

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

MEDITSIINITEADUSTE VALDKOND
BIO- JA SIIRDEMEDITSIINI INSTITUUT
PATOÜSIOLOOGIA ÕPPETOOL

**Inimese endogeensete retroviiruste geeni- ja HERV-W valguekspressiooni
analüüs psoriaatilises ja terves nahas**

Magistritöö (30 EAP)
Geenitehnoloogia

Martin Kala

Juhendajad
Prof Sulev Kõks
Prof Margus Pooga

TARTU 2017

Inimese endogeensete retroviiruste geeni- ja HERV-W valguekspressiooni analüüs psoriaatilises ja terves nahas

Võimalikud põhjuslikud seosed inimeste endogeensete retroviiruste ning autoimmuunhaiguste ja ka muude patoloogiate vahel on juba mõnda aega andnud alust neid põhjalikult uurida. Paraku on senised tulemused olnud vastukäivad ning viinud kohati rohkemate uute küsimuste kui vastusteni. Selles töös uuriti erinevate molekulaarsete meetoditega meie uurimisgrupis varem teostatud kogu psoriaatiliste kudede RNA sekveneerimise andmete baasil enim huvi pakkunud HERV geenide ekspressiooni lööbelise ja mittelööbelise psoriaasiga ning ka terves nahas. Lisaks mõõdeti kahe varem psoriaasiga seostatud geeni ekspressiooni ning visualiseeriti HERV-W *env* valgu ekspressioon immunofluorestsentsmeetodil. Enamjaolt korreleerusid tulemused varem kirjeldatud nähtuse ning hüpoteesiga, et HERV geenid on erinevate autoimmuunsete haiguste korral põletikuliste reaktsioonide moduleerimise kaasmõjul repressseeritud.

Märksõnad: geeniekspressioon, endogeensed retroviirused, psoriaas, immunofluorestsents
CERCS: B580 Skeleti ja lihassüsteemi haigused, reumatoloogilised haigused

Gene and protein expression analysis of human endogenous retroviruses in psoriatic and healthy skin

Possible causal connections between human endogenous retroviruses and autoimmune diseases among other pathologies has long been an effective argument for the extensive research on this topic. Despite the efforts, studies have shown contradictory results, often leading to more new questions than answers. In this study, we worked on the data of total RNA sequencing previously done by our research group and used several molecular methods to study the expression of a selection of HERV genes in lesional and non-lesional psoriatic skin as well as in healthy skin. In addition, the expression of two genes previously associated with psoriasis was measured and the expression of HERV-W *env* protein was visualised using the immunofluorescence method. The majority of results correlated with the previously described phenomenon and indicated that in case of lesional psoriasis, HERV genes are repressed in the joint influence of the modulation of inflammatory reactions.

Keywords: gene expression, endogenous retroviruses, psoriasis, immunofluorescence
CERCS: B580 Skeleton, muscle system, rheumatology locomotion

Sisukord

Kasutatud lühendid	5
Sissejuhatus	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1.1 Endogeensed retroviirused	7
1.1.1. Struktuur ja regulatsioon	8
1.1.2. HERVide päritolu, avastamine ja klassifikatsioon	10
1.1.3. Ülevaade peamistest HERV perekondadest.....	11
1.1.4. HERVide seos patoloogiatega	12
1.1.5. HERVide seos autoimmunhaigustega.....	13
1.2 Psoriaasi kliinilise pildi ülevaade	18
1.2.1. Psoriaas ja geneetika	20
1.2.2. HERV ja psoriaas.....	20
1.2.3. Senine ravi.....	21
2. EKSPERIMENTAALOSA	22
2.1 Töö eesmärgid.....	22
2.2 Materjal ja meetodika.....	23
2.2.1. cDNA süntees	23
2.2.2. Töös kasutatud praimerid.....	23
2.2.3. Polümeraasi ahelreaktsioonide teostamine	24
2.2.4. DNA geelelektroforees	25
2.2.5. Reaalaja-PCR.....	25
2.2.6. mRNA suhtelise taseme kvantifitseerimine.....	26
2.2.7. Biopsiate kogumine.....	26
2.2.8. Immunofluorestsents.....	27
2.2.9. Tulemuste statistiline analüüs	28
2.3 Tulemused	29
2.3.1. HERV ekspressiooni analüüs DNA geelelektroforeesil	29
2.3.2. HERV ja AVP geenide ekspressiooni analüüs reaalaja PCR meetodil	32
2.3.3. HERV-W <i>env</i> valgu ekspressioon psoriaasiga ning terves nahas.....	35
2.4 Arutelu.....	37
Kokkuvõte.....	41
Gene and protein expression analysis of human endogenous retroviruses in psoriatic and healthy skin	42

Tänuavaldused	43
Kirjanduse loetelu	44
Kasutatud veebiaadressid	55
Lihtlitsents	56

Kasutatud lühendid

AVP	antiviraalse toimega valk (<i>Antiviral Protein</i>)
BSA	veise seerum albumiin (<i>Bovine Serum Albumine</i>)
C	terve kontroll (<i>Control</i>)
env	viiruse kapsiidivalk (<i>envelope</i>)
EPV	Epstein-Barri viirus (<i>Epstein-Barr Virus</i>)
ERV	endogeenne retroviirus (<i>Endogenous Retrovirus</i>)
FCS	vasika loote seerum (<i>Fetal Calf Serum</i>)
gag	retroviiruslik struktuurne valk (<i>Group-specific antigen</i>)
HCV	C-hepatiidi viirus (<i>Hepatitis C Virus</i>)
HERV	inimese endogeenne retroviirus (<i>Human Endogenous Retrovirus</i>)
ICTV	rahvusvahelise viiruste taksonoomia komitee (<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>)
LINE	pikad insertsioonilised harjuskorduselemendid (<i>Long Interspersed Nuclear Elements</i>)
LP	patsiendi lööbeline nahk (<i>Lesional Patient</i>)
LTR	pikad otsmised kordusjärjestused (<i>Long Terminal Repeats</i>)
MHC	peamine koesobivuskompleks (<i>Major Histocompatibility Complex</i>)
MLV	hiireliste leukeemiaviirus (<i>Murine Leukemia Virus</i>)
NLP	visuaalse lööbeta patsiendi nahk (<i>Non-Lesional Patient</i>)
ORF	avatud lugemisraam (<i>Open Reading Frame</i>)
PASI	psoriaatilise lööbe ulatuse hindamiseks kasutatav indeks (<i>Psoriasis Area and Severity Index</i>)
PBS	praimeri seondumissait (<i>Primer Binding Site</i>)
PBSA	fosfaat-puhverdatud soolalahus (<i>Phosphate-Buffered Saline</i>)
PBST	tween-20 lisandiga fosfaat-puhverdatud soolalahus (<i>Phosphate-Buffered Saline with Tween-20</i>)
pol	retroviiruslik pöördtranskriptaase aktiivsusega valk (<i>reverse transcriptase</i>)
PPT	polüpuriinne järjestus (<i>Polypurine Tract</i>)
SLE	süsteemne erütematoosne luupus (<i>Systemic Lupus Erythematosus</i>)
T_m	kaheaheelalise nukleiinhappe sulamistemperatuur (<i>melting temperature</i>)
TNFα	vähi nekroosi faktor α (<i>Tumor Necrosis Factor α</i>)

Sissejuhatus

Autoimmuunse päritoluga haiguste tekkemehhanismid on hoolimata pikkadest ja kestvatest püüdlustest neid mõista veel tänaseni päris täpselt välja selgitamata. Üheks uurimissuunaks nende mõistmisel on olnud kauges evolutsioonilises minevikus inimesi ja nende eellasi nakatanud ning seejärel genoomi integreerunud eksogeensete viiruste otsesed järeltulijad – inimese endogeensed retroviirused ehk HERVid, mis nüüdseks moodustavad keskmiselt kuni 8% meie geneetilisest järjestusest. Kuigi HERVid on neis akumulunud mutatsioonide mõjul valdavas osas inaktiveerunud, kodeerivad paljud neist siiani terviklikke ja funktsionaalseid avatud lugemisraame ning muid aktiivseid elemente, mis võivad avaldada mõju raku normaalsele talitlusele ning selle mõjul viia erinevate patoloogiate kujunemiseni.

Käesolevas töös on lähemalt uuritud HERVide seoseid psoriaasiga, mis on üks levinumaid autoimmuunse päritoluga kroonilisi põletikulisi haigusi maailmas ning mida põeb 2–3% maailma euroopiidse rassi populatsioonist. Kuigi kasutusel on palju erinevaid ravimeid ja meetmeid haiguse leevendamiseks, pole psoriaasile seni selle lõpuni mõistmata tekkemehhanismide tõttu veel lõplikku ravi leitud.

Varasemate uuringute raames, mille eesmärgiks on olnud selgitada HERVide osalust psoriaasi tekkemehhanismides, on täheldatud nendega seoses mitmeid ebakõlasid. Kuid enamjaolt, ning eriti veel viimastel aastatel tänu üha täpsemate ning põhjalikumate meetodite kasutuselevõtule, on kirjeldatud HERV geeniekspressiooni repressiooni haiguse lööbelises keskkonnas võrrelduna visuaalselt terve ja terve kontrolli kudedege. Selle töö peamiseks eesmärgiks oli erinevate molekulaarsete meetoditega analüüsida meie uurimisgrupis varem teostatud psoriaatiliste ja tervete kudede kogu RNA sekveneerimise andmete baasil enim huvi pakkunud HERV geenide ekspressiooni psoriaatilise lööbega ja visuaalselt terves ning ka terves nahas. Lisaks uuriti psoriaatilises nahas kaht varem psoriaasiga seostatud geeni ning analüüsiti HERV-W *env* valgu ekspressiooni. Töös esitatud katsed tehti Tartu Ülikooli bio- ja siirdemeditsiini instituudi patofüsioloogia osakonnas.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Endogeensed retroviirused

Viirused on väga divergentne osa elusloodusest. 2016. aasta seisuga eristab Rahvusvahelise viiruste taksonoomia komitee (*International Committee on Taxonomy of Viruses*, ICTV) kokku 122 perekonda viiruseid (<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>), kuid arvestades osa alamjaotuste äärmiselt kõrget mutatsioonisagedust, on kõikide teadaolevate viiruste liikide arvu keeruline täpselt määratleda. Üheks peamiseks viiruste suure liigilise variatsiooni põhjustajaks teiste RNA viirustega kõrval on sugukonda *Retroviridae* ehk retroviiruste alla kuuluvad perekonnad, mis on oma positiivse polaarsusega mRNA genoomi tõttu sunnitud replitseerumiseks muutma geneetilise informatsiooni loomulikku suunda ehk sünteesima RNA baasil DNAd, kasutades selleks ensüümi nimega pöördtranskriptaas. Võrreldes teiste matriitsreaktsioonidega nagu replikatsioon, transkriptsioon ning translatsioon on see mehhanism aga väga vigaderohke, tehes keskmiselt ühe vea 1700 sünteesitavasse ahelasse lülitatud nukleotiidi kohta ning teatud kõrgema mutatsioonitõenäosusega piirkondades isegi ühe vea 70 nukleotiidi kohta (Roberts jt., 1988).

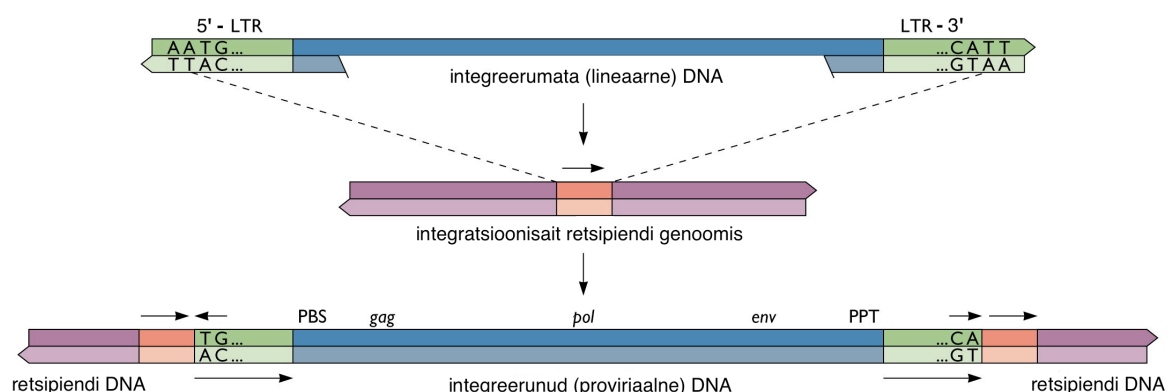
Kehvades keskkonnatingimustes on retroviirused nakkusvalmis viiruspartiklite moodustamise asemel võimelised moodustama ka proviiruseid, mis on suutelised integreeruma peremeesraku genoomi. Sellise viraalse latentsuse vormi teeb eelkõige võimalikuks viiruse enda kodeeritud ensüüm nimega integraas, mis moodustab koos pöördtranskripteeritud viiruse genoomiga preintegratsiooni kompleksi (*preintegration complex*, PIC) ning seejärel transporditakse rakutuuma, kus võimaldab proviirusel lülituda peremeesraku kromosomaalse DNA koosseisu (joonis 1) (Jern ja Coffin, 2008).

Olles esindatud pea kõikides eukarüootides (Koonin jt., 2015), leidub retroviiruseid ka kõikides teadaolevates imetajates (Magiorkinis jt., 2013). Aeg-ajalt nakatavad retroviirused ka idutee rakke, kus proviiruse integreerumise korral kanduvad need ka vastavalt Mendeli geneetika seaduspärasustele edasi järgnevasse põlvkonda ning mida seejärel nimetatakse endogeenseteks retroviirusteks (*endogenous retrovirus*, ERV) (Stoye, 2001; Yohn jt., 2005). Seega on ERVdel proviirusena võime kanduda edasi nii horisontaalselt, nakatades teisi rakke sama organismi ulatuses, kui ka vertikaalselt ehk peremehelt selle järeltulijale, võimaldades nii vähemkahjulikel, neutraalsetel või koguni peremehele kasulikel retroviirustel ajapikku genoomis fikseeruda (Jern ja Coffin, 2008).

ERVd pole imetajate genoomis kaugeltki ainsad transponeeruvad elemendid. Hinnanguliselt 44% meie genoomist koosneb liikuvatest elementidest, mis jaotuvad kolme klassi: retrotransposoonid, DNA transposoonid ning autonoomsed ja mitteautonoomsed elemendid, millest esimesed ning viimased eeldavad oma replikatiivse transpositsiooni toimumiseks pöördtranskriptsiooni toimumist (Mills jt., 2007; Kazazian, 2000). Kõikidest mittekodeerivatest mobiilsetest elementidest on inimese genoomis kuni 90% teatava retroviraalse päritoluga korduvjärjestusi (Löwer jt., 1996), millest 7–8% moodustavad evolutsiooni käigus integreerunud eksogeensete retroviiruste otsesed eelkäijad (Boeke ja Stoye, 1997). Selles kontekstis loetakse need vastavalt ka inimese endogeenseteks retroviirusteks ehk HERVideks (*human endogenous retrovirus*) ning need moodustavad ühe retroviraalse päritoluga elementide grupi koos eksogeensete proviirustega, retrotransposoonide ning retroposoonidega (Blank jt., 2009).

1.1.1. Struktuur ja regulatsioon

Evolutsiooni käigus on inimese genoomis fikseerunud ja seal geneetilisi “fossiile” meenutavad proviirused säilitanud eksogeensete retroviirustega üsnagi sarnase struktuuri, kodeerides endiselt geenidest erinevaid vorme, mis on olnud edukas infektsioonitsüklis kriitilise tähtsusega. Kuna retroviirused toetuvad nakatumisel, paljunemisel ning levimisel suuresti peremeesraku enda molekulaarsetele mehhanismidele, võimaldab see neil omada võrdlemisi minimalistlikku struktuuri, mis põhineb pikkade otsmiste kordusjärjestuste (*long terminal repeats*, LTR) poolt ümbritsetud erinevaid polüproteiine kodeerivatel geenidel *gag*, *pol* ja *env* (Johnson ja Coffin, 1999; Nelson jt., 2003) (Joonis 1).



Joonis 1. Retroviiruste lihtsustatud integratsiooniskeem ja struktuur. LTRid tähistavad pikki otsmiste kordusjärjestusi ja on märgitud vastavalt orientatsioonile genoomis. *Gag*, *pol* ning *env* on retroviirustele omased polüproteiine kodeerivad geenid, PBS tähistab praimerite seandumissaiti (*Primer Binding Site*) ning PPT polüpurinset järjestust (*PolyPurine Tract*). Kujutis on modifitseeritud, originaaljoonis pärineb aadressilt: <http://www.virology.ws/2011/01/04/retroviral-integration-and-the-xmrv-provirus/>.

Kõikide retroviiruste hulgas on tuumikgeenide järjekord äärmiselt konserveerunud, võimaldades neil viiruspartikli valke ekspresseerida õigetes suhtelistes kogustes, mis omakorda tagab viiruspartikli korrektse assambleerumise (Coffin, 1994). Nimetatud järjekorra esimeseks geeniks on *gag* ehk lahtikirjutatuna grupispetsiifiline antigeen (*group-specific antigen*) ja see kodeerib endas sisemise kapsiidi struktuurseid valke; *pol* sisaldab revertaasi, integraasi ning proteaasi ning *env* pealt transleeritakse viiruse välimisi kattevalke (Fujiwara ja Mizuuchi, 1988). Niivõrd kompaktne genoom võimaldab tüüpilisel replikatsioonivõimelisel proviirusel jääda vahemikku 7–11 kbp ning mahtuda ära ~100 nm läbimõõduga kapsiidi (Coffin, 1994). Proviiruse kodeerivaid regioone ümbritsevad LTRid, mis moodustuvad viiruse infektsioonil pöördtranskriptsiooni käigus ning esinevad sadade või tuhandete kordustena (Tugnet jt., 2013). Need koosnevad unikaalsetest omavahel korduvate segmentidega eraldatud U3 ja U5 regioonidest, mis sisaldavad erinevaid proviiruse transkriptsiooniks vajalikke promootor- ja enhaanser-järjestusi (Jern ja Coffin, 2008).

HERVide LTRidel on mitmeid funktsionaalseid regulaatorseid modulaatoreid nagu erinevad enhaanserid, promooterid, polüadenüleerimissignaali motiivid ning splaiss-saidid. Need regulaatorid võivad inimese rakkudes üleüldist transkriptsiooni mõjutada (Leib-Mosch jt., 1993; Seifarth jt., 2004), mis võib toimuda viie peamise mehhanismi kaudu: (1) HERVide LTR järjestuste repressiivne toime mõjutab naabruses olevate geenide ekspressiooni; (2) endast allavoolu paiknevate järjestuste transkriptsiooni kaudu võivad LTRid luua uusi gene ning mittekodeerivaid RNAsid; (3) polüadenüleerimissaidid LTRides võivad põhjustada naabruses asuvate geenide transkriptsiooni enneaegset termineerumist; (4) geenide intron/ekson struktuur võib muutuda LTRi splaiss-saitide mõjul; (5) LTRid võivad RNAi kaudu reguleerida peremeesraku geeniregulatsiooni (Suntsova jt., 2015).

Kuigi HERVid on üle kogu genoomi valdavalt CpG metülatiooni poolt vaigistatud (Reiss jt., 2007), hõlmavad nad palju ebastabiilseid gene, mis võivad erinevate keskkonnast tulenevate faktorite nagu radiatsiooni, kemikaalide, eksogeensete retroviiruste või stressi mõjul aktiivseks muutuda (Blank jt., 2009). Lisaks on näidatud, et LTR-järjestuste erinevad transkriptsioonifaktorite seondumissaidid ning ka muud olulisemad regulaatorsed motiivid nagu transkriptsiooni initsiatsiooni määravate TATA, GC/GT genoomsed elemendid koos polüadenüleerimise ning 3' otsa formuleerimise eest vastutavate AATAAA järjestustega on mitmetes HERVIDes säilitanud oma funktsionaalsuse (Greenwood jt., 2005).

1.1.2. HERVide päritolu, avastamine ja klassifikatsioon

Kuigi HERVide täpne päritolu on määratlemise keerukuse tõttu seni veel teadmata (Blomberg jt., 2013), integreerusid esimesed meie genoomi jõudnud ERVd inimeste ning Vana Maailma ahvide ühisesse eellasse hinnanguliselt 30–40 miljoni aasta eest ning on siiani esindatud kõigis kõrgemates primaatides peale gorillade (Medstrand ja Mager, 1998; Blank jt., 2009). Viimased HERVid on lisandunud ligikaudu 150 000 aastat tagasi (Herrera jt., 2016). Laialdaselt on aktsepteeritud arvamus, et eksogeensed retroviirused fikseerusid meie genoomi erinevate mutatsioonide tõttu oma latentsest faasist väljumise jaoks elementaarsetes geenides ning osalevad nüüd inimeste genoomi kujundamisel ning selle dünaamikas (Krieg jt., 1992).

Esimesed endogeensed retroviirused avastati 1960ndate lõpul ja 1970ndate algul ja need olid kodukanast (*Gallus gallus domesticus*) leitud lindude leukoosiviirus koos koduhiirest (*Mus musculus*) tuvastatud hiirlaste leukeemia ning rinnanäärme vähki põhjustavate viirustega (Weiss, 2016). Konkreetsete avastusteni jõuti Mendeli pärandumisseadustest tulenenud teadmiste kombineerimisel virooloogiliste ning immunoloogiliste meetoditega, mis sai hiljem kinnitust ka nukleiinhapete hübriidisatsiooni abil (Weiss, 2016). Inimese genoomis kirjeldati endogeenseid retroviiruseid esmakordselt 1981. aastal, kasutades nukleiinhapete hübriidiseerimist (Martin jt., 1981), pärast mida on erinevate meetoditega tuvastatud veel tuhandeid retroviraalse päritoluga järjestusi, mis on jaotunud ligikaudu 700 000 erineva lookuse vahel (Mayer jt., 2011).

Kogu selle äärmiselt suure endogeensete retroviiruste variatsiooni juures ei ole endiselt ühtegi ülemaailmselt kehtestatud ning laialdaselt aktsepteeritud standardit nende klassifitseerimiseks (Jern ja Coffin, 2008). Traditsiooniliselt on HERVe jaotatud vastava aminohappe järgi, mida transportiv tRNA on komplementaarne proviiruse LTRis paikneva (integreerumiseks vajaliku) praimerid seondumissaidi suhtes (*primer binding site*, PBS) (Larsson jt., 1989; Magiorkinis jt., 2013), mille kohaselt näiteks HERV-H perekonda kuuluvad järjestused sisaldavad histidiin-tRNAGA ning HERV-K (HML2) lüsiin-tRNAGA komplementaarset PBSi (Jern ja Coffin, 2008). Selline viis HERVide jaotuseks on aga ebausaldusväärne proviiruste puhul, mis jaotuvad küll fülogeneetiliselt samasse gruppi, kuid omavad erinevuseid PBSis või on hoopis erineva evolutsioonilise päritoluga järjestused, mis kasutavad sama tRNA praimerit (Jern jt., 2004; Jern ja Coffin, 2008).

Olukord on veel segasem teiste liikide puhul, mistõttu on väga vaja ühtset, täpset ning usaldusväärset süsteemi endogeensete retroviiruste klassifikatsiooni ja nomenklatuuri jaoks (Jern ja Coffin, 2008). Olenemata nimetatud nomenklatuuri puudujääkidest on see endiselt kõige levinum süsteem endogeensete retroviiruste nimetamiseks, isegi kui samasse perekonda kuuluvatel järjestustel puudub sama aminohappega komplementaarne PBS, mis ühtlasi annab nende perekonnale nime (Jern jt., 2004) ning see jaotab HERVid ka 31–40 perekonnaks (Bannert ja Kurth, 2006; Katzourakis ja Tristem, 2005).

Järgnev ülevaade peamistest HERV perekondadest baseerub Magiorkinise jt artiklil (2013), mis jagab ERVd kolme klassi (Stocking ja Kozak, 2008), millesse kuuluvad fülogeneetiliselt jaotatud defineeritud rühmad moodustavad omakorda perekonnad. Selle jaotuse kohaselt võiks fülogeneetika alusel eksogeensete retroviiruste kaasamise korral paigutada gammaretroviirused esimesse, beetaretroviirused teise ning spumaviirused kolmandasse klassi (Bessis jt., 2004; Magiorkinis jt., 2013).

1.1.3. Ülevaade peamistest HERV perekondadest

Tüüpilised – HERV-T on näide tavapärasest, kuni keskmise pikkusega HERV perekonnast, millega sarnanevad veel HERV-S, HERV-K ja HERV-P perekonnad. Enamusel sellistesse perekondadesse kuuluvatel HERVidel on keskmiselt vähem kui 80 koopiat üle terve genoomi, neil esineb *env* geen ning need levivad genoomisiselt retrotransposatsiooni asemel peamiselt reinfektsiooni teel (Belshaw jt., 2005; Katzourakis jt., 2005). Sellesse gruppi kuuluvad HERVid on olnud enamjaolt (erandiks on HERV-K) stabiilsed juba 35 miljonit aastat ega pole tekitanud uusi lookuseid.

Vanad – Kõige vanem ERV perekond inimese genoomis on HERV-L, millel on palju liikmeid veel paljudes erinevates imetajates ning seega arvatakse, et see on integreerunud nende liikide ühisesse eellasesse (Benit jt., 1999). Üheks selle perekonna väljapaistvamaks iseärasuseks on fakt, et siiani pole neil leitud *env* geeni, mistõttu arvatakse, et selle perekonna ERVd on paljunenud puhtalt retrotranspositsiooni abil. Inimeses on see perekond olnud stabiilne juba 30–40 miljonit aastat.

Levinud – Kõige levinum ERV perekond inimeses on HERV-H/F, mis moodustab ligikaudu kolmandiku kõigist *pol* geeni omavatest ERV lookustest (Jern jt. 2004). HERV-H integreerus primaatidesse 30 miljoni aasta eest, mil eraldusid ka Vana ja Uue Maailma ahvid (Anderssen jt., 1997; Mager ja Freeman, 1995). Erinevalt HERV-L perekonnast on osal

HERV-H lookustel säilinud *env* geen (de Parseval jt., 2001), kuid olenemata sellest replitseerust need samuti peamiselt retrotranspositsiooni abil. Üheks enim uuritud HERV-H/F perekonna esindajaks on HERV-Fc1, mille *env* geeni on leitud paljudest inimese kudetest testises, nahas ja hingetorus, mille puhul võib järeldada, et sel on endiselt aktiivne promooter (Patzke jt., 2002).

Peremehele kasulikud – HERV-W on võrdlemisi väike perekond, mis integreerus primaatide genoomi enne Vana ja Uue Maailma ahvide eraldumist (Kim jt., 1999) ning oli aktiivne ligikaudu 5 miljonit aastat (Costas, 2002), mis on võrreldes teiste sarnaste HERVidega üsna lühike periood. HERV-W koos HERV-FRD perekonnaga on olnud keskmisest enam teadlaste tähelepanu keskpunktis, kuna nende *env* geenid süntsütiin-1 ja -2 (*Syncytin*) on koopereerinud peremehega ning omavad mutualistlikku interaktsiooni (Mi jt., 2000). Lisaks on HERV-W ainuke perekond, mis enamasti kopeeritud pikkade insertiooniliste harjuskorduselementidena (*Long Interspersed Nuclear Element*, LINE) (Pavlicek jt., 2002).

Aktiivsed – Tänapäeval on andmeid vaid ühe HERV perekonna kohta, mis erinevalt teistest pole veel lõpetanud inimese genoomis replitseerumist. Selleks on HERV-K (HML-2), mille puhul on tuvastatud mitmeid inimese-spetsiifilisi inserteerumisi ning insertioonilisi polümorfisme (Subramanian jt., 2011). Kombineerides selle perekonna erinevaid täispikkasid lookuseid on suudetud ka rekonstrueerida täiesti funktsionaalne ning infektsioonivõimeline retroviirus (Dewannieux jt., 2006). Hiljuti avastati üle 2500 terves ulatuses sekveneeritud genoomi analüüsil ka uus täielikult terviklik ja infektsioonivõimeline HERV-K proviirus koos 19 varem kirjeldamata insertiooniga (Wildschutte jt., 2016).

1.1.4. HERVide seos patoloogiatega

Kuigi tänapäevaks on avaldatud juba tuhandete sekveneeritud genoomiga inimeste täisgenoomi andmed ning välja on töötatud palju uusi ning varasemast põhjalikumaid meetodeid selle info tõlgendamiseks, pole siiani inimesel välja toodud ühtegi konkreetset endogeensete retroviiruste poolt põhjustatud haigust. Kuid välja on toodud seoseid paljude patoloogiatega, nagu erinevad reumaatilised autoimmuunhaigused (Rucheton jt., 1985; Tugnet jt., 2013), vähk (Florl jt., 1999; Kassiotis, 2010), skisofreenia/bipolaarne isiksusehäire (Frank jt., 2005). Sellegipoolest on individuaalsete ERVde kaardistamine nende genoomis paiknevatele sarnastele järjestustele bioinformaatiliste meetoditega endiselt suureks väljakutseks ning HERVide ekspressioonianalüüsid on olnud siiani mahult liialt

väikesed, et teha nende põhjal kindlaid järeldusi (Ioannidis, 2005; Haase jt., 2015). Võimalik, et senised avastused on jäänud siiski erinevate tehnoloogiliste piirangute taha ning tuleks teha üha enam suuremahulisi uuringuid, milleks annavad järjest enam põhjust leitud seosed ERVde ja erinevate patoloogiate vahel loomades (Magiorkinis jt., 2013). Näiteks on leitud, et ühel kahest USAs Kalifornia osariigi Lake Casitase looduskaitsealal asuvast hiirtepopulatsioonist esineb müeliit, mis on degeneratiivne neuroloogiline haigus ja mida neil põhjustab endogeense retroviiruse MLV (*Murine Leukemia Virus*) patogeenne variant, kuid mille mutatsioonide tõttu mittepatogeenseks muutunud vorm esineb resistentsel populatsioonil (Blomberg jt., 2013).

Kuigi varasemad oletused, et HERVid võiksid olla mitmete vähivormide otsesed põhjustajad, pole siiani kinnitust saanud, on leitud palju seoseid tuumorite tekke ning endogeensete retroviiruste vahel (Magiorkinis jt., 2013). Erinevate HERV perekondade transkriptsiooni reaktivatsiooni ning sellega kaasnevat ekspressiooni kasvu on kirjeldatud mitmete kartsinoomide korral: HERV-H soolevähi korral (Wentzensen jt., 2007), HERV-K uroteliaalse kartsinoomi puhul (Florl jt., 1999) ning HERV-W seoses munasarja kartsinoomiga (Menendez jt., 2004). Siiani teadaolevalt ainsa endiselt inimeses replitseeruva HERVide perekonna HERV-K RNAd on tuvastatud ka lümfoomi ja rinnavähiga patsientide vereplasmast teistest oluliselt kõrgema sagedusega (Contreras-Galindo jt., 2008). Arvestades, et paljud retroviirused kodeerivad oma *env* geenis immunosupressiivse mõjuga domeeni (Denner, 2015), on pakutud, et ka HERV-K võib põhjustada sarnast efekti ning olla immuunsüsteemi nõrgendamise kaudu osa erinevate vähivormide tekkemehhanismist (Hahn jt., 2008). Peamiselt on aga *in vivo* HERV transkripte seostatud mitmete autoimmuunhaigustega (Ogasawara jt., 2003) ning just nendest seostest tuleb pikemalt juttu järgnevas osas.

1.1.5. HERVide seos autoimmuunhaigustega

Autoimmuunsust põhjustavad häired tüümuses toimuva üldise rakulise tolerantsi mehhanismis, mis vastutab autoreaktiivsete immuunrakkude elimineerimise või neutraliseerimise eest, viies seeläbi kudede kahjustumise ja hävimiseni (Kamradt ja Mitchison, 2001; Rashedi jt., 2007). Kuigi HERVid on juba meie genoomis fikseerunud retroviiruste kauged järeltulijad, mida immuunsüsteem peaks siiski aktsepteerima kui "iseennast" ning mis ei tohiks seega organismis esile kutsuda immuunvastust, peetakse endogeenseid retroviiruseid juba aastakümneid võimalikeks kausaalseteks kofaktoriteks erinevate autoimmuunsete haiguste tekkemehhanismide juures (Tugnet jt., 2013). Neid

väiteid toetavad mitmed retroviiruste ning HERVide *gag* ja *env* geenide spetsiifiliste antikehade leiud erinevaid autoimmuunhaiguseid põdevate patsientide perifeerises veres (Rucheton jt., 1985; Krieg ja Steinberg, 1990; Bengtsson jt., 1996). Näiteks on HERV-W, HERV-K ja HERV-H perekondade vastaste antikehade kõrgemat kontsentratsiooni vereringes täheldatud mitme säärase haiguse korral nagu reumaatiline artriit (Nakagawa jt., 1997), psoriaas (Moles jt., 2005), süsteemne erütematoosne luupus (Ogasawara jt., 2000) ning polüsklerooos (Johnston jt., 2001). Lisaks on HERVide puhul täheldatud ka teatavat mõju apoptoosi inhibeerimisele autoreaktiivsete immuunrakkude puhul seoses uuringutega HIAPde (*Human Intracisternal A-type Retrovirus Particles*) kohta (Deas jt., 1999).

Lisaks nimetatutele on erinevad geneetilised assotsiatsiooniuringud tuvastanud korrelatsioone retroviiruste ning autoimmuunhaiguste vahel nagu näiteks HERV-Fc1 polümorfismide seosed polüsklerooosiga (Nexo jt., 2011; Laska jt., 2012; Morandi jt., 2017). On ka teada, et Jaapanis ja Kesk-Ameerika riikides, kus retroviiruslikud infektsioonid on endeemsed, esineb enim autoimmuunseid reumaatilisi haiguseid (Eguchi jt., 1996; Poiesz jt., 2003) ning HIVga nakatunud põevad keskmisest enam ka erinevaid kroonilise artriidi tüüpe (Louthrenoo, 2008). Samas on leitud, et mõningane autoimmuunsuse tase võib olla organismile kasulik, mida illustreerib nähtus, et mõne varasema autoimmuunhaigusega melanoomipatsientide elulemus on mõnevõrra kõrgem võrreldes varasemalt tervetega (Ellerhorst jt., 2001).

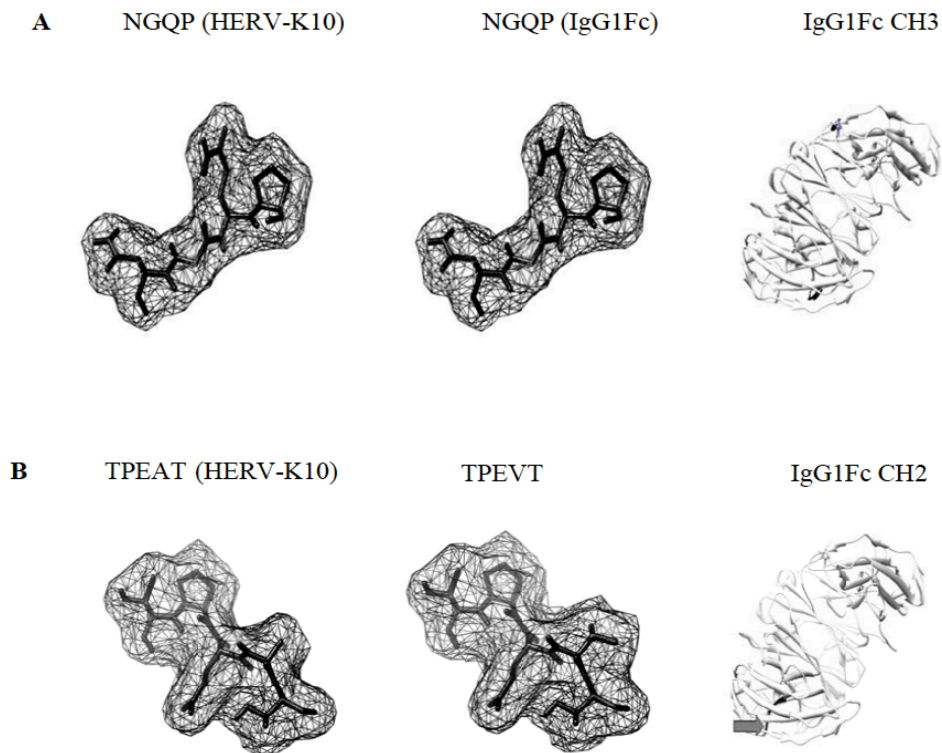
Erinevalt tervetest kontrollidest on reumaatilise artriidi haigete perifeerses vereringes ning sünoviaalvedelikus täheldatud kõrget HERV-K10 ekspressiooni ning selle ekspressioonimäärad korreleeruvad ka võrdväärselt haiguse raskusastme ja aktiivsusega (Ejtehadi jt., 2006), mis teoorias võimaldab antud HERVi ka kasutada kui markerit konkreetse haiguse tuvastamiseks ning iseloomustamiseks (Tugnet jt., 2013). Kuid on avaldatud ka tulemusi, mis näitavad, et nii HERV-K10 kui ka üldine endogeensete retroviiruste ekspressiooni määr on suhteliselt sarnane nii reumaatilist artriiti põdevate kui ka tervete inimeste sünoviaalvedelikus (Nakagawa jt., 1997; Herve jt., 2002).

Välja on pakutud mitmeid erinevaid, kuid üksteisega seotud mehhanisme, kuidas HERVid võivad olla seotud autoimmuunhaiguste patoloogiatega:

Molekulaarne mimikri – Kuigi enamasti käsitletakse HERVe kui “rämps-DNAd”, kuna enamus nende geenidest on defektsed, eksisteerib miljoneid aastaid pärast inimese genoomi sisenemist veel järjestusi, millel esineb funktsionaalseid avatud lugemisraame (*open reading frame*), mistõttu on neil ka säilinud arvestatav võimekus kodeeritavaid valke transleerida (Jern ja Coffin, 2008). Seda kinnitavad ka mitmed HERV-K (HML-2) perekonnast kloneeritud ensüümid nagu proteaas, dUTPaas, revertaas ning integraas, mis on osutunud funktsionaalseteks (Blomberg jt., 2013). See jätab omakorda võimaluse, et mõnelt HERVile omast valku kodeerivalt geenilt transleeritakse viiruslikku epitoopi, mis omab struktuurset homoloogiat mõne peremeesraku enda valguga ning mille tagajärjel võib antigeenile suunatud immuunsus B- ja T-rakkude vahendatud immuunreaktsiooni kaudu ristaktiveeruda ka peremehele oma komponentidele mõjul (Oldstone, 2006). Sellist olukorda tuntakse molekulaarse mimikrina.

See nähtus eeldab, et mikroobsete antigeenide ning peremehe valkude epitoobid oleks immunoloogiliselt piisavalt sarnased, samas piisavalt erinevad, et immuunsüsteem klassifitseeriks neid kui võõraid elemente (Trela jt., 2015).

Molekulaarset mimikrit peetakse peamiseks mehhanismiks, mille kaudu oleks HERVid suutelised indutseerima autoimmuunseid reaktsioone, mis võivad kujuneda kroonilisteks haigusteks, kuna tagavad konstantse ristaktiveeruvate antikehade ekspressiooni (Tugnet jt., 2013). On teada, et näiteks positiivse reumatoidfaktoriga reumaatilise artriidi haigetel satub autoantikehade sihtmärgiks muidu kõikidel inimestel esinev IgGFc epitoop, millel on arvestatav homoloogia HERV-K antigeeniga (Tugnet jt., 2013; Trela jt., 2015) (Joonis 2). Viimast toetavad ka andmed, et mitmed eksogeensed viirused nagu Epstein-Barri viirus (EBV) (Harley ja James, 2006), paroviirus B19 (Lunardi jt., 2009) ja inimese hepatiit C viirus (HCV) (Agmon-Levin jt., 2009) võivad olla seotud reumaatiliste autoimmuunhaigustega, mõjudes molekulaarse mimikri mehhanismide kaudu (Tugnet jt., 2013).



Joonis 2. HERV-K10 ja IgG1Fc epitoopide molekulaarsed mudelid. Joonisel kujutatud nimetatud epitoopide NGQP (HERV-K10) ja NGQP (IgG1Fc) (**A**) ning TREAT (HERV-K10) ja TPEVT (**B**) vahelisi struktuurseid sarnasusi illustreerivad mudelid on koostatud tarkvaraga UCSF Chimera (Tugnet jt., 2013).

Mõju geeniregulatsioonile – lisaks füsioloogia peatükis kirjeldatud HERVide võimalikule positiivsele mõjule nii rakulistele mehhanismidele kui ka üldisele geeniregulatsioonile võivad endogeensed retroviirused ühtlasi kaasa tuua mitmeid negatiivseid mõjusid. Olles allikaks uutele rekombinatsioonivõimelistele viiruslikku päritolu geenidele, mis on võimelised sisestama oma järjestusi praktiliselt igasse piirkonda genoomis, võivad HERVid integreeruda raku normaalseks talitluseks kriitiliste geenide sisse, need seeläbi inaktiveerida või nende lähedusse sattudes tugevalt mõjutada selliste geenide ekspressiooni (Boeke ja Stoye, 1997). Kuigi enamasti patoloogilised järjestused elimineeruvad loodusliku valiku käigus, säilivad mõned nõrgema kahjuliku (mitteletaalse) mõjuga elemendid nagu näiteks osa HERV-K10 järjestusest, mis on integreerunud komplemendi regulatsioonil osalevasse geeni *C2* ja võivad viia häireteni komplemendisüsteemi aktiveerimisel (Perl, 1999). Samas on säärased mõjud sõltuvalt organismist väga varieeruvad ning ainult mõned avalduvad polümorfismid võivad haiguse esile kutsuda, nagu märgatud süsteemse erütematoosse luupuse (*Systemic Lupus Erythematosus*, SLE) puhul kus vaid üks kuuest HRES-1 haplotüübist on seotud patogeneesiga (Pullmann jt., 2008).

Superantigeenid – Lisaks eelnevalt nimetatutele võivad HERVid sisaldada ka superantigeene, mis on üldiselt mikroobset päritolu CD4+ T-rakke tugevalt aktiveerivad epitoobid ja viivad tsütokiinide ületoodanguni (Torres jt., 2001). Viraalse päritoluga valgud võivad teoorias sarnaselt toimida, mida toetab ka nähtus, et reumaatilise artriidi ning SLE haigetel esineb sageli kõrgetes tiitrites Epstein-Barri viirusele (EBV) spetsiifilisi antikehasid (Harley ja James, 2006) ning EBV võib olla HERVide jaoks helper-viiruseks nagu seda on näidatud HERV-K18 puhul (Sutkowski jt., 2001). Veel on HERV-K18 puhul leitud seoseid ka esimest tüüpi diabeediga, mille korral *env* geen võib sisaldada endas superantigeeni, mis võib olla konkreetse haiguse üks tekkepõhjustest (Conrad jt., 1997), viies potentsiaalselt autoreaktiivsete T-rakkude vohamiseni (Tugnet jt., 2013).

Hüpometülatsioon – üheks oluliseks protsessiks organismi normaalse arengu ning rakulise diferentseerumise tagamisel on DNA metülatsioon, mis seisneb tsütosiini jääkidele metüülgruppide lisamise kaudu selektiivses geenide ekspressiooni vaigistamises ning kromatiini konformatsiooni muutmises (Arnett ja Reveille, 1992). Selline mehhanism võimaldab ilma DNA järjestust muutmata reguleerida geenide ekspressiooni, mis on omakorda võimeline epigeneetiliste mustritena kanduma edasi järgmistele põlvkondadele (Blank jt., 2009). Küll aga võivad nimetatud metülatsioonimustrid rakkude vananedes muutuda (Heyn jt., 2013), mille peamiseks viisiks on hüpometülatsioon, mis võib omakorda viia algselt vaigistatud geenide ekspressiooni tõusuni (Chen jt., 1998). Hüpometülatsioon arvatakse olevat seotud paljude vähivormide nagu rinna-, kopsu-, eesnäärme- ja kolorektaalvähi tekkega (Paz jt., 2002; Brothman jt., 2005).

Oma osa arvatakse sel mehhanismil olevat ka autoimmuunhaiguste kujunemisel. On pakutud, et võimalikuks reumaatilise artriidi avaldumise põhjuseks võib olla sünoviaalmembraani fibroblastide hüpometülatsioon (Karouzakis jt., 2009) ning katsed hiirte peal on näidanud, et SLE riskiga hiirte tüümuse rakkudes on metülatsiooni tasemed tugevalt vähenenud, võrreldes SLE kujunemise riskita hiirtega (Mizugaki jt., 1997). Korrelatsioone HERVide ekspressiooni ning hüpometülatsiooni vahel on näidatud ka HERV-Fc1 puhul, mille ekspressioon suurenes märgatavalt HEK293 ja Jurkat rakkudes, mida töödeldi demetülatsiooni esile kutsuva ühendiga 5-aza-dC (5-Aza-2-deoxycytidine) (Laska jt., 2013). Üldiselt on aga HERVide metülatsioonimustrit võrdlemisi vähe uuritud (Laska jt., 2013), kuid senised selle uurimisele keskendunud tööd väidavad, et kui välja arvata platsentas asuvad iduteerakud, on normaalse füsioloogilise seisundi juures HERV proviirused ning üksikud LTRid tugevalt metüleeritud (Bannert ja Kurth, 2004).

1.2 Psoriaasi kliinilise pildi ülevaade

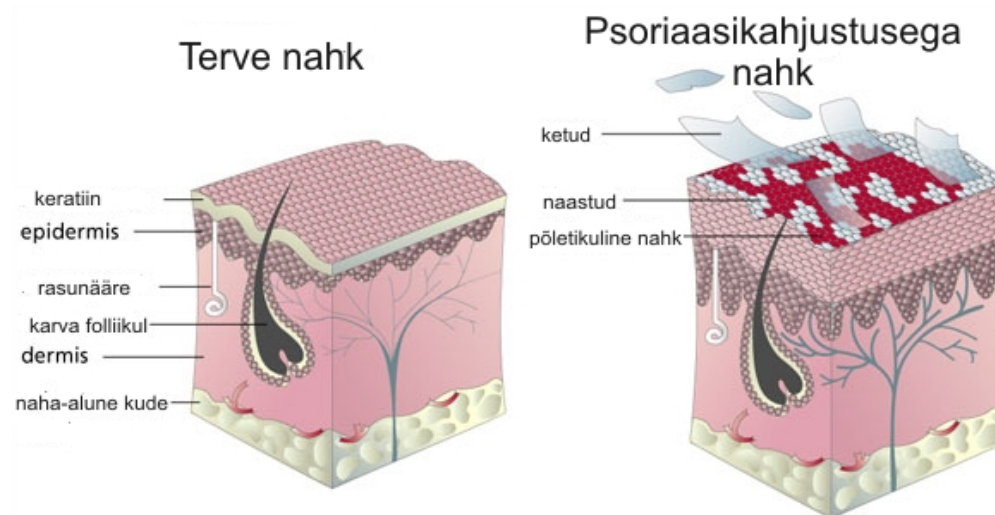
Psoriaas ehk soomussammaspool on üks levinumaid nahka ja liigeseid mõjutavaid kroonilisi põletikulisi haiguseid (Nestle jt., 2009). Psoriaasi esineb summaarselt 2–3% maailma europiidse rassi populatsioonist (Lebwohl, 2003). Sõltuvalt geograafilisest jaotusest ning etnilisest taustast jääb levimus erinevates populatsioonides vahemikku 1–6% (Raychaudhuri ja Farber, 2001). Eristatakse peamiselt viit erineva kliinilise raskusastmega vormi: naastuline (*Psoriasis vulgaris*), tilgakujuline (*Psoriasis vulgaris guttata*), tagurpidi ehk genitaalne (*Psoriasis vulgaris inversa*), mädavilliline (*Psoriasis vulgaris papulopustulosa*) ja erütrodermiline psoriaas (*Erythroderma psoriatica*) (Boehncke ja Schön, 2015). Kõige sagedamini esineb krooniline naastuline psoriaas, mida iseloomustavad punetavad, hõbehallika koorikuga sümmeetrilised naastud (joonis 3) (Nestle jt., 2009). Ligikaudu 75% patsientidest (Lønnberg et al. 2013) avaldub psoriaas enne neljakümnendat eluaastat ning erinevalt varasematest teadmistest viitavad hiljutised uuringud ka selle haiguse teatavale soospetsiifikale: akuutsemaid psoriaasi vorme esineb meestel mõnevõrra sagedamini (Hägg jt., 2013).

Psoriaasi diagnoositakse enamasti kliinilise pildi alusel ja haiguse raskusastme hindamiseks kasutatakse tavaliselt PASI-indeksit (*Psoriasis Area and Severity Index*), mille puhul hinnatakse erüteemi ehk punetust, psoriaatilise koe paksust, ketendust ning lööвете ulatust kehal ja varieerub skaalal 0 (lööve puudub) kuni 72 (maksimaalselt ulatuslik lööve) (Schmitt ja Wozel, 2005). Haiguse kroonilises faasis esineb keratinotsüütide hüperproliferaatsioon ja vigane sarvestumine koos naha kaitsebarjääri, mille ülesandeks on takistada patogeene tungimist nahka, funktsiooni häirega (Grice jt., 1975; Schön ja Boehncke, 2005).

Psoriaasi puhul on tegemist kompleksse haigusega, mille multifaktoriaalse patogeneesi mehhanismid pole veel lõplikult teada, kuid aktiivne psoriaatiline lööve indutseeritakse mitme geeni interaktsiooni koosmõju tulemusena (Kingo jt., 2004; Liu jt., 2008; Lønnberg jt., 2013; Boehncke ja Schön, 2015). Kuigi varem käsitleti psoriaasi kui haigust, mille peamiseks tekkepõhjuseks on keratinotsüütide düsfunktsioon, käsitletakse seda nüüd kui keerukat immuunsüsteemi häiret, mis hõlmab endas kaasasündinud ja adaptiivse immuunsüsteemi koosmõju (Krueger, 2002; Nestle ja Gilliet, 2005).

Üldiselt peetakse psoriaasi patogeneesi mehhanisme koosmõjukuks epidermaalsest hüperplaasiast, vigasest keratinotsüütide proliferatsioonist ja differentseerumisest, angiogeenisist, T-lümfotsüütide infiltreerumisest, dendriidirakkude ja neutrofiilide talitlusest, proinflammatoorsete tsütokiinide vallandumisest ning kaasasündinud immuunsüsteemi häiretest (Chamian ja Krueger, 2004; Gottlieb jt., 2005; Nestle jt., 2009; Haider jt., 2008). Sellegipoolest käsitletakse lihtsustamise eesmärgil psoriaasi patoloogia kesksete mehhanismidena päritud ja omandatud immuunsuse ristaktiivsust, immuunrakkude reaktsioone teiste nahas asuvate rakkudega ning TNF α , IL23 ja Th17 interaktsioone (Boehncke ja Schön, 2015; Capon jt., 2007).

Psoriaasi võivad esile kutsuda nii kergemad nahatraumad nagu sügamine, augustamine ja tätoveeringud kui ka erinevad keskkonnafaktorid nagu intensiivne UV-kiirgus ja ärritavad kemikaalid (Boehncke ja Schön, 2015). Selline psoriaatilise koe moodustumise vallapäästmine mõne nahakahjustuse mõjul on tuntud kui Koebneri fenomen (Ely ja Stone, 2010). Lisaks on teada, et osa süstemaatiliselt manustatavaid ravimeid nagu beeta-blokaatorid, liitiumisoolad, malaariavastased ravimid ning mittesteroidsed põletikualandajad võivad esile kutsuda haiguse halvenemist (Rongioletti jt., 2009; Basavaraj jt., 2010). Haigust võivad esile kutsuda ka erinevad bakteriaalsed ja viiruslikud patogeenid (Fry ja Baker, 2007). On andmed, et ka HIV-infektsioon võib esile kutsuda psoriaasi (Fry ja Baker, 2007), mis annab üha enam põhjust arvestada retroviiruste osalusega psoriaasi patogeneesil.



Joonis 3. Terve ja psoriaatilise naha läbilõigete võrdlus. Joonisel on kujutatud terve ja psoriaatilise lööbega naha anatoomiat ning nimetatud selle kihid ja elemendid. Illustratsiooni autoriõigused kuuluvad: FDA/Renée Gordon; modifitseeritud kujutis saadud aadressilt: <http://www.psoriaasikeskus.ee/psoriaas/Psoriaas.htm>.

1.2.1. Psoriaas ja geneetika

Populatsioonigeneetilised uuringud on näidanud, et psoriaasi puhul on tegemist päriliku eelsoodumusega haigusega, mida kinnitab nähtus, et monosügootsetel kaksikutel on haiguse mõlemapoolne esinemine kuni kolm korda tõenäolisem kui disügootsetel kaksikutel (Farber ja Nall, 1974; Lønnberg jt., 2013). Lisaks võib ka geneetiline taust mõjutada haiguse kulgu ning raskusastet (Henseler ja Christophers, 1985). Multifaktoriaalse haigusena on psoriaasi patoloogiaga seotud seni teadaolevalt ligikaudu 40 lookust (Boehncke ja Schön, 2015), kuid seniste uuringute baasil on enim korrelatsioonis psoriaasi vastuvõtlikkuse lookus 1 (*psoriasis susceptibility locus 1*, PSORS1), mis asub kuuendas kromosoomis, peamise koesobivuskompleksi (MHC) regioonis (Lai jt., 2012). Väidetavalt määrab nimetatud lookuses paiknev HLA-Cw6 alleel kuni 50% haiguse päritavusest (Nair jt., 2006) ning enamasti on psoriaasiga assotseerunud lookustes asuvad geenid seotud adaptiivse ja omandatud immuunsüsteemi regulatsiooni või otsese funktsiooniga (Elder jt., 2010).

1.2.2. HERV ja psoriaas

Seoseid psoriaasi tekkemehhanismide ning retroviiruste vahel aitavad tõendada leiud, et paljud haiguse korral ekspresseeritud geenidest nagu IL28RA, IFIH1, DDX58 (Tsai jt., 2012); OAS2, OAS3 (Kulka jt., 2009) ja RNF114 (Bijlmakers jt., 2011) on seotud antiviraalsete kaitsemehhanismidega (Gupta jt., 2014). Lisaks on kõrgel määral ekspresseerunud psoriaatilise lööbega patsientide nahas mitmed antiviraalsed valgud (*Anti-Viral Proteins*, AVP) nagu MX1 (MxA), BST2, ISG15 ja OAS2 (Wolk jt., 2013; Raposo jt., 2015). Neist on seni antud kontekstis siiani laialdaselt uuritud MX1 (MxA) ning BST2 geene. MX1 on tsütoplasmaatiline AVP, mis inhibeerib gripi ja vesikulaarse stomatiidi viiruse paljunemist ning mille puhul on teada juba üle 20 aasta, et seda ekspresseeritakse ka psoriaatilise lööbega koes (Schmid jt., 1994; Fähr jt., 1995). BST2 (*tetherin*) näol on tegemist AVPga, mis inhibeerib juba kokkupakitud viiruste eksotsütoosi (Neil jt., 2008). Nende leidudega on kooskõlas ka statistika, et kõigest 3% psoriaasipatsientide nahas esineb paralleelselt mõni viirusliku infektsiooni nagu *herpes simplex* viirus, papilloomviirus, *molluscum contagiosum* viirus, võrreldes 13%-ga atoopilise dermatiidi puhul (Wolk jt., 2013), mis pole autoimmuunne nahahaigus.

Selline kohati põhjendamatu antiviraalne immuunvastus inimeste autoimmuunhaiguste patogeneesi puhul on andnud alust kahtlustada HERVide potentsiaalset osalust (Tugnet jt., 2013). Seda toetavad ka hiljuti avaldatud andmed, mille puhul on näidatud, et HERV päritoluga pöördtranskriptaasid on suutelised moodustama piisavalt immunoreaktiivseid DNA:RNA duplekse, mis on seeläbi omakorda võimelised indutseerima kõrgeenenud põletikuliste tsütokiinide sekretsiooni (Molès jt., 2017). HERVide poolt kodeeritud, siiani aktiivsetest pöördtranskriptaasidest on teada juba eelmise sajandi lõpust (Berkhout jt., 1999).

Psoriaatilise lööbega nahas on ekspresseeritud peamiselt HERV-W, HERV-K ja HERV-E perekonnad (Tugnet jt., 2013) ning kirjeldatud on ka enamjaolt ainult psoriaatilises koes ekspresseeruvat HERV elementi, mis sarnaneb HERV-W ja HERV9 järjestustega (Molès jt., 2005). HERV-E puhul on valguekspressiooni suudetud immunofluorestsentsmeetodiga ka visualiseerida (Bessis jt., 2004). Samas on ka teada, et näiteks HERV-K perekonna *env*, *gag* ja *pol* geenid on psoriaasi puhul lööbelises nahas suurel määral repressseeritud (Gupta jt., 2014).

1.2.3. Senine ravi

Praegu pole psoriaasi kui kroonilise haiguse väljaravimiseks ravi veel leitud, kuid on mitmeid viise ja ravimeid haiguse leevendamiseks. USA artriidi, skeletilihaskonna ja nahahaiguste instituudi (*National Institute of Arthritis and Musculoskeletal and Skin Diseases*, NIAMS) järgi (https://www.niams.nih.gov/health_info/Psoriasis/default.asp#5) on psoriaasi raviviisid jaotatud toopilisteks (ehk lokaalseteks, nahale kantavateks) ravimiteks, valgusteraapiaks (UV-A või UV-B) ja süsteemseks teraapiaks (oraalselt manustatuna või süstituna). Kõige efektiivsemateks raviviisideks on Psoragen plus UV-A teraapia (90%) (Nast jt., 2012), Infliximab (80%) (Nast jt., 2012), Secukinumab (80%) (Langley jt., 2014), mille korral patsientidel vähenes psoriaatiline lööve vähemalt 75% ulatuses (Boehncke ja Schön, 2015). Kergema lööbe korral võivad efektiivseks osutada ka glükokortikosteroidid, D-vitamiini derivaadid või nende kombinatsioonid (Boehncke ja Schön, 2015).

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1 Töö eesmärgid

Magistritöö eesmärkideks oli:

- analüüsida HERVide geeniekspressiooni psoriaasiga patsientidel võrrelduna tervete inimestega;
- hinnata antiviraalse vastusega seotud geenide ekspressiooni psoriaasiga inimestel;
- kontrollida patsientide nahas HERV ekspressiooni valgulisel tasandil.

2.2 Materjal ja metoodika

2.2.1. cDNA süntees

Töös kasutati HERV ja antiviraalse vastusega seostatud geenide ekspressiooni uurimiseks Keermanni jt 2015. aastal avaldatud artikli koostamisel kogutud nii psoriaasiga patsientide kui ka tervete kontrollide RNAd, mis sisaldasid kõiki mRNA järjestusi, mille pikkus ületas 200 nukleotiidi. cDNAd sünteesiti kasutades *QuantiTect® ReverseTranscription Kit* (Qiagen) reagente ja tootjapoolset protokollit (QIAGEN, 2011).

cDNA sünteesireaktsioonile eelnes genoomse DNA elimineerimise protseduur, mille korral RNA vesilahusele, mis sisaldas kuni 1 µg RNAd, lisati 2 µl DNA elimineerimispuhvrit (*gDNA Wipeout Buffer*) ning RNAasi vaba vett (mahuni 14 µl), seejärel inkubeeriti reaktsioonisegu 2 minutit 42 °C juures.

Pöördtranskriptsiooni reaktsiooni läbiviimiseks lisati eelneva genoomse DNA elimineerimisreaktsiooni produktile lisaks 1 µl RNAasi inhibiitorit sisaldavat pöördtranskriptaasi (*Quantiscript Reverse Transcriptase*), 4 µl Mg²⁺ ja dNTPga pöördtranskriptsiooni puhvrit (*Quantiscript RT Buffer*) ning 1 µl oligo-dT ja *random* praimerite segu. Reaktsioonisegu valmistamisele järgnes sünteesireaktsioon 15 minutit 42 °C juures ning ensüümi inaktiveerimiseks veel 3 minutit 95 °C juures. Kõik reaktsioonisegud valmistati jääs ning cDNAd hoiustati -20 °C juures.

2.2.2. Töös kasutatud praimerid

HERV geenide amplifitseerimiseks nii konventsionaalse kui ka reaalaaja PCR meetodil, mille jaoks varempublitseeritud kirjandusest sobivaid primereid ei leitud (ilma vastavate viideteta), disainiti RepBase andmebaasist (<http://www.girinst.org/replib/>) saadud inimese endogeensete retroviiruste järjestuste baasil sobivad oligonukleotiidid, kasutades selleks veebirakendust Primer 3 (<http://primer3.ut.ee>). Ehkki amplifitseeriti cDNAd, kontrolliti disainitud praimerite seondumiskohti ning amplikonide pikkust ka genoomse DNA baasil, kasutades selleks veebirakendust GenomeTester 1.3 (<http://bioinfo.ut.ee/genometester/>). Kõik oligonukleotiidid telliti teenusepakkujalt TAG Copenhagen A/S (<http://tagc.dk/products-services/custom-oligos/>) dehüdreeritud kujul. Oligonukleotiidide sulamistemperatuuride (T_m) kalkuleerimiseks kasutati veebirakendust (<http://www.thermoscientificbio.com/webtools/tmc/>).

Tabel 1. Töös kasutatud oligonukleotiidide järjestused. Tabelis on välja toodud geenid, praimerite järjestused, nende sulamistemperatuurid (T_m) ning oletatavate produktide aluspaaride (bp) pikkused.

Geen	Praimerisuund: 5' → 3'	T _m (°C)	Amplikoni pikkus (bp)
ACTB <i>β</i> - aktiin	CTGGAACGGTGAAGGTGACA	58,5	140
	AAGGGACTTCCTGTAACAATGCA	57,4	
MER20	TACAATGCACAGGACAGCCC	59,0	76
	GGTTTCTCAACCTCGGCACT	59,1	
MER21A	ACCCCAACTTGAAGCCAGTC	59,1	114
	TAGCGTCAGATCCCACAGGT	59,1	
MER22	GCCTCACTGCATTGGAACC	58,7	128
	TTGATCGCTCTTCTGCTTCG	56,8	
HERV-K11DI	TCTGTTGCCTCCTTTTAATG	58,4	217
	TGGGTTGTGGGTATAGAATT	57,3	
LTR57	TGTGTTTTGCCCAATCCTAGT	57,7	150
	CCTGCTGTAAAGGGGCGTC	60,6	
HERV-Fc1, <i>gag</i> Laska jt., 2012	TTAAGCGGAAGCGACTCATT	55,5	227
	CACCTGTCCAAGGGAACACT	58,2	
HERV-W18, <i>env</i> Nogueira jt., 2015	TCATATCTAAGCCCCGCAAC	56,0	103
	GAGGTTGTGATACCGCCAAT	56,2	
MX1 (MxA) Nogueira jt., 2015	AGCTGATCCGCCTCCACTT	60,3	73
	TGCAATGCACCCCTGTATACC	58,8	
BST2 Viswanathan jt., 2011	CCGTCCTGCTCGGCTTT	59,9	56
	CCGCTCAGA ACTGATGAGATCA	57,8	

2.2.3. Polümeraasi ahelreaktsioonide teostamine

Et veenduda valitud praimerite sobivuses ja analüüsida uuritavate geenide ekspressiooni mitmekülgsemalt, kasutati ka konventsionaalset PCR meetodit. Kõikide tulemustes esitatud geenidega teostati vähemalt kaks sõltumatut PCR reaktsiooni. Kõik reaktsioonisegud valmistati jääl ning reaktsioonisegu lõppmahuga 20 µl sisaldas järgmist: 4 µl 2X DreamTaq Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific), 1 µl *Sense* praimer (0,4 µM), 1 µl *Anti-sense* praimer (0,4 µM), 2 µl cDNA, 12 µl MQ H₂O.

Kõik PCRid teostati aparaadiga Veriti, *96 Well Thermal Cycler* (Applied Biosciences) ning valitud PCRi programm nägi välja järgnev: ühekordne esmase denaturatsiooni- ja ensüümi aktivatsioonireaktsioon 98 °C 30 sekundit; sellele järgnes (35 tsükli) denaturatsioon 98 °C 15 sekundit, seandumine 52–56 °C * 15 sekundit, süntees 72 °C 10 sekundit; lõpetuseks otste täissünteesimiseks üks tsükkel 72 °C 5 minutit.

2.2.4. DNA geelelektroforees

HERV ja AVP geenide DNA fragmentide pikkust hinnati agaros elektroforeesiga 1X TAE puhvris. DNA visualiseerimiseks lisati vedelale 2% agarosgeelile etiidiumbromiidi lõppkontsentratsiooniga 0,5 µg/ml. PCR produktide pikkuse hindamiseks kasutati *GeneRuler™* 100bp DNA suurusmarkerit (Thermo Scientific). Elektroforees viidi läbi toitepingega 100 V (5 V/cm). Pärast elektroforeesi visualiseeriti geelis olevad fragmendid 312 nm UV-B all kasutades selleks transilluminaatorit ning jäädvustati SYNGENE geelidokumenteermisüsteemiga.

2.2.5. Reaalaja-PCR

Reaalaja PCR (*Real-Time* PCR), mis on tuntud ka kui kvantitatiivne PCR (*quantitative* PCR, qPCR), võimaldab erinevalt konventsionaalsest PCRist, mis on suuteline visualiseerima vaid lõpp-produkti, hinnata PCR produkti moodustumist ka reaalajas, kasutades selle tuvastamiseks kaheaheelalise DNAGA seonduvaid fluorestseeruvaid molekule või järjestuse-spetsiifilisi fluorestseeruva märgistusega oligonukleotiide. Töös kasutati DNA visualiseerimiseks QuantiTect® SYBR® Green PCR Kit'i (Qiagen) ning katsete läbiviimiseks järgiti tootjapoolset protokollit (QIAGEN, 2011). Kõikide tulemustes esitatud geenidega teostati vähemalt kolm sõltumatut reaalaja PCR reaktsiooni.

Reaktsioonisegud valmistati 96 süvendiga PCR plaatidel (Applied Biosystems), iga uuritava geeniga viidi iga eraldiseisev reaktsioon läbi kahes või kolmes korduses ning iga reaktsioonisegu lõppmahuga 11,2 µl sisaldas järgmist: 4 µl 2X SYBR Green I® qPCR Master Mix (Sigma-Aldrich), 0,1 µl *Sense* praimer (0,4 µM), 0,1 µl *Anti-sense* praimer (0,4 µM), 1 µl *template* cDNA, 6 µl RNAasi vaba H₂O.

* Seandumistsükli temperatuur sõltus konkreetses reaktsioonis kasutatud praimerite sulamistemperatuuridest (T_m).

Kõik reaallaja PCR reaktsioonid teostati *StepOnePlus*TM (Applied Biosystems) süsteemiga ning valitud PCRi programm nägi välja järgnev: ühekordne esmase denaturatsiooni- ja ensüümi aktivatsioonireaktsioon 95 °C 15 minutit; sellele järgnes (40 tsüklit) denaturatsioon 94 °C 15 sekundit, seandumine 52–56 °C * 30 sekundit, süntees 72 °C 30 sekundit; lõpetuseks otste täissünteesimiseks üks tsükkel 72 °C 10 minutit.

Töös viidi pärast iga reaallaja PCR reaktsiooni läbi ka DNA dissotsiatsioonianalüüs, mis võimaldab amplikonide spetsiifilisuse määramiseks selgitada reaktsiooniproductide dissotsiatsiooni- ehk sulamistemperatuurid (T_m) ning mida konkreetses töös kasutatud *StepOnePlus*TM platvorm võimaldab pärast viimast tsüklit teostada automaatselt. Dissotsiatsioonikõverate analüüsid viidi iga eksperimendi puhul läbi vahemikus 50–90 °C.

2.2.6. mRNA suhtelise taseme kvantifitseerimine

Töös kasutati erinevate geenide vahel suhtelise mRNA taseme kalkuleerimiseks $\Delta\Delta CT$ meetodit (Livak ja Schmittgen, 2001), mis seisneb kaheaahelalise produkti akumulatsioonimõjul mõõdetava fluorestsentsi taseme kasvu tõttu lävetsükli (*Cycle Threshold*, CT) ületamist, mis on manuaalselt ettemääratud. Erinevate geenide mRNA puhul aga ületatakse CT algmaterjali erinevatest kogustest tingituna erinevates tsüklites, mida omaette nimetatakse lävetsükli muuduks (ΔCT). Reaallaja PCR meetodi puhul arvutatakse suhtelise mRNA taseme saamiseks uuritavate geenide ΔCT rakus mõne konstitutiivselt ekspresseeritud geeni suhtes, milleks selle töö puhul oli beeta aktiini kodeeriv geen *ACTB*, mida on ka varasemalt psoriaasi ja teiste reumaatiliste autoimmuunhaiguste-spetsiifilise geeniekspressiooni uurimiseks kasutatud (Freimanis jt., 2010; Singh jt., 2012; Raposo jt., 2015).

2.2.7. Biopsiate kogumine

Töös inimkudede kogumiseks kasutatud protokollid ning informeeritud nõusoleku vormid olid kooskõlas Tartu Ülikooli inimuuringute eetikakomitee reeglitega ning kõik osalejad allkirjastasid kirjaliku ja informeeritud nõusoleku. HERV valguekspressiooni määramiseks immunofluorestsentsi meetodiga võeti kokku kolme psoriaasiga patsiendi nahast kaks 4 mm sügavust löökbopsiat nii lööbelisest (*lesional patient*, LP) kui ka mittelööbelisest nahast (*non-lesional patient*, NLP) ning kontrolliks kolmelt tervelt vabatahtlikult.

* Seandumistsükli temperatuur sõltus konkreetses reaktsioonis kasutatud praimerite sulamistemperatuuridest (T_m).

Uuringus osalenud patsiendid (2 meest ja 1 naine) ja terved kontrollid (*control*, C) (2 naist ja 1 mees) olid Eestis elavad euroopiidse rassi esindajad (vanuses 31–68 aastat), kes polnud omavahel sugulased ning kellel puudusid igasugused põletikulised nahahaigused, ka ei esinenud psoriaasi nende perekonnaliikmetel. Psoriaasiga patsientidel, kellel esines naastuline psoriaas, hindas PASI-indeksi ja haiguse varajase või hilise avaldumise vormi ning võttis biopsiad kogenud dermatoloog Tartu Ülikooli nahakliinikus. Biopsiad võeti päikesele mitte-eksponeeritud piirkondadest, pärast mida külmutati need kohe vedelas lämmastikus ning hoiustati -80 °C juures.

2.2.8. Immunofluorestsents

Primaarse antikehana kasutati HERV-W ehk süntsütiin-1 vastast küüliku polükloonaalset antikeha (Abcam, ab71115, <http://www.abcam.com/herv-antibody-ab71115.html>). Sekundaarseks antikehaks kasutati kitsest eraldatud küüliku vastast IgG antikeha, mis konjugeeritud Alexa Fluor® 594 fluorestsentsmärgisega (Invitrogen).

Nahabiopsiad lõigati krüotoomil -20 °C juures 5 µm paksusteks lõikudeks ning koguti eelkülmutatud ning polü-L-lüsiiniga kaetud alusklaasidele (Sigma-Aldrich). Seejärel fikseeriti lõigud klaasile, inkubeerides neid jahutatud metanooliga Coplini anumal -20 °C juures ühe minuti jooksul. Seejärel preparaadid rehüdreeriti fosfaat-puhverdatud soolalahuses (*phosphate-buffered saline*, PBSA) toatemperatuuril 10 minuti jooksul. Koelõikude permeabiliseerimiseks inkubeeriti neid 0,2% Triton-X sisaldusega PBSis 10 minutit toatemperatuuril.

Järgmisena asetati alusklaasid spetsiaalsesse preparaaside värvimisanumasse ning pesti lõike kolm korda 300–500 µl PBSTga (PBS + 0,05% Tween-20) neljaminutiliste intervallide tagant. Antikehade ebaspetsiifilise seostumise vältimiseks blokeeriti lõike 500 µl PBST lahusega, mis sisaldas 5% BSA, 5% vasika loote seerumit (*fetal calf serum*, FCS) ning 5% kitse seerumit, tund aega toatemperatuuril ning sellele järgnes tunniajane inkubatsioon 200 µl primaarset antikeha (lahendusega 1:100, tootjapoolne soovitus) sisaldava lahjendatud blokeerimislahusega (1% BSA + 1% FCS + 1% kitse seerumit PBSTis).

Seejärel korrati pesu PBSTga 3 x 4 min ning inkubeeriti sekundaarse antikehaga lahjendusel 1:1000 30 minutit ruumitemperatuuril. Järgnesid pesud 3 x 4 min nii PBST kui ka PBSiga, mille järel kanti preparaatile 1–2 tilka DAPI (4',6-diamidino-2-fenüülindool) sisaldusega ProLong Diamond flurestsentsi kustumist pärssivat sulunduslahust (Thermo) ning katteklaaside ääred sulgeti kuivamise vältimiseks läbipaistva küünelakiga.

Viimasena analüüsiti preparaate konfokaalmikroskoobiga ning huvipakkuvate piirkondade fluorestsents jäädvustustati mikroskoobi integreeritud kaameraga.

2.2.9. Tulemuste statistiline analüüs

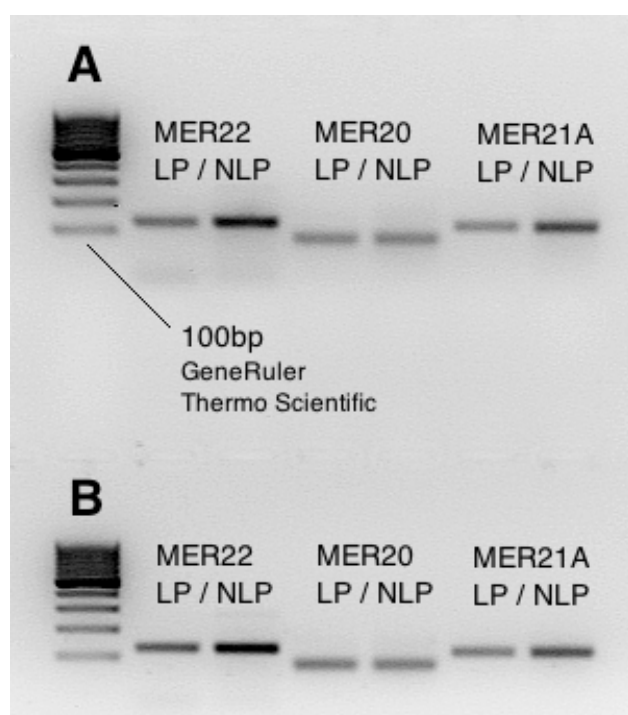
Kontrollimaks reaalaja PCR katsetulemuste andmete vastavust normaaljaotusele kasutati Kolmogorov-Smirnovi testi. Kui uuritavad andmed olid normaaljaotusega, kasutati statistilise olulisuse selgitamiseks parameetrist testi, milleks oli Studenti t-test (mittepaariviisiline, kahepoolne hüpotees). Kui normaaljaotus puudus, selgitati erinevuste statistiline olulisus mitteparameetrilise Kruskal-Wallise testi abil. Analüüsitulemused arvestati statistiliselt erinevaks $P < 0,05$ korral ning tulemused on esitatud artimeetiliste keskmistena koos standardveaga. Kõik testid sooritati kasutades GraphPad Prism 6 tarkvara.

2.3 Tulemused

2.3.1. HERV ekspressiooni analüüs DNA geelelektroforeesil

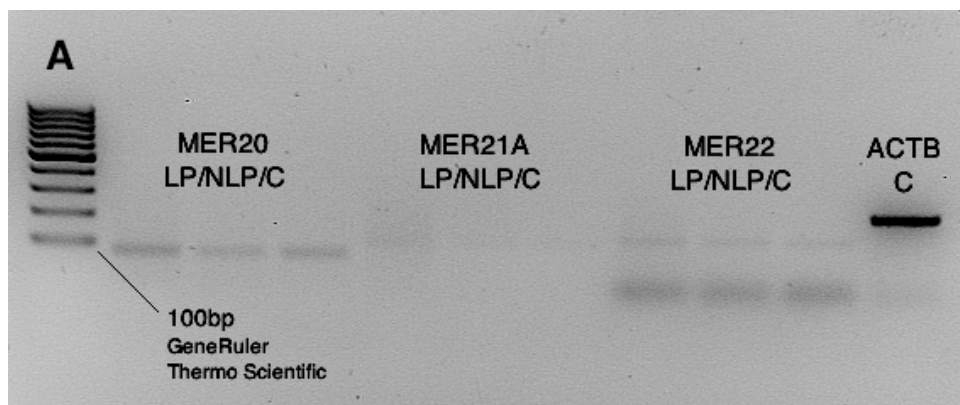
Töös uuritavad geenid valiti meie töögrupis varem teostatud ning seni avaldamata psoriaasi patsientide RNA-sek (*RNA-sequencing*, RNA-seq) andmete bioinformaatilise analüüsi tulemuste tõttu, millest selgus, et mõned psoriaasi patoloogiatega varem mitteseostatud HERVid on patsientide nahabiopsiate lööbelises piirkonnas statistiliselt olulisel määral erinevalt ekspresseeritud võrrelduna mittelööbelise piirkonnaga ja tervete kontrollidega. Edasiseks uurimiseks valitud geenidest MER20 ja LTR57 olid kontrollidega võrreldes statistiliselt oluliselt kõrgemalt ning HERV-Fc1 madalamalt ekspresseeritud.

Valitud geenide suhtes kõnealuste bioinformaatiliste tulemuste kontrollimiseks molekulaarsete meetoditega disainiti enim eristunud geenidele praimerid ning patsientide proovidega viidi läbi PCR reaktsioonid, mille produkte analüüsiti DNA agaros geelelektroforeesiga. Varajase haiguse avaldumise vormi ning kõrge PASI-indeksiga patsientide proovidega teostatud geelelektroforeesi jäädvustuste (joonis 4) analüüsil võis siiski järeldada, et valdavas osas olid uuritud HERVid (MER22, MER20 ja MER21A) ning muud genoomsed kordusjärjestused psoriaatilise lööbega nahas pigem madalamalt ekspresseeritud kui visuaalselt terves nahas.



Joonis 4. MER22, MER20 ja MER21A mRNA ekspressiooni võrdlus geelelektroforeesil psoriaatilise lööbega (LP), visuaalselt terves (NLP) ning terve kontrolli (C) nahas. A ja B tähistavad samaaegselt teostatud, erinevatest varajase haiguse avaldumise vormi ja kõrge PASI-indeksiga (vastavalt 32 ja 23) psoriaasi patsientidest pärit proovidega katseid, millega viidi läbi PCR reaktsioonid ning mille produkte analüüsiti DNA geelelektroforeesiga 2% agarosgeelil.

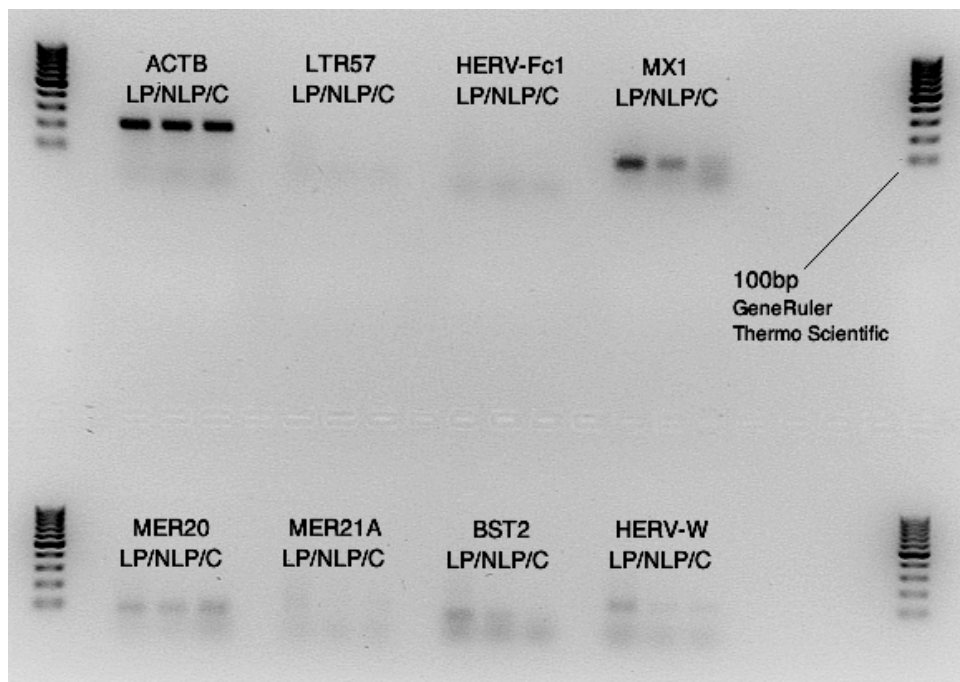
Nii SST1 ensüümiga seostatud suur inimese satelliitne järjestus (*large human satellite identified with SstI enzyme*), mis on tuntud ka kui MER22 (<http://dfam.org/entry/DF0001065>), kui ka endogeensete retroviiruste perekonda L kuuluv *MER21A* (<http://dfam.org/entry/MER21A>) olid mõlema patsiendi proovidega teostatud katsete korral mittelööbelistes proovides mõnevõrra tugevamalt eristunud. Samas hAT-Charlie perekonna DNA trasposoon *MER20* (<http://dfam.org/entry/MER20>) puhul ei esinenud nähtavat erinevust signaalide intensiivsuses. Samas madalama PASI-indeksiga patsiendi proovide puhul võis *MER20* korral näha just lööbelises nahas selle mõnevõrra kõrgemat ekspressiooni (joonis 5), ning *MER21A* ja *MER20* vähest eristust, mis koos joonistelt 4 ja 6 nähtavate tulemustega viitab ka märgatavale heterogeensusele HERVide ning kordusjärjestuste ekspressioonis patsientide vahel.



Joonis 5. MER20, MER21A, MER22 ja ACTB mRNA ekspressiooni võrdlus geelelektroforeesil psoriaatilise lööbega (LP), visuaalselt terves (NLP) ning terve kontrolli (C) nahas. Katse on tehtud varajase haiguse avaldumise vormiga psoriaasi patsiendi (PASI-indeksiga 12) ja terve kontrolli proovidega, millega viidi läbi PCR reaktsioonid ning milleprodukte analüüsiti DNA geelelektroforeesiga 2% agarosgeelil.

Sarnased DNA geelelektroforeesi katsed viidi läbi ka varem teiste autoimmuunhaigustega seoses uuritud HERV geenide suhtes nagu HERV-Fc1 *gag*, mille kõrgeenenud ekspressioonimäär on näidatud polüskleroosi puhul (Nexo jt., 2011; Laska jt., 2012; Laska jt., 2013) ning HERV-W *env*, mille ekspressioon on represseritud lameda sammaspoole (*Lichen planus*) korral (Nogueira jt., 2015). Veendumaks, et uuritud koeproovides on tõepoolest psoriaasile omane geeniekspressiooni muster, mõõdeti psoriaatilistes ja tervetes kudedes ka kahe antiviraalse toimega ehk AVP valgu geeniekspressiooni, mille üleregulatsiooni psoriaatilises nahas on varem täheldatud. Nendeks psoriaasiga seostatud geenideks on müksoviiruse (MX) dünaamiini sarnane GTPaas 1 (*MX Dynamin Like GTPase 1*, MX1 või MxA) (Schmid jt., 1994; Fähr jt., 1995; Wolk jt., 2013) ning luuüdi stroomarakkude antigeen 1 (*Bone Marrow Stromal Cell Antigen 2*, BST2) (Wolk jt., 2013; Raposo jt., 2015). Ühe (madala PASI-indeksiga ning varajase haiguse vormiga)

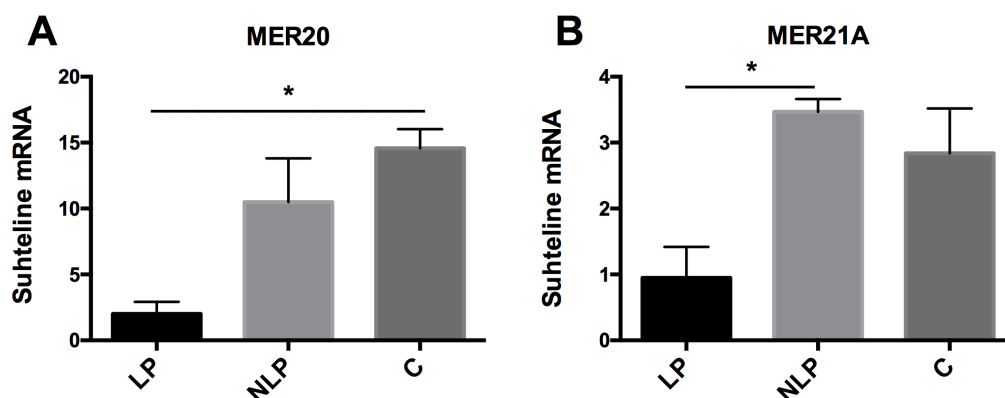
psoriaasihaige patsiendi proovide ning kahe erineva terve kontrolliga teostatud katse puhul eelnimetatud geenidega ilmnes, et HERV-Fc1 *gag* ekspressioon jääb konkreetse meetodiga uurimiseks liiga madalaks ning mingit eristumist polnud võimalik tuvastada (joonis 6), kuid HERV-W *env* korral oli teatav ekspressioon tuvastatav ainult lööbelise naha puhul. AVP geenide puhul olid katsetulemused ootuspärased vähemalt MX1 korral, mille puhul võis näha lööbelises nahas märgatavalt kõrgemat ekspressiooni kui mittelööbelise nahas ja terve kontrolli nahas (joonis 6). ERV-L perekonda kuuluva LTR57 (<http://dfam.org/entry/LTR57>) puhul polnud samuti eristuvat ekspressiooni võimalik tuvastada (joonis 6).



Joonis 6. HERV ja AVP geenide mRNA ekspressiooni visuaalne võrdlus geelelektroforeesil psoriaatilise lööbega (LP), visuaalselt terves (NLP) ning terve kontrolli (C) nahas. Katse on tehtud varajase haiguse vormiga patsiendi (PASI-indeksiga 5) ja terve kontrolli proovidega, millega viidi läbi PCR reaktsioonid ning mille produkte analüüsiti DNA geelelektroforeesiga 2% agarosgeelil.

2.3.2. HERV ja AVP geenide ekspressiooni analüüs reaalka PCR meetodil

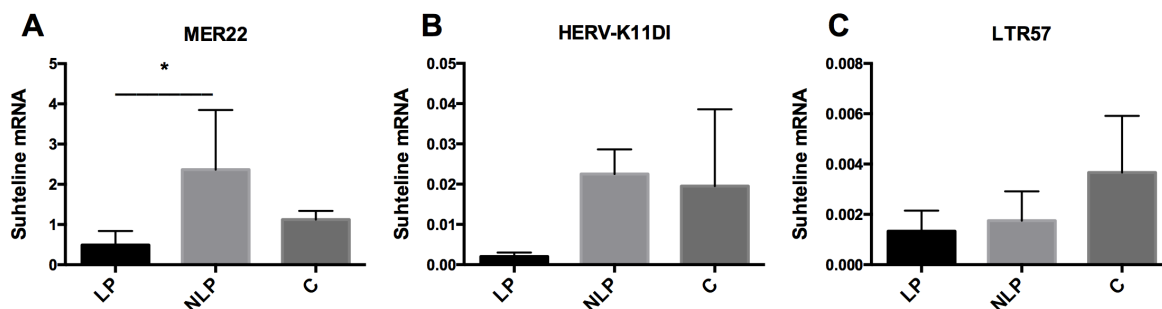
Et veenduda eelnevate PCR analüüside tulemuste korrektsuses ning saada kvantifitseeritavaid tulemusi, teostati edasised analüüsid reaalka PCR meetodiga (*real-time PCR*, rt-PCR või qPCR). Sel meetodil mitme patsiendiga tehtud katsete tulemused olid kooskõlas eelnevalt teostatud PCR analüüside tulemustega (joonis 4) nii MER21A kui ka MER22 puhul, kus patsientide lööbelistes proovides olid uuritavad geenid võrrelduna lööbevabade proovide ja tervete kontrollidega tugevalt alla reguleeritud (joonised 7B ja 8A). Ka MER20 puhul, mille ekspressioonimäär eelnevate katsete puhul oli kas eristumatu või mõnevõrra kõrgem ekspressioon esines just lööbelises nahas, näitasid reaalka PCR tulemused lööbelises nahas tugevat geeniekspressiooni repressiooni (joonis 7A). MER20 puhul oli ekspressioon lööbelises nahas võrrelduna mittelööbelise nahaga keskmiselt 5,25 korda ning võrrelduna terve kontrolliga statistiliselt olulisel määral 7,3 korda madalam (joonis 7A). MER21A korral esines lööbelises nahas keskmiselt 3,6 korda madalam ekspressioon kui mittelööbelises nahas, mis on samuti statistiliselt oluline erinevus (joonis 7B).



Joonis 7. *MER20* ja *MER21A* mRNA suhteline ekspressioon psoriaatilise lööbega (LP), visuaalselt terves (NLP) ning terve kontrolli (C) nahas. *MER20* (A) ja *MER21A* (B) mRNA ekspressiooni andmed on normaliseeritud konstitutiivselt ekspresseeritava *ACTB* geeni suhtes. * tähistab statistiliselt olulist erinevust märgitud tingimuste võrdluses. Statistiliselt olulise erinevuse selgitamiseks kasutati Kruskal-Wallise või Studenti t-testi ja olulisusnivood 0,05. Väärtuste standardhälbed on markeeritud vearibadega ja esitatud on kolme patsiendi nahabiopsiatega sooritatud sõltumatu korduskatse tulemused.

MER22 puhul esines lööbelises nahas statistiliselt oluline keskmiselt 4,9 korda madalam ekspressioon kui mittelööbelises nahas (joonis 8A), LTR57 korral, mille ekspressioon polnud geelelektroforeesil tuvastatav, võis võrrelduna terve kontrolliga lööbelises nahas näha keskmiselt 2,7 korda madalamat ekspressiooni (joonis 8B) ning HERV-K perekonda kuuluv HERV-K11DI (<http://dfam.org/entry/DF0000190>), mis oli samuti elektroforeesil

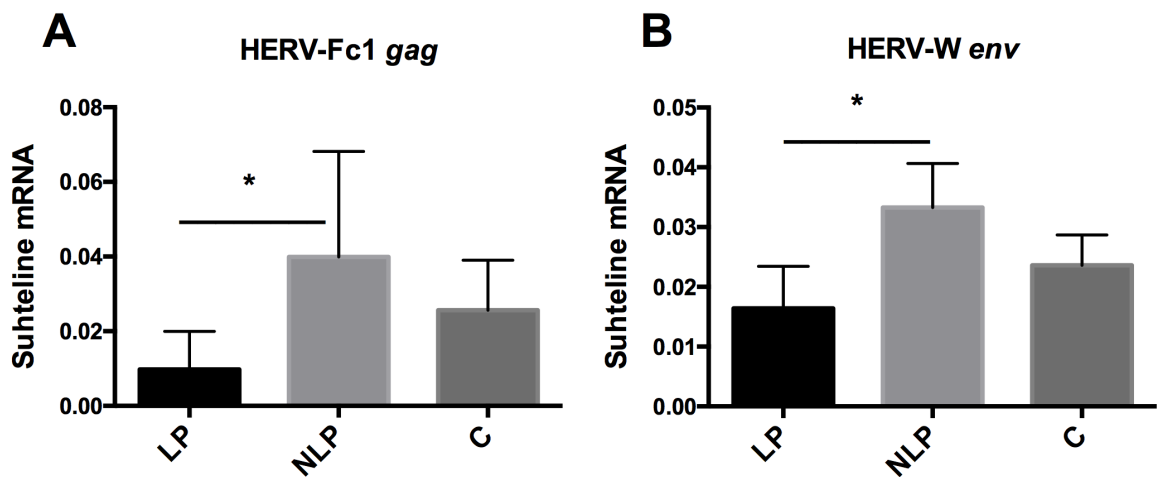
tuvastamatu, ekspresseerus lööbelises koes keskmiselt 11,6 korda vähem kui mittelööbelises (joonis 8C).



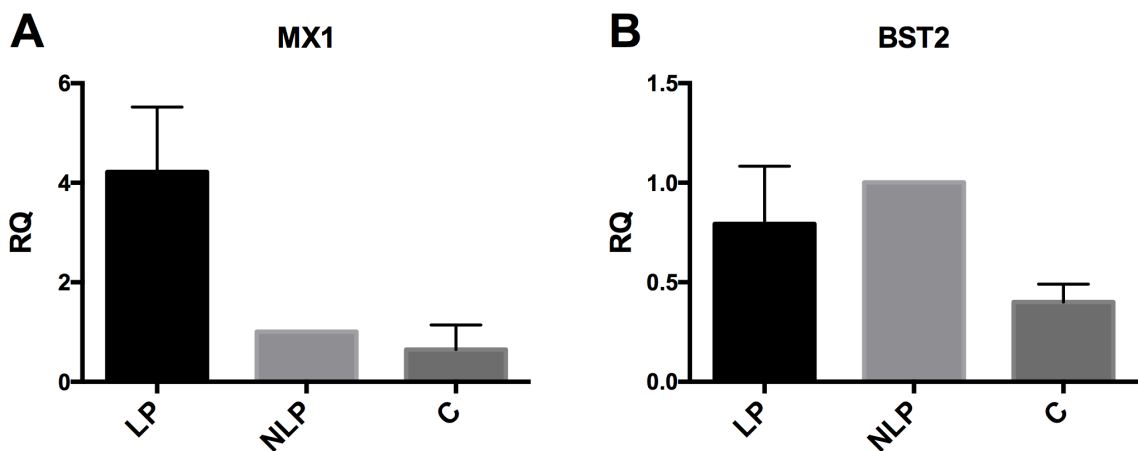
Joonis 8. *MER22*, *HERV-K11DI* ja *LTR57* mRNA suhteline ekspressioon psoriaatilise lööbega (LP), visuaalselt terves (NLP) ning terve kontrolli (C) nahas. *MER22* (A), *HERV-K11DI* (B) ja *LTR57* (C) mRNA ekspressiooni andmed on normaliseeritud konstitutiivselt ekspresseeritava *ACTB* geeni suhtes. * tähistab statistiliselt olulist erinevust märgitud tingimuste võrdluses. Statistiliselt olulise erinevuse selgitamiseks kasutati Kruskal-Wallise või Studenti t-testi ja olulisusnivood 0,05. Väärtuste standardhälbed on markeeritud veariivadega ja esitatud (A) 3–4, (B) 3 ja (C) 6–8 patsiendiga nahabiopsiatega sooritatud sõltumatu korduskatse tulemused.

Katsed reaalaja PCR meetodiga viidi läbi ka eelnimetatud teiste autoimmuunhaigustega seoses uuritud HERV geenidega HERV-Fc1 ja HERV-W ning AVP geenidega MX1 ja BST2. HERV-Fc1 *gag*, mille ekspressioon polnud geelelektroforeesil tuvastatav, ning HERV-W *env*, mille puhul võis näha kõrgeenenud ekspressiooni just lööbelise koeproovi puhul. Reaalaja PCR katsed nende geenidega näitasid, et HERV-Fc1 *gag* ja HERV-W *env* on mittelööbelises piirkonnas võrreldes lööbelise piirkonnaga statistiliselt oluliselt määral keskmiselt vähem ekspresseeritud, vastavalt 4 (joonis 9A) ja 2 (joonis 9B) korda, mis viitab teatavale uuritavate geenide ekspressiooni repressioonile ning on korrelatsioonis varasemate ekspressiooniuringute tulemustega ka teiste autoimmuunhaiguste kontekstis (Laska jt., 2012, Nogueira jt., 2015).

AVP geenide ekspressiooni mõõtmiste tulemused normaliseeriti suure patsientidevahelise mõõtmistulemuste hajuvuse tõttu mittelööbelise kontrolli suhtes ning nende baasil on näha, et MX1 on lööbelises nahas ekspresseeritud võrreldes mittelööbelise nahaga keskmiselt 4,22 korda ja võrreldes terve kontrolliga 6,5 korda kõrgemalt (joonis 10A), mis on kooskõlas ka PCR ja geelelektroforeesi tulemustega. BST2 puhul aga ei saa väita, et geeni ekspressioon oleks psoriaatilises koes märkimisväärselt kõrgem kui kontrollides (joonis 10B), kuid on võrrelduna terve kontrolliga mittelööbelises koes ekspresseeritud keskmiselt 2,5 korda kõrgemalt.



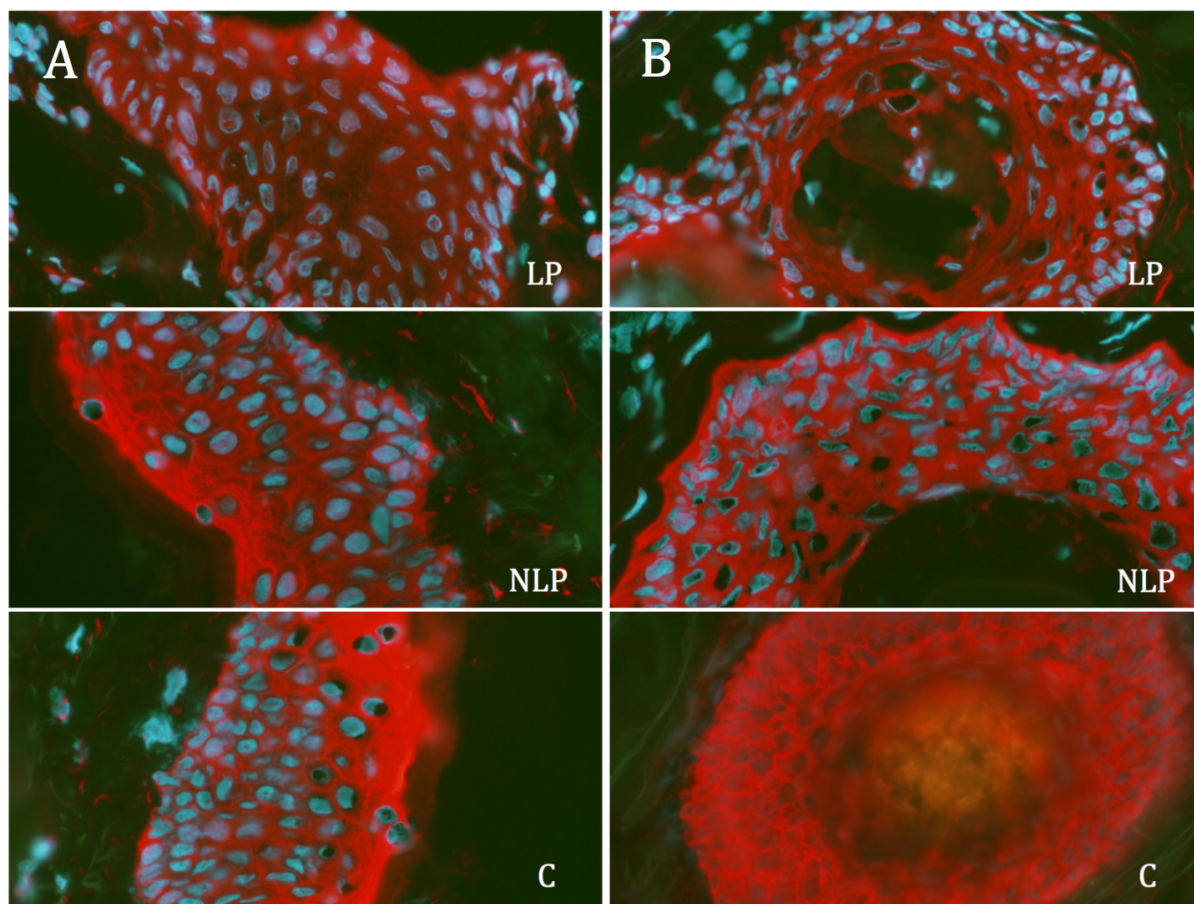
Joonis 9. HERV-Fc1 *gag* ja HERV-W *env* mRNA suhteline ekspressioon psoriaatilise lööbega (LP), visuaalselt terves (NLP) ning terve kontrolli (C) nahas. HERV-Fc1 *gag* (A) ja HERV-W *env* (B) mRNA ekspressiooni andmed on normaliseeritud konstitutiivselt ekspresseeritava *ACTB* geeni suhtes. * tähistab statistiliselt olulist erinevust märgitud tingimuste võrdluses. Statistiliselt olulise erinevuse selgitamiseks kasutati Kruskal-Wallise või Studenti t-testi ja olulisusnivood 0,05. Väärtuste standardhälbed on markeeritud vearibadega ning esitatud on (A) 5–9 ja (B) 4–5 patsiendi nahabiopsiatega sooritatud sõltumatu korduskatse tulemused.



Joonis 10. Antiviraalsete valkude MX1 (MxA) ja BST2 mRNA suhteline ekspressioon psoriaatilise lööbega (LP), visuaalselt terves (NLP) ning terve kontrolli (C) nahas. MX1 (MxA) (A) ja BST2 (B) mRNA ekspressiooni andmed on esitatud konstitutiivselt ekspresseeritava *ACTB* geeni suhtes. RQ (*Relative Quantity*) on suhteline ekspressiooni määr võrrelduna NLP mRNA ekspressiooni määraga. * tähistab statistiliselt olulist erinevust märgitud tingimuste võrdluses. Statistiliselt olulise erinevuse selgitamiseks kasutati Kruskal-Wallise või Studenti t-testi ja olulisusnivood 0,05. Väärtuste standardhälbed on markeeritud vearibadega ning esitatud on 3 patsiendi nahabiopsiatega sooritatud sõltumatu korduskatse tulemused.

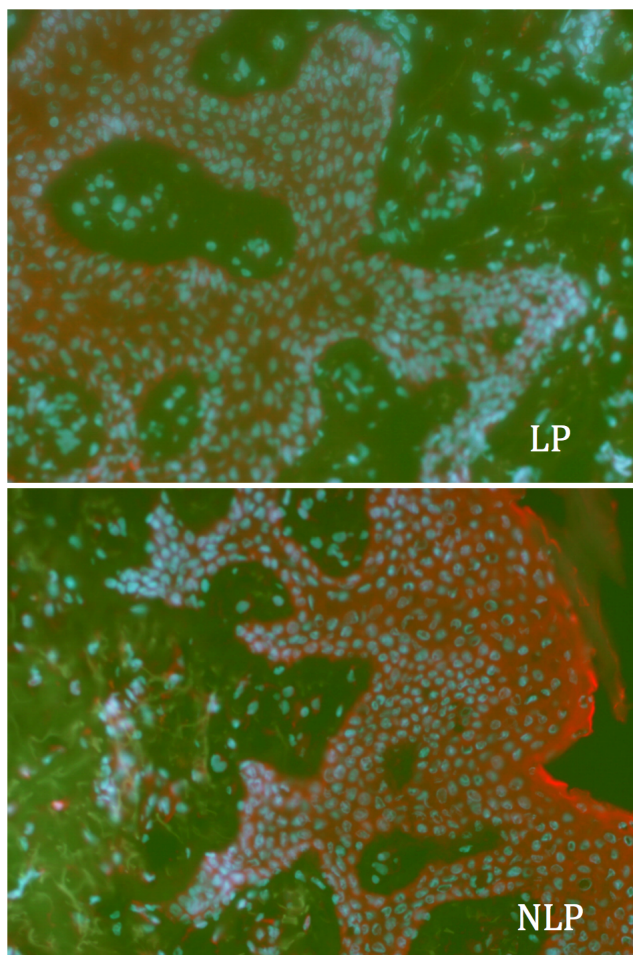
2.3.3. HERV-W *env* valgu ekspressioon psoriaasiga ning terves nahas

Uurimaks psoriaatilises ja terves koes HERV ekspressiooni valgulisel tasandil teostati kolme naastulise psoriaasi (*Psoriasis vulgaris*) patsiendi (lööbelise ja mittelööbelise) ning terve kontrolli nahabiopsiate külmlõikudega immunofluorestsentsanalüüs, milleks kasutati HERV-W *env* valguga seondavat antikeha. Töös kasutatud antikeha tootja info põhjal ei seonu antikeha poolt seostatav valk membraanile (<http://www.abcam.com/herv-antibody-ab71115.html>), vaid on transmembraansete valkude vahendusel lokaliseerunud rakuvälisele pinnale, mida võiks väita ka joonise 11A visuaalselt terve koe (NLP) ja terve kontrolli (C) mikrofotode põhjal, kus rakumembraanis esineb mõnevõrra intensiivsem värvumine. Nii psoriaasipatsientide erinevatest piirkondadest pärit kui ka tervete kontrollide biopsiatest tehtud koelõikudel tuvastati ühtlasi tugevalt eristuv ning intensiivne värvumine, nagu näha joonisel 11.



Joonis 11. HERV-W *env* valgu ekspressioon psoriaatilise lööbega (LP), visuaalselt terve (NLP) ning terve kontrolli (C) naha keratinotsüütides (A) ja karvafolliikuli rakkudes (B). Immunofluorestsents analüüsil kasutati süntsütiin-1 vastast küüliku polükloonaalset antikeha (Abcam, ab71115), mis tuvastati punaselt fluorestseeruva märgisega (Alexa Fluor® 594, Invitrogen) konjugeeritud sekundaarse antikehaga. Jäädvustatud koelõigud on epidermise basaalkihist, mille rakkude tuumad on värvunud DAPIga (helesinine). LP ja NLP koelõigud on pärit sama patsiendi eri piirkondadest.

Kõige intensiivsem värvumine oli valdavalt jaotunud diferentseerunud keratinotsüütide ja juba sarvestunud rakkudega naha kihtides, nagu näha joonisel 12 NLP, mille puhul küll olenemata konkreetse ülesvõtte võrdlemisi tugevast autofluorestsentsist on kõige paremini näha uuritava naha terve läbilõige koos *Stratum corneum*’i ehk sarvkihiga. Lisaks nimetatule on intensiivsemalt värvunud sarvkiht hästi eristuv ka joonise 11A NLP mikrofoto puhul. Lisaks on ühtlaselt tugev HERV-W *env* valgu ekspressioon nähtav ka karvafolliikuli rakkudes (joonis 11B), kuid mille puhul mikrofoto 11B kontrolli (C) osas on DAPI sisaldusega fluorestsentsi kustumist pärssiva sulunduslahuse ebaühtlase pealekandmise tõttu jäänud rakutuomad DAPI poolt värvumata. Nende immunofluorestsentsanalüüsi mikrofotoode baasil on võimalik eristada ka mõningast intensiivsuse erinevust lööbeliste ning mittelööbeliste ja tervete kontrollide vahel, mille puhul lööbelistes kudedes näib värvumine olevat mõnevõrra madalama intensiivsusega, kuid nende tulemuste puhul ei õnnestunud fluorestsentsi intensiivsust kvantifitseerida ning puhtalt empiirilise tähelepaneku baasil ei saa seda ka kindlalt väita. Kuigi jooniste NLP ülesvõtete puhul pole võimalik täheldada oluliselt intensiivsemat värvumist kui LP ja C vahel, võib väita, et HERV-W *env* valgu ekspressioon on enamjaolt kooskõlas seda valku kodeeriva geeni ekspressiooni mõõtmise tulemustega nagu näha joonisel 9B.



Joonis 12. HERV-W *env* valgu ekspressioon lööbelise (LP), visuaalselt terve (NLP) psoriaasiga ning terve (C) naha keratinotsüütides. Immunofluorestsents teostati süntsütiin-1 vastase küüliku polükloonaalse antikehaga (Abcam, ab71115), mis tuvastati punaselt fluorestseeruva märgisega (Alexa Fluor® 594, Invitrogen) konjugeeritud sekundaarse antikehaga. Jäädvustatud koelõigud on epidermise basaalkihist, mille rakkude tuumad on värvunud DAPIga (helesinine). LP ja NLP koelõigud on pärit sama patsiendi eri nahapiirkondadest.

2.4 Arutelu

Saamaks paremat arusaama psoriaasi tekkemehhanismidest ning kontrollimaks varem samas kontekstis avaldatud tulemusi uuriti selle magistritöö raames endogeensete retroviiruste ning antiviraalse vastusega seostatud geenide ekspressiooni psoriaatilistes kudedes nii konventsionaalse kui ka reaalaja PCR meetodil. Lisaks visualiseeriti immunofluorestsentsi meetodil psoriaatilistes ja tervetes kudedes HERV-W *env* valgu lokalisatsioon, et analüüsida HERV ekspressiooni ka valgulisel tasemel.

Töö raames tehti uuritavate geenide konventsionaalne PCR analüüs iga patsiendi biopsiatega vähemalt kahes korduses ning reaalaja PCR puhul sooritati üheaegselt reaktsioon kahes või kolmes korduses. Patsientide arv varieerus kolmest üheksani, sõltuvalt geenist, mille ekspressiooni analüüsiti. HERV-W *env* valgu ekspressiooni ja lokalisatsiooni analüüsiti kolme patsiendi ning kolme terve kontrollindiviidi nahabiopsiates. Mõlemat tüüpi PCR analüüside tulemustest võis järeldada, et üldiselt on uuritud HERV geenid lööbelise psoriaasiga nahas märgatavalt madalamalt ekspresseerunud kui visuaalselt terves ning mõnel juhul ka terve kontrolli nahas nagu võib näha joonistel 4, 7, 8, ja 9. Samas on lööbelises koes võrrelduna terve kontrolliga ja visuaalselt terve nahaga kõrgemalt ekspresseerunud MX1, mis on olnud oodatav tulemus. HERV-W *env* valgu ekspressioonis arvestatavat erinevust proovide vahel ei tuvastatud.

Peamistest tulemustest võib järeldada ka varem täheldatud nähtust (Gupta jt., 2014), mille puhul on HERV geenide ekspressioon psoriaasi patoloogia korral lööbelises nahas üldiselt represseritud võrrelduna visuaalselt terve ning tervete kontrollide nahaga. Kuigi viimaste puhul pole tulemused katsealuste geneetiliste iseärasuste tõttu küll nii hästi võrreldavad kui samade patsientide eri proovide vahel. Eelmises peatükis kirjeldatud tulemustest on näha, et kõnealune antiviraalne repressioon psoriaatilises koes tundub olevat omane uuritud HERV-L, -K, -H/F ja -W perekondade esindajatele ja muudele kordusjärjestustele nagu MER22 ja MER20. Lisaks uuriti töös kahe antiviraalse vastusega seotud geeni MX1 ja BST2 ekspressiooni psoriaatilises nahas, mille raames õnnestus tuvastada vähemalt MX1 märgatav üleekspressioon lööbelises koes võrrelduna mittelööbelisega ning terve indiviidi kontrolliga (statistiliselt mitteolulised tulemused), mis on kooskõlas varemavaldatuga (Schmid jt., 1994; Fähr jt., 1995, Wolk jt., 2013) ning ühtlasi viitab, et töös analüüsiti tõepoolest psoriaatilise lööbega kudesid.

Magistritöö tulemustest võis järeldada ka, et vähemalt HERV-W *env* valgu ehk süntsütiin-1 ekspressiooni vahel nii lööbelises, mittelööbelises kui ka terves nahas ei esine märkimisväärseid visuaalselt tuvastatavaid erinevusi. See on ühtlasi ka meile teadaolevalt esmakordne süntsütiin-1 ekspressiooni visualiseerimine antud meetodil psoriaatilises nahas. Lisaks pole meile teadaolevalt eelkirjeldatud meetoditel uuritud ka selliste endogeensete retroviiruste ning kordusjärjestute nagu MER22, MER21A, MER20, LTR57, HERV-K11DI geeniekspressiooni psoriaatilises koes. Kuigi töös esitletud tulemused pole võrdlemisi väikese valimi tõttu nii suure kaaluga, kui võiks soovida, esines sellegipoolest mitmeid statistiliselt olulisi tulemusi, nagu on võimalik näha joonistel 7, 8A, ja 9. Nimetatud statistiliste tulemuste olemasolu viitab võimalusele ja vajadusele konkreetseid gene edasi uurida ja analüüsida psoriaasi patoloogia ning ka teiste reumaatiliste ja autoimmuunhaiguste kontekstis.

Samas ei saa ka töös esitletud tulemuste baasil rääkida põhjuslikkusest reprotransposoonsete järjestuste kui võimalike psoriaasi patoloogiaid indutseerivate faktoritena, vaid korrellatsioonist, mis tuleneb psoriaatilises nahas toimuvate põletikuliste protsesside mõjust ning mille on üldistatult esile kutsunud eelkõige TNF α , IL23 ja Th17 (Boehncke ja Schön, 2015; Capon jt., 2007), viies omakorda antiviraalsete faktorite ekspressiooni tõusuni (Raposo jt., 2015). Töös kasutatud psoriaasipatsientide ja tervete kontrollide biopsiatest eraldatud RNA proovidega varem teostatud ja publitseeritud (Keermann jt., 2015) geeniekspressiooni analüüsil täheldati samuti mitme antiviraalse faktori nagu APOBEC3G ning SAMHD1 kõrgemat ekspressiooni psoriaatilistes kudedes võrrelduna tervete kontrollidega. Esimene neist faktoritest ehk tsütidiini deaminaas indutseerib mutatsioonide teket viraalses geneetilises materjalis (Esnault jt., 2005), SAMHD1 aga vastutab pöördtranskriptaasi inhibitsiooni eest (Lahouassa jt., 2012).

Nende faktorite kõrgema ekspressioonimääraga akuutsema haiguse korral võiks seletada ka selles töös ilmnenu nähtust, kus konventsionaalse PCR ja DNA geelelektroforeesi tulemustes võis märgata teatavat seost PASI indeksi ning HERV geenide ekspressiooni vahel. Nagu näha joonistel 4, 5 ja 6, esineb võrdväärsete metodoloogiliste tingimuste korral nii geenide MER22, MER21A ning MER20 ekspressiooni mustri kui ka intensiivsuses märgatav erinevus ning konkreetseid erinevusi illustreerib veel enam joonisel 6 HERV-W geeni eristatavalt kõrgem ekspressioon just psoriaatilise lööbega proovis. Samas võib nimetatud nähtuste puhul tegemist olla ka kõigest patsientide geneetiliste iseärasustega, mis vähemalt ekspressiooni mustri puhul võib tuleneda näiteks katseisikute HERV geenide

erinevast epigeneetilisest regulatsioonist, millel on täpsemalt peatunud alapeatükis “HERVide seosed autoimmuunhaigustega”. Samas oleks huvitav näha näiteks uurimistulemusi HERV geenide metüleerituse seostest vananemisega, kuna on teada, et vananemisega kaasneb genoomis tugev hüpomethylatsioon (Heyn jt., 2012).

Nimetatud HERV geenide repressiooni psoriaatilises koes on Nogueira ja kolleegid täheldanud ka psoriaasile sarnase, ebaselgete tekkepõhjustega ning põletikulise nahahaiguse lameda sammaspoole (*Lichen planus*) puhul, mille lööbelises koes on mitmed HERV-K ning HERV-W geenid statistiliselt olulisel määral madalamalt ekspresseeritud kui terves koes. Lisaks esines lööbelistes kudedes märgatavalt kõrgem APOBEC3G, MX1 ning mitme teise AVP geeni ekspressioon. Ühtlasi on selles töös kasutatud samu praimereid HERV-W *env* ja MX1 geenide amplifitseerimiseks ning uuritud geenide ekspressioonimustrid tööde vahel korreleerusid. (Nogueira jt., 2015)

Peale Nogueira ja kolleegide tööst saadud praimerite kasutati selles töös HERV-Fc1 *gag* ekspressiooni uurimiseks ka Laska ja kolleegide publitseeritud artikli baasil tellitud ja rakendatud praimereid, kuna nende tulemustest selgus, et HERV-Fc1 *gag* ekspressioon on märgatavalt kõrgem aktiivse polüskleroosi korral, mis on samuti üks levinumatest autoimmuunhaigustest. Samas selle töö tulemused ei korreleerunud Laska ja kolleegide kirjeldatuga. Meie tulemustest selgus, et ka HERV-Fc1 *gag* ekspressioon on repressseeritud lööbelises psoriaatilises nahas, samas esines kõige kõrgem ekspressioon siiski visuaalselt terves nahas, nagu võib näha jooniselt 9A. Konkreetseid erinevusi võib seletada asjaolu, et tegemist on siiski võrdlemisi erinevate autoimmuunhaigustega ning HERV geenide ekspressiooni suure koespetsiifilisusega (Seifarth jt., 2004), kuna Laska ja kolleegid uurisid geeni ekspressiooni perifeerses veres (Laska jt., 2012) ning HEK 293 rakuliinis (Laska jt., 2013).

Huvitavat koespetsiifikat võis näha ka HERV-W *env* valgu ekspressiooni puhul, mille kohta on ka teada, et see HERV on evolutsiooni jooksul omandanud organismiga teatava mutualistliku interaktsiooni ning ekspresseerituna platsentas osaleb süntsütiin-1 süntsütiotrofoblasti moodustumisel ning selle ekspressiooni langus võib viia raseduse poolt esile kutsutud arteriaalse hüpertensioonini (Kudaka jt., 2008). Konkreetse töö raames tehtud immunofluorestsentsanalüüs näitas, et see valk on ekspresseeritud nahas vaid epidermises ning kõige kõrgemal kontsentratsioonil selle sarvestunud keratinotsüütide kihtides, samas retikulaarses dermises ehk mesenhüümis tundub süntsütiin-1 tuvastataval tasemel puuduvat

(joonis 12) ning sarnaseid tulemusi on varasemalt publitseeritud ka HERV-E *env* puhul (Bessis jt., 2004). Sellist nähtust võiks aga põhjendada asjaoluga, et põletikuliste protsessidega ning antiviraalse repressiooniga seotud faktorid on eelkõige ekspresseeritud just epidermises (Pastore jt., 2008; Wolk jt., 2013).

Lisaks HERV geenide erinevale avaldumismustrile erinevates kudedes esineb nende gene tuhandetes erinevates lookustes üle kogu genoomi, mis oluliselt raskendab nende uurimist töös kasutatud meetoditega. Arvestades selle asjaoluga tuleks edaspidi disainida praimerid vähem konserveerunud järjestustele, et suurendada lookusspetsiifikat ning vähendada tõenäosust, et amplifitseeritakse rohkem HERV järjestusi, kui on soovitud. Samuti nagu kirjeldatud HERVide struktuuri ja regulatsiooni peatükis, on neil geenidel leitud mitmeid aktