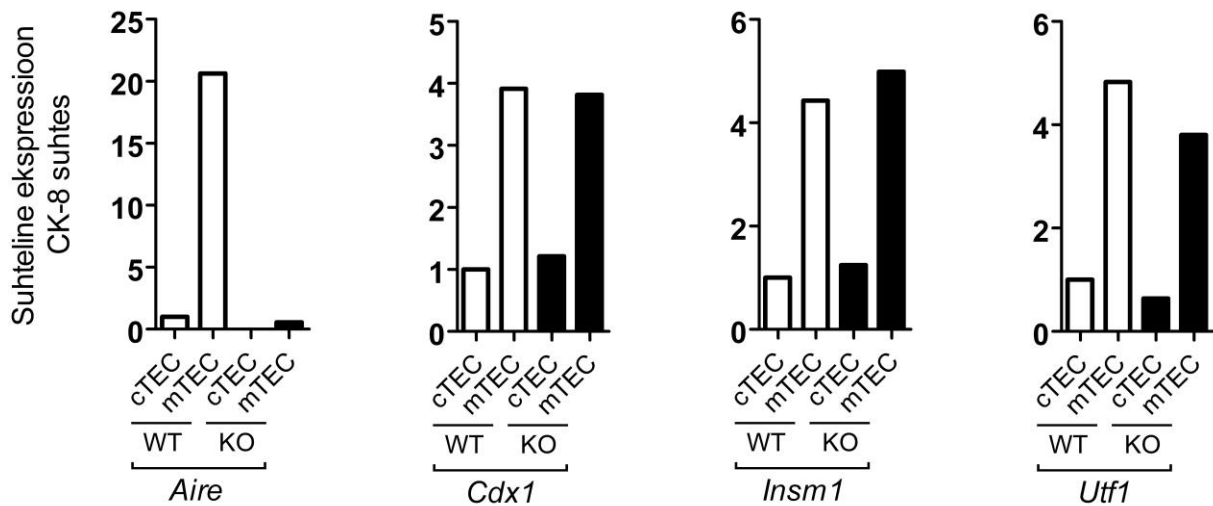
### Joonis 7.

*Cdx1*, *Insm1* ja *Utf1* ekspressiooni valideerimine kvantitatiivse polümeraasi ahelreaktsiooniga. 48h erinevate stimulantidega või nende kombinatsiooniga töödeldud FTOCis määrati *Cdx1*, *Insm1* ja *Utf1* mRNA ekspressiooni tase ja kõrvutati seda stimuleerimata kontrolliga. Toodud on kahe sõltumatu bioloogilise replikaadi mõõtmiste keskvaärtused, koduhoidjageenina on kasutatud tsütokeratiin 8 (CK-8). Selgelt ilmneb kõigi kolme geeni ekspressiooni spetsiifiline indutseerimine RANKL poolt.

### **Cdx1, Insm1 ja Utf1 ekspressioonimustri kirjeldamine tüümuses.**

Olles tuvastanud kolm tüümuses seni kirjeldamata transkriptsioonifaktorit, otsustasime me uurida nende ekspressioonimustrit tüümuse stroomas. Et näha, kas antud transkriptsioonifaktorid on ekspresseeritud eeskätt tüümuse kooses või säsis, analüüsiti geenispetsiifiliste praimeritega hiire tüümusest puhastatud mTEC ja cTEC fraktsioone kvantitatiivse polümeraasi ahelreaktsiooniga (qPCR). Väga suur hulk mTEC-spetsiifilise ekspressiooniga geenidest tüümuses on reguleeritud *Aire* poolt, mistõttu uuriti ka seda, kas antud geenide puhul on tegu *Aire* poolt reguleeritud faktoritega. Et näha võimalikku seost *Aire* ekspressiooniga, kõrvutati geeniekspressiooni taset metsiktüüpi (WT) ja *Aire* puudulikus (*Aire* KO) hiires.

Kõik kolm transkriptsioonifaktorit, *Cdx1*, *Insm1* ja *Utf1*, olid kõrgemalt ekspresseeritud medulaarsetes tüümuse epiteelirakkudes ning WT ja *Aire* KO hiirtes ei ilmnenu geeni ekspressioonitasemes erinevust (Joonis 8).



### Joonis 8.

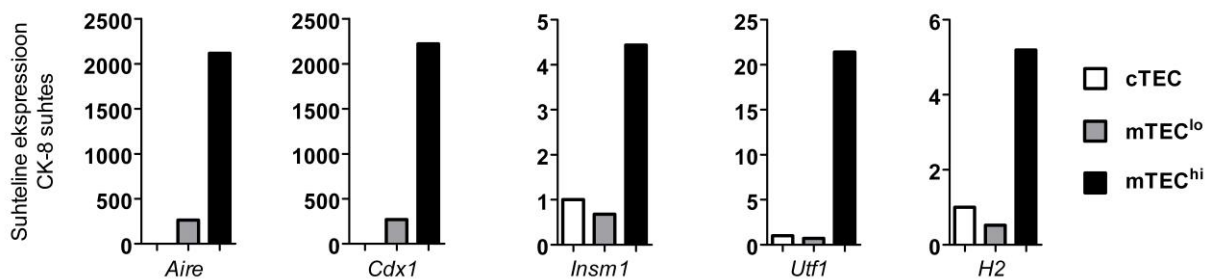
*Aire*, *Cdx1*, *Insm1* ja *Utf1* qPCR analüüs metsiktüüpi (WT – heledad tulbad) ja Aire puuduliku (KO – mustad tulbad) hiire koore ja säsi epiteeli rakkudes (vastavalt cTEC ja mTEC). Kujutatud on suhteline ekspressioonitase koduhoidjageeni tsütokeratiin 8 (CK-8) suhtes. Igale tulpale vastab üks mõõtmine 10 hiire tüümusest sortitud rakkude baasil.

Järgnevalt uurisime, millises mTEC subpopulatsioonis toimub nende geenide ekspressioon. Selleks viidi läbi qPCR analüüs metsiktüüpi hiire sortitud tüümuse epiteelirakkudele. cTEC fraktsioon eraldati kui CD45<sup>-</sup>EpCAM<sup>+</sup>Ly51<sup>+</sup> rakud. Säsi rakud (CD45<sup>-</sup>EpCAM<sup>+</sup>Ly51<sup>-</sup>) lahutati MHC klass II ekspressiooni alusel küpseks (MHC II kõrgelt ekspresseerivaks) ja ebaküpseks (MHC II madalalt ekspresseerivaks) fraktsiooniks. qPCR analüüsis kasutati MHC II ekspressioonitaseme määramiseks *H2* geeni, mis kodeerib ühte koosobivuskompleksi kuuluvatest valkudest.

Ekspressioonianalüüsi tulemusena selgus, et kõik kolm transkriptsioonifaktorit on RANKL stimulatsiooni tagajärjel spetsiifiliselt ekspresseeritud küpses, MHC II kõrgelt ekspresseerivas mTEC populatsioonis (Joonis 9). Meie tulemused on kooskõlas ka Derbinski jt. (2005) poolt läbiviidud mikrokiibi analüüsi tulemustega, kus on analüüsitud geeniekspressiooni erinevates tüümuse stroomarakkude fraktsioonides.

Kolme uuritud transkriptsioonifaktori ekspressioonimuster oli identne *Aire* omaga, ent nende ekspressiooni tase ei olnud muutunud *Aire* KO hiires. Sellest lähtuvalt tahtsime me kontrollida, kas mõni nendest võiks teoorias olla *Aire* ekspressiooni reguleeriv faktor. Hüpooteesi kontrollimiseks uurisime me nende geenide ekspressioon ajas. Me määrasime *Aire*, *Cdx1*, *Insm1*

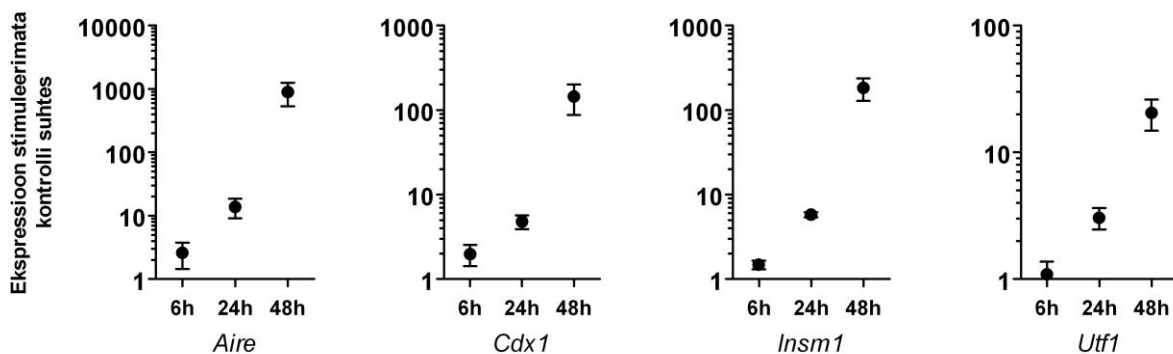
ja *Utf1* ekspressiooni 2-DG töödeldud FTOCis 6, 24 ja 48 tunni möödudes RANKL stimulatsiooni algusest.



### Joonis 9.

*Aire*, *Cdx1*, *Insm*, *Utf1* ja *H2* suhteline ekspressioonitase CK-8 suhtes erinevates metsiktüüpi hiire tüümuse stroomarakkude populatsioonides. Kujutatud on suhteline geeniekspressiooni tase kooses (cTEC, valged tulbad) ning MHC II madalalt (mTEC<sup>lo</sup> – hallid tulbad) ja MHC II kõrgelt ekspresseerivas (mTEC<sup>hi</sup> – mustad tulbad) tüümuse säsi epiteelis. Igale tulpale vastab üks mõõtmine 10 hiire tüümusest sortitud rakkude baasil.

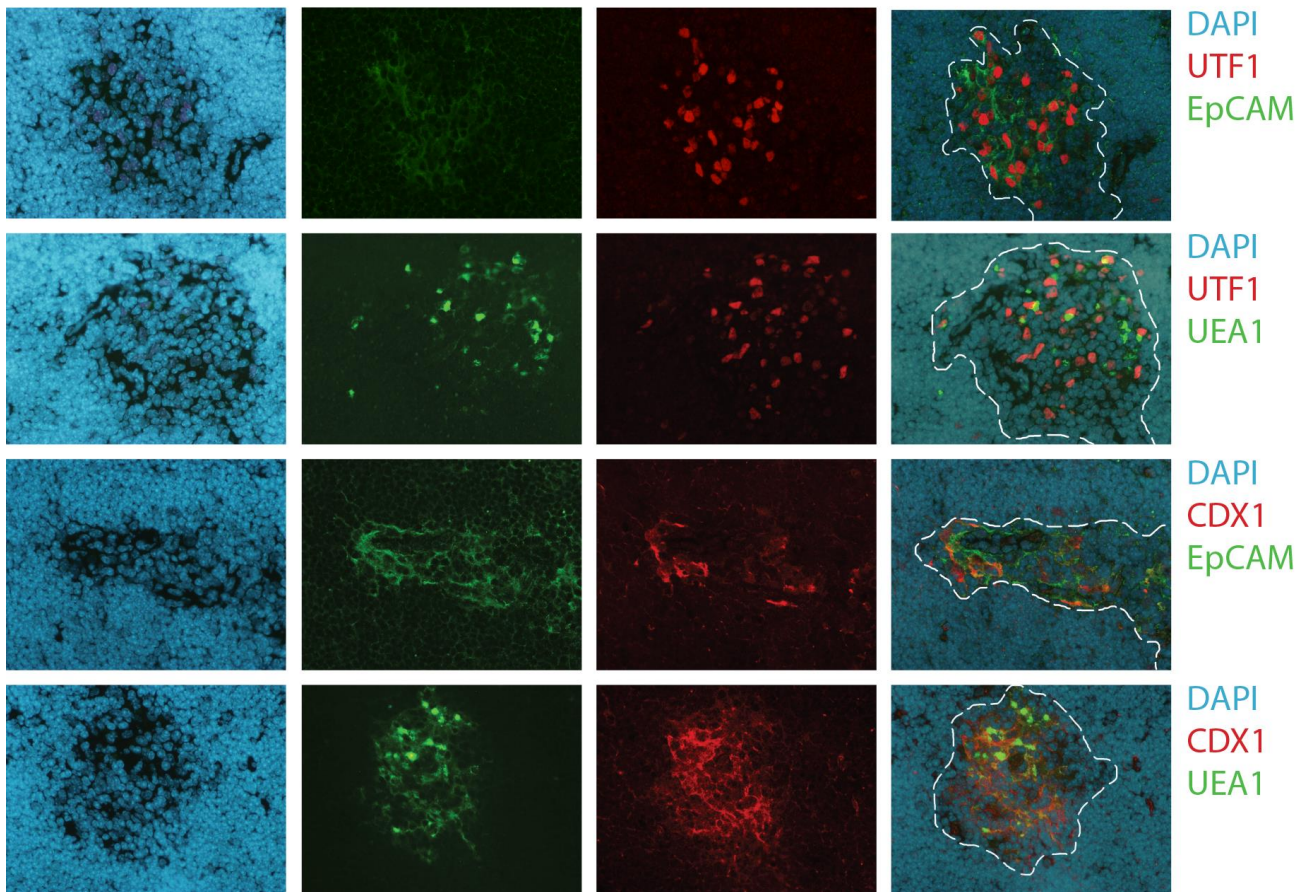
Me leidsime, et *Cdx1*, *Insm1* ja *Utf1* ekspressioon ajas on väga sarnase *Aire* ekspressiooni mustriga (Joonis 10). Kuue tunni möödudes RANKL stimulatsiooni algust oli geeniekspressiooni taseme muutus väga väike või olematu kõikide uuritud geenide puhul: *Aire* ja *Cdx1* ekspressiooni tase tõusis ligikaudu kaks korda, samas kui *Insm1* ja *Utf1* ekspressioon jäi sisuliselt muutumatuks. Märkimisväärne tõus geeniekspressioonis avaldus kõikide geenide puhul 24h pärast stimulatsiooni RANK ligandiga ning tõusutrend jätkus võimsalt ka 48h pärast stimulatsiooni algust.



### Joonis 10.

*Aire*, *Cdx1*, *Insm1* ja *Utf1* suhteline ekspressioon FTOCis 48 tunni jooksul pärast RANKL stimulatsiooni algust. Kujutatud on suhteline ekspressioon stimuleerimata kontrolli suhtes, mis on normeeritud CK-8 järgi. Tulemused on kolme eraldiseisva bioloogilise replikaadi keskmine, veapiiridena on välja toodud ühekordne standardviga.

Lõpuks soovisime me uurida *Cdx1*, *Insm1* ja *Utf1* ekspressiooni tuumuses valgu tasemel. Me analüüsisime UTF1, CDX1 ja INSM1 ekspressiooni tuumuses immunofluorestsents mikroskoopiaga ning uurisime selle ko-lokalisatsiooni säsi markeritega UEA1 ja EpCAM. Me nägime, et UTF1 signaal oli lokaliseeritud ühtlaselt üle raku tuuma, samas kui CDX1 ei andnud nii spetsiifilist mustrit, kuid signaal oli sellegipoolest spetsiifiliselt lokaliseeritud tuumuse säsi piirkondadesse. Nii UTF1 kui ka CDX1 ekspressioon langes kokku UEA1 ja EpCAM ekspressiooniga (Joonis 11), mis kinnitab, et tegu on küpsetes mTECides ekspresseeritud transkriptsioonifaktoritega. Paraku, vaatamata ulatuslikule optimeerimisele, ei suutnud me visualiseerida INSM1, kasutades kommertsiaalselt saadavaid antikehasid, ja selle geeni ekspressiooni kirjeldamine jäi mRNA tasemele (vt ülevalt, lk. 29-31).



**Joonis 11.**

UTF1 ja CDX1 ko-lokalisatsioon UEA1 ja EpCAM ekspressiooniga hiire tuumuses. Kolme nädala vanuse hiire tuumuse lõigud värviti lisaks UTF1/CDX1 vastasele antikehale EpCAM vastase antikeha või UEA1-FITC konjugaadiga. On näha, et UTF1 ja CDX1 ekspressioon langeb kokku UEA1 ja EpCAM ekspressiooniga, mis annab edasist kinnitust, et tegu on küpses mTECis ekspresseeritud transkriptsioonifaktoritega. Parempoolsetel paneelidel on punktiiriga tähistatud säsi ligikaudsed piirid.



# Arutelu

Kuigi erinevate TNF perekonna ligandide funktsioon tuumuse epiteeli küpsemises on praeguseks osaliselt teada, on siiani täiesti ebaselge, milliste mehhanismide kaudu see toimub ja millised geenid sellesse protsessi panustavad. Siiani pole olnud ühtegi uuringut, mis oleks võimaldanud laiaulatuslikult leida kindlate TNFSF liikmete poolt spetsiifiliselt reguleeritud gene. Meie poolt läbiviidud stimulatsioonikatsed ja edasine mikrokiibi analüüs on esimene teaduslik uuring, mis on taolisel kujul võimaldanud uurida mitmete TNFSF ligandide poolt reguleeritud gene, nende kattuvust ja erinevusi kogu genoomi ulatuses tuumuses.

Me leidsime, et kõikide uuritud TNFSF ligandide (RANKL, CD40L, TNF $\alpha$ , LIGHT ja  $\alpha$ LT $\beta$ R) vahendatud signaalid suudavad efektiivselt indutseerida ja vaigistada paljude geenide ekspressiooni tuumuses. Stimulatsioonide tulemusena tõusnud ja langenud ekspressioonis tasemega geenide arv on uuritud TNFSF ligandidega küllalt erinev. Geenid, mille ekspressioon on tugevalt üles- või alla reguleeritud (üle 5 korra võrreldes stimuleerimata kontrolliga), on selgelt suures vähemuses, moodustades alla viiendiku (18,9%) kõikidest indutseeritud ja alla kümnendiku (7%) kõikidest vaigistatud geenidest. Selle põhjal võib järeldada, et tuumuses on tegu eeskätt geeniekspressiooni taset positiivselt reguleerivate signaalidega. RANK, TNFR ja LT $\beta$ R signaliseerimise tulemusena indutseeriti paljude kemokiinide ekspressioon. RANKL indutseeris vaid kahe kemokiini ekspressiooni – CCL5 ja CXCL10 samas kui kõige võimsam kemokiinide ekspressiooni indutseerija oli TNF $\alpha$ , millega tõusis kokku 15 kemokiini ekspressioon. Viie kemokiini ekspressiooni reguleeris lümfotoksiin beeta, nende hulgas tühotsüütide korrektse migratsiooni seisukohast üliolulised CCL19 ja CCL21, mis on heas kooskõlas eelnevate uuringutega (Seach jt., 2008).

TNF $\alpha$  poolt reguleeritud geenide koguse juures on märkimisväärne, et TNFR1 KO hiirel ei ole kirjeldatud tuumuse anomaaliaid ning TNF $\alpha$  KO hiire tuumuses on siiani leitud vaid minimaalsed erinevused võrreldes metsiktüüpi loomadega. Võimalik, et kuigi tuumuses on TNF $\alpha$  selgelt võimeline reguleerima paljude geenide ekspressiooni, ei osale see füsioloogilises olukorras mingil põhjusel tuumuse organogeneesis ja homöostaasis ning on oluline vaid põletikuliste protsesside indutseerimisel ja reguleerimisel.

Huvitaval kombel ei tuvastanud me antud katses ei RANKL ega teiste stimulantidega märkimisväärselt koetsiifiliste antigeenide ekspressiooni tõusu. Sellele on kaks potentsiaalset seletust: esiteks on enamiku TSAde ekspressioon väga madal ja nende ekspressiooni tase ei ole taolises süsteemis detekteeritav ekspressioonikiibiga. Kiibi tundlikkus ei ole sama hea kui kvantitatiivsel polümeraasi ahelreaktsioonil, millega TSA ekspressiooni induktsioon RANKL stimulatsiooniga on selgelt tuvastatav (avaldamata andmed). Teiseks põhjuseks võib olla ajapunkti valik. Suur osa TSAdest on AIRE poolt reguleeritud ning kui *Aire* ekspressioon indutseeritakse märkimisväärsel tasemel alles 24h möödudes RANKL stimulatsiooni algusest, ei pruugi järgnevat 24h olla piisavalt pikk aeg, et TSAde transkriptsioon algaks märkimisväärse efektiivsusega.

Samuti viisime me läbi ko-stimulatsioonid, kus lisaks RANK ligandile lisati söötmesse CD40L või  $\alpha$ LT $\beta$ R. Mõlemal juhul suurenes summaarselt ekspresseeritud geenide arv võrreldes pelgalt RANKL stimulatsiooniga. Samas jäi CD40L lisamisel sisuliselt muutumatuks geenide arv, mis oleks spetsiifiliselt indutseeritud võrreldes teiste TNFSF ligandidega (17 RANKL ja 16 RANKL+CD40L puhul). Seevastu RANKL ja  $\alpha$ LT $\beta$ R ko-stimulatsioonil indutseeriti teiste stimulantidega võrreldes märkimisväärselt suurema arvu geenide ekspressiooni (44). Nende hulgas oli ka 7 geeni, mille ekspressioon ei olnud eraldi indutseeritud ei RANKL ega  $\alpha$ LT $\beta$ R poolt, mis viitab asjaolule, et osade geenide ekspressiooniks tuumuses on vajalik mitme signaali koostoime.

Üheks antud töö eesmärgiks oli tuvastada tuumuses spetsiifiliselt RANKL poolt indutseeritud geenid. Me leidsime, et kokku 72 RANKL stimulatsiooni tagajärjel tõusnud ekspressionitasemega geenist on 15 unikaalsed, mille ekspressioon ei olnud muutunud ühegi teise uuritud TNFSF ligandiga. Sellest võib järeldada, et tuumuses langevad erinevate TNFSF ligandide poolt indutseeritud geenid väga suures osas kokku. See seletab ka üksikute TNF perekonna ligandide või retseptoride suhtes puudulike hiirte võrdlemisi leebet fenotüüpi võrreldes loomadega, kellel puuduvad mitu funktsionaalset retseptorit/ligandi.

15 RANKL poolt spetsiifiliselt indutseeritud ekspressiooniga geenist kolmandiku moodustasid erinevad transkriptsioonifaktorid, mis võib viidata RANKL seni arvatust veel olulisemale rollile tuumuse epiteeli geeniekspressiooni regulatsioonis. Kolme nendest – *Cdx1*, *Insm1* ja *Utf1*, pole seni tuumuse kontekstis kirjeldatud. Derbinski jt. (2005) poolt läbiviidud mikrokiibi analüüsi tulemused viitasid nende kõrgeenenud ekspressioonile tuumuse säsi epiteelis, millest lähtuvalt võtsime me eesmärgiks kirjeldada täpsemalt nende kolme geeni ekspressioonimustrit tuumuses.

*Cdx1*, *Insm1* ja *Utf1* mRNA ekspressioonimuster kattus täielikult nii omavahel kui ka *Aire* ekspressiooniga. Ükski nendest ei ole reguleeritud *Aire* poolt, kuna nende kolme geeni ekspressioon metsiktüüpi ja *Aire* KO hiire tüümuses on praktiliselt identne. Kõik kolm on valdavalt ekspresseeritud tüümuse säsis ja spetsiifilisemalt küpsetes mTECides. UTF1 ja CDX1 puhul õnnestus meil ka näidata valgu paiknemist spetsiifiliselt tüümuse säsis ning ekspressiooni ko-lokalisatsiooni mTEC markeritega UEA1 ja EpCAM.

*Cdx1*, *Insm1*, *Utf1* ja *Aire* ekspressioon on vastusena RANKL stimulatsioonile ajas väga sarnane. Kuigi need tulemused otseselt ei näita, et tegu võiks olla *Aire* ekspressiooni indutseerivate faktoritega, jätab see võimaluse, et CDX1, INSM1 ja UTF1 võivad töötada *Aire* ekspressiooni regulaatoritena hilisemas ekspressiooni järgus. Kõigi kolme geeni mRNA on tüümuses tuvastatav nii embrüonaalses eas kui ka sünnijärgselt, mille põhjal saab oletada, et tegu ei ole geenidega, mis reguleeriksid ainult ühte kindlat faasi tüümuse organogeneesis. Et selgitada välja nende faktorite roll mTEC küpsemise ja *Aire* ekspressiooni regulatsioonis, on edaspidi vaja läbi viia üle-ekspressiooni või vaigistamise katseid *in vitro* ja/või *in vivo* spetsiifiliste *knock-out* hiirtega. Oluline on tuvastada, milliste geenide regulatsioonis antud transkriptsioonifaktorid osalevad, et saaks teha järeldusi nende funktsiooni kohta tüümuse epiteelis.

Kokkuvõttes oleme me tuvastanud kolm tüümuse kontekstis uut, spetsiifiliselt RANKL poolt indutseeritud ekspressiooniga transkriptsioonifaktorit, mille ekspressioonimustri põhjal on tõenäoline, et tegu võiks olla oluliste mTEC geeniekspressiooni regulaatoritega. Edasiste uurimuste eesmärgiks sellel teemal peaks olema välja selgitada nende konkreetne funktsioon tüümuse säsis.

# Kokkuvõte

Tüümus on primaarne lümfoidorgan, kus mitmete rakutüüpide poolt loodud keerukas keskkond on aluseks T-rakulise immuunsuse kujunemisele. Autoimmuunsuse ärahoidmise seisukohast on tüümuses üliolulised säsi epiteeli rakud (mTECid), mis viivad läbi arenevate lümfotsüütide negatiivset selektsiooni ja sellega tagavad, et autoreaktiivsed T-rakud ei pääseks perifeersesse vereringesse. Negatiivse selektsiooni läbiviimiseks on võimelised ainult küpsed säsi epiteeli rakud ja mitmed viimase aja uuringud on keskendunud signaalidele, mis vastutavad mTECide küpsemise regulatsiooni eest. Praeguseks on suudetud tuvastada, et selles protsessis mängivad olulist rolli mitmed TNF perekonna retseptorid ja ligandid, kuid teadmised nende täpse rolli kohta tüümuses on siiani väga puudulikud.

Meie eesmärkideks oli:

- tuvastada TNF perekonna retseptorite RANK, CD40, TNFR1 ja LT $\beta$ R kaudu vahendatud signaalide poolt indutseeritud geenid tüümuse epiteelis;
- kuna RANK signaliseerimisele on omistatud mTECide arengus väga oluline roll, soovisime me kindlaks teha tüümuses spetsiifiliselt RANKL poolt indutseeritud geenid ning
- nende hulgast leida võimalikud mTEC küpsemist reguleerivad faktorid ja kirjeldada nende ekspressioonimustrit tüümuses.

Me leidsime, et erinevad TNF perekonna ligandid indutseerivad tüümuses kümnete kuni sadade geenide ekspressiooni. Paljud erinevate ligandide poolt indutseeritud geenidest langevad kokku, mis viitab, et eksisteerivad mehhanismid üksikute geenide defektide osaliseks kompenseerimiseks ning märklaudgeenide mitmekülgseks regulatsiooniks. Me tuvastasime 15 spetsiifiliselt RANK-RANKL signaliseerimise tulemusena indutseeritud geeni, mille seast valisime edasiseks uurimiseks välja kolm transkriptsioonifaktorit (*Cdx1*, *Insm1* ja *Utf1*), mida polnud eelnevalt tüümuse kontekstis kirjeldatud. Nende ekspressioonimustri analüüsimisel selgus, et tegu on spetsiifiliselt küpses tüümuse säsi epiteelis ekspresseeritud geenidega, mis ei ole autoimmuunregulaatori (*Aire*) kontrolli all.

Kokkuvõttes oleme me oma töö tulemusena tuvastanud kolm tüümuses seni kirjeldamata transkriptsioonifaktorit, mis on spetsiifiliselt RANK-RANKL signaliseerimise peale indutseeritud tüümuse säsi epiteelis. Nende ekspressioonimustri põhjal võib oletada, et tegu on mTECide küpsemises oluliste geenidega, kuid nende funktsiooni väljaselgitamiseks on vajalikud edasised uuringud.

# Identifying new RANKL induced transcription factors in medullary thymic epithelial cells

Rudolf Bichele

Summary

The thymus is a primary lymphoid organ, where various cell types create a complex microenvironment for T-cell development. Medullary thymic epithelial cells (mTECs), which express a large variety of tissue restricted antigens and present them to developing lymphocytes during the process of thymic negative selection, are especially important in preventing autoimmunity through regulation of T-cell development. Mature mTECs are crucial for proper negative selection to take place, which is why many recent studies have concentrated on cellular signals driving mTEC maturation. It has been shown that several receptors and ligands of the TNF superfamily (TNFSF) are needed for proper mTEC development. However, knowledge of their exact roles in regulating thymic epithelial cell gene expression is mostly lacking.

Therefore, the aims of this study were as follows:

- Use microarray analysis to identify the genes induced by RANK, TNFR1, CD40 and LT $\beta$ R signaling.
- Identify genes specifically induced by RANK-RANKL signaling, due to its key role in mature mTEC development.
- Out of the genes induced specifically by RANKL, we aimed to choose potential regulators of mTEC development and describe their expression pattern within the thymus.

We found that different TNFSF ligands induced the expression of tens to hundreds of genes, including many thymic chemokines. We observed a largely overlapping lists of genes regulated by various ligands, which suggests that single gene defects can largely be compensated by other signals and that there exists a complex regulatory network for target gene expression. We identified 15 genes specifically induced by RANKL, out of which three transcription factors (*Cdx1*, *Insm1* and *Utf1*) were chosen for further analysis, which revealed that all were specifically expressed in mature mTECs independent of *Aire* expression.

In conclusion we have identified three transcription factors: *Cdx1*, *Insm1* and *Utf1* that have previously not been described in the thymus. We show that in the thymus they are specifically regulated by RANK-RANKL signaling and are expressed independent of *Aire* in mature mTECs. According to these data it can be assumed that they may play a role in mTEC maturation, albeit their exact role is yet to be determined and should be further analyzed in following studies.

# Kasutatud kirjandus

- Aggarwal, BB., Gupta, SC., Kim, JH. (2012). Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood*. 119(3):651-65
- Akiyama, T., Maeda, S., Yamane, S., Ogino, K., Kasai, M., Kajiura, F., Matsumoto, M., Inoue, J. (2005). Dependence of self-tolerance on TRAF6- directed development of thymic stroma. *Science* 308: 248–251.
- Akiyama, T., Shimo, Y., Yanai, H., Qin, J., Ohshima, D., Maruyama, Y., Asaumi, Y., Kitazawa, J., Takayanagi, H., Penninger, J. M., Matsumoto, M., Nitta, T., Takahama, Y., Inoue, J. (2008). The Tumor Necrosis Factor Family Receptors RANK and CD40 Cooperatively Establish the Thymic Medullary Microenvironment and Self-Tolerance *Immunity*. 29(3): 423-437
- Akiyama, T., Shinzawa, M., Akiyama, N. (2012). TNF receptor family signaling in the development and functions of medullary thymic epithelial cells. *Front Immunol*. 3:278.
- Alimohammadi, M., Björklund, P., Hallgren, A., Pöntynen, N., Szinnai, G., jt. (2008). Autoimmune polyendocrine syndrome type 1 and NALP5, a parathyroid autoantigen. *N Engl J Med*. 358(10):1018-28.
- Anderson, MS., Venanzi, ES., Klein, L., Chen, Z., Berzins, SP., et al. (2002). Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science* 298: 1395–401
- Aoki, S., Honma, M., Kariya, Y., Nakamichi, Y., Ninomiya, T., Takahashi, N., Udagawa, N., Suzuki, H. (2010). Function of OPG as a traffic regulator for RANKL is crucial for controlled osteoclastogenesis. *J Bone Miner Res*. 25(9):1907-21.
- Betterle, C., Dal Pra, C., Mantero, F., Zanchetta, R. (2002) Autoimmune adrenal insufficiency and autoimmune polyendocrine syndromes: autoantibodies, autoantigens, and their applicability in diagnosis and disease prediction. *Endocr. Rev*. 23(3):327–364.
- Bleul, CC., Boehm, T. (2000). Chemokines define distinct microenvironments in the developing thymus. *Eur J Immunol*. 30(12):3371-9.
- Boehm, T., Scheu, S., Pfeffer, K., Bleul, CC. (2003). Thymic medullary epithelial cell differentiation, thymocyte emigration, and the control of autoimmunity require lympho-epithelial cross talk via LTbetaR. *J Exp Med*. 198(5):757-69.

- Boehmer, H., Aifantis, I., Gounari, F., Azogui, O., Haughn, L., Apostolou, I., Jaeckel, E., Grassi, F., Klein, L. (2003). Thymic selection revisited: how essential is it? *Immunol Rev.* 191: 62-78.
- Bonfanti, P., Claudinot, S., Amici, A. W., Farley, A., Blackburn, C. C. and Barrandon, Y., (2010). Microenvironmental reprogramming of thymic epithelial cells to skin multipotent stem cells. *Nature* 466: 978–982.
- Browning, JL., Ngam-ek, A., Lawton, P., DeMarinis, J., Tizard, R., Chow, EP., Hession, C., O'Brine-Greco, B., Foley, SF., Ware, CF. (1993). Lymphotoxin beta, a novel member of the TNF family that forms a heteromeric complex with lymphotoxin on the cell surface. *Cell.* 72(6):847-56.
- Burkly, L., Hession, C., Ogata, L., Reilly, C., Marconi, LA., Olson, D., Tizard, R., Cate, R., Lo, D. (1995). Expression of relB is required for the development of thymic medulla and dendritic cells. *Nature.* 373(6514):531-6.
- Coope, HJ., Atkinson, PG., Huhse, B., Belich, M., Janzen, J., Holman, MJ., Klaus, GG., Johnston, LH., Ley, SC. (2002). CD40 regulates the processing of NF-kappaB2 p100 to p52. *EMBO J.* 21(20):5375-85.
- Dejardin, E., Droin, NM., Delhase, M., Haas, E., Cao, Y., Makris, C., Li, ZW., Karin, M., Ware, CF., Green, DR. (2002). The lymphotoxin-beta receptor induces different patterns of gene expression via two NF-kappaB pathways. *Immunity.* 17(4):525-35.
- Derbinski, J., Gäbler, J., Brors, B., Tierling, S., Jonnakuty, S., Hergenahn, M., Peltonen, L., Walter, J., Kyewski, B. (2005). Promiscuous gene expression in thymic epithelial cells is regulated at multiple levels. *J Exp Med.* 202(1): 33-45.
- Desanti, GE., Cowan, JE., Baik, S., Parnell, SM., White, AJ., Penninger, JM., Lane, PJ., Jenkinson, EJ., Jenkinson, WE., Anderson, G. (2012). Developmentally regulated availability of RANKL and CD40 ligand reveals distinct mechanisms of fetal and adult cross-talk in the thymus medulla. *J Immunol.* 189(12):5519-26.
- Dougall, WC., Glaccum, M., Charrier, K., Rohrbach, K., Brasel, K., De Smedt, T., Daro, E., Smith, J., Tometsko, ME., Maliszewski, CR., Armstrong, A., Shen, V., Bain, S., Cosman, D., Anderson, D., Morrissey, PJ., Peschon, JJ., Schuh, J. (1999). RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes Dev.* 13(18):2412-24.
- Dunn, RJ., Luedeker, CJ., Haugen, HS., Clegg, CH., Farr, AG. (1997). Thymic overexpression of CD40 ligand disrupts normal thymic epithelial organization. *J Histochem Cytochem.* 45(1):129-41.

- Elgueta, R., Benson, MJ., de Vries, VC., Wasiuk, A., Guo, Y., Noelle, RJ. (2009). Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunol Rev.* 229(1):152-72.
- Finnish-German APECED Consortium (1997). "An autoimmune disease, APECED, caused by mutations in a novel gene featuring two PHD-type zinc-finger domains." *Nat Genet* 17(4): 399-403.
- Gray, DH., Seach, N., Ueno, T., Milton, MK., Liston, A., Lew, AM., Goodnow, CC., Boyd, RL. (2006). Developmental kinetics, turnover, and stimulatory capacity of thymic epithelial cells. *Blood.* 108(12):3777-85.
- Hamazaki, Y., Fujita, H., Kobayashi, T., Choi, Y., Scott, HS., Matsumoto, M., Minato, N. (2007). Medullary thymic epithelial cells expressing Aire represent a unique lineage derived from cells expressing claudin. *Nat Immunol.* 8(3):304-11.
- Hayden, MS., Ghosh, S. (2004). Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev.* 18(18):2195-224.
- Hikosaka, Y., Nitta, T., Ohigashi, I., Yano, K., Ishimaru, N., Hayashi, Y., Matsumoto, M., Matsuo, K., Penninger, JM., Takayanagi, H., Yokota, Y., Yamada, H., Yoshikai, Y., Inoue, J., Akiyama, T., Takahama, Y. (2008). The cytokine RANKL produced by positively selected thymocytes fosters medullary thymic epithelial cells that express autoimmune regulator. *Immunity.* 29(3):438-50.
- Hubert, FX., Kinkel, SA., Crewther, PE., Cannon, PZ., Webster, KE., Link, M., Uibo, R., O'Bryan, MK., Meager, A., Forehan, SP., Smyth, GK., Mittaz, L., Antonarakis, SE., Peterson, P., Heath, WR., Scott, HS. (2009). Aire-deficient C57BL/6 mice mimicking the common human 13-base pair deletion mutation present with only a mild autoimmune phenotype. *J Immunol.* 182(6):3902-18.
- Kajiura, F., Sun, S., Nomura, T., Izumi, K., Ueno, T., Bando, Y., Kuroda, N., Han, H., Li, Y., Matsushima, A., et al. (2004). NF-kB-inducing kinase establishes selftolerance in a thymic stroma-dependent manner. *J. Immunol.* 172: 2067–2075.
- Karin, M. (1999). The beginning of the end: IkappaB kinase (IKK) and NF-kappaB activation. *J Biol Chem.* 274(39):27339-42.
- Kim, D., Mebius, RE., MacMicking, JD., Jung, S., Cupedo, T., Castellanos, Y., Rho, J., Wong, BR., Josien, R., Kim, N., Rennert, PD., Choi, Y. (2000). Regulation of peripheral lymph node genesis by the tumor necrosis factor family member TRANCE. *J Exp Med.* 192(10):1467-78.



- Kisand, K., Bøe Wolff, AS., Podkrajsek, KT., Tserel, L., Link, M., Kisand, KV., Ersvaer, E., Perheentupa, J., Erichsen, MM., Bratanic, N., jt. (2010). Chronic mucocutaneous candidiasis in APECED or thymoma patients correlates with autoimmunity to Th17-associated cytokines. *J Exp Med.*207(2):299-308.
- Kong, YY., Yoshida, H., Sarosi, I., Tan, HL., Timms, E., Capparelli, C., Morony, S., Oliveirados-Santos, AJ., Van, G., Itie, A., Khoo, W., Wakeham, A., Dunstan, CR., Lacey, DL., Mak, TW., Boyle, WJ., (1999). Penninger, JM. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature.* 397(6717):315-23.
- Kyewski, B., Klein, L. (2006) A central role for central tolerance. *Annu Rev Immunol.* 24:571-606.
- Laan, M., Kisand, K., Kont, V., Möll, K., Tserel, L., Scott HS., Peterson, P. (2009) Autoimmune Regulator Deficiency Results in Decreased Expression of CCR4 and CCR7 Ligands and in Delayed Migration of CD4+ Thymocytes *J. Immunol.* 183(12): 7682-91.
- Levi, D., Polychronakos, C. (2013). Self-antigen expression in thymic epithelial cells in Ifn- $\gamma$  or Tnf- $\alpha$  deficiency. *Cytokine.* 62(3):433-8.
- Lind, EF., Prockop, SE., Porritt, HE., Petrie, HT. (2001). Mapping precursor movement through the postnatal thymus reveals specific microenvironments supporting defined stages of early lymphoid development. *J Exp Med.* 194(2):127-34
- Liu, C., Ueno, T., Kuse, S., Saito, F., Nitta, T., Piali, L., Nakano, H., Kakiuchi, T., Lipp, M., Hollander, GA., Takahama, Y. (2005). The role of CCL21 in recruitment of T-precursor cells to fetal thymi. *Blood.* 105(1):31-9.
- Meager, A., Visvalingam, K., Peterson, P., Möll, K., Murumägi, A., Krohn, K., Eskelin, P., Perheentupa, J., Husebye, E., Kadota, Y., Willcox, N. (2006). Anti-interferon autoantibodies in autoimmune polyendocrinopathy syndrome type 1. *PLoS Med.* 3(7):e289.
- Mouri, Y., Yano, M., Shinzawa, M., Shimo, Y., Hirota, F., Nishikawa, Y., Nii, T., Kiyonari, H., Abe, T., Uehara, H., Izumi, K., Tamada, K., Chen, L., Penninger, J. M., Inoue, J., Akiyama, T., Matsumoto, M. (2011). Lymphotoxin Signal Promotes Thymic Organogenesis by Eliciting RANK Expression in the Embryonic Thymic Stroma. *J Immunol.* 186(9): 5047-5057
- Nagamine, K., Peterson, P., Scott, HS. et al. (1997). Positional cloning of the APECED gene. *Nat Genet.* 17: 393–398

- Nelson, AJ., Dunn, RJ., Peach, R., Aruffo, A., Farr, AG. (1996). The murine homolog of human Ep-CAM, a homotypic adhesion molecule, is expressed by thymocytes and thymic epithelial cells. *Eur J Immunol.* 26(2):401-8.
- Novack, DV., Yin, L., Hagen-Stapleton, A., Schreiber, RD., Goeddel, DV., Ross, FP., Teitelbaum, SL. (2003). The IkappaB function of NF-kappaB2 p100 controls stimulated osteoclastogenesis. *J Exp Med.* 198(5):771-81.
- Perheentupa, J. (2006). Autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy. *J Clin Endocrinol Metab.* 91(8):2843-50.
- Pfeffer, K., Matsuyama, T., Kündig, TM., Wakeham, A., Kishihara, K., Shahinian, A., Wiegmann, K., Ohashi, PS., Krönke, M., Mak, TW. (1993). Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to L. monocytogenes infection. *Cell.* 73(3):457-67.
- Puel, A., Döffinger, R., Natividad, A., Chrabieh, M., Barcenas-Morales, G., jt. (2010). Autoantibodies against IL-17A, IL-17F, and IL-22 in patients with chronic mucocutaneous candidiasis and autoimmune polyendocrine syndrome type I. *J Exp Med.* 207(2):291-7.
- Randall, TD., Carragher, DM., Rangel-Moreno, J. (2008). Development of secondary lymphoid organs. *Annu Rev Immunol.* 26: 627–650.
- Reimand, K., Perheentupa, J., Link, M., Krohn, K., Peterson, P., Uiho, R. (2008). Testis-expressed protein TSGA10 an auto-antigen in autoimmune polyendocrine syndrome type I. *Int Immunol.* 20(1):39-44.
- Roach, DR., Bean, AG., Demangel, C., France, MP., Briscoe, H., Britton, WJ. (2002). TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection. *J Immunol.* 168(9):4620-7.
- Romas, E. (2009). Clinical applications of RANK-ligand inhibition. *Intern Med J.* 39(2):110-6.
- Roberts, NA., White, AJ., Jenkinson, WE., Turchinovich, G., Nakamura, K., Withers, DR., McConnell, FM., Desanti, GE., Benezech, C., Parnell, SM., Cunningham, AF., Paolino, M., Penninger, JM., Simon, AK., Nitta, T., Ohigashi, I., Takahama, Y., Caamano, JH., Hayday, AC., Lane, PJ., Jenkinson, EJ., Anderson, G. (2012). Rank signaling links the development of invariant  $\gamma\delta$  T cell progenitors and Aire(+) medullary epithelium. *Immunity.* 36(3):427-37.
- Rossi, S. W., Kim, M. Y., Leibbrandt, A., Parnell, S. M., Jenkinson, W. E., Glanville, S. H., McConnell, F. M. et al. (2007). RANK signals from CD4+3- inducer cells regulate

- development of Aire-expressing epithelial cells in the thymic medulla. *J. Exp. Med.* 204: 1267–1272.
- Rossi, FM., Corbel, SY., Merzaban, JS., Carlow, DA., Gossens, K., Duenas, J., So, L., Yi, L., Ziltener, HJ. (2005). Recruitment of adult thymic progenitors is regulated by P-selectin and its ligand PSGL-1. *Nat Immunol.* 6(6):626-34.
- Schneider, K., Potter, KG., Ware, CF. (2004). Lymphotoxin and LIGHT signaling pathways and target genes. *Immunol Rev.* 202:49-66.
- Seach, N., Ueno, T., Fletcher, AL., Lowen, T., Mattesich, M., Engwerda, CR., Scott, HS., Ware, CF., Chidgey, AP., Gray, DH., Boyd, RL. (2008). The lymphotoxin pathway regulates Aire-independent expression of ectopic genes and chemokines in thymic stromal cells. *J Immunol.* 180(8): 5384-92.
- Ueno, T., Saito, F., Gray, DH., Kuse, S., Hieshima, K., Nakano, H., Kakiuchi, T., Lipp, M., Boyd, RL., Takahama, Y. (2004) CCR7 signals are essential for cortex-medulla migration of developing thymocytes. *J Exp Med.* 200(4):493-505.
- Vallabhapurapu, S., Karin, M. (2009). Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol.* 27:693-733.
- Wang, X., Laan, M., Bichele, R., Kisand, K., Scott, HS., Peterson, P. (2012). Post-Aire maturation of thymic medullary epithelial cells involves selective expression of keratinocyte-specific autoantigens. *Front Immunol.* 3(March):19.
- Wurbel, MA., Malissen, M., Guy-Grand, D., Meffre, E., Nussenzweig, MC., Richelme, M., Carrier, A., Malissen, B.(2001). Mice lacking the CCR9 CC-chemokine receptor show a mild impairment of early T- and B-cell development and a reduction in T-cell receptor gammadelta(+) gut intraepithelial lymphocytes. *Blood.* 98(9):2626-32.
- Zhai, Y., Guo, R., Hsu, TL., Yu, GL., Ni, J., Kwon, BS., Jiang, GW., Lu, J., Tan, J., Ugustus, M., Carter, K., Rojas, L., Zhu, F., Lincoln, C., Endress, G., Xing, L., Wang, S., Oh, KO., Gentz, R., Ruben, S., Lippman, ME., Hsieh, SL., Yang, D. (1998). LIGHT, a novel ligand for lymphotoxin beta receptor and TR2/HVEM induces apoptosis and suppresses in vivo tumor formation via gene transfer. *J Clin Invest.* 102(6):1142-51.

## Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Rudolf Bichele  
(sünd. 05. juuli 1989)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihlitsentsi) enda loodud teose

*RANKL poolt indutseeritud transkriptsioonifaktorite tuvastamine tüümuse epiteelis*  
*Identifying new RANKL induced transcription factors in medullary thymic epithelial cells*

mille juhendajad on Martti Laan ja Sulev Kuuse

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

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **01.01.2016** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

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

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

Tartus, 27.05.2013 (*kuupäev*)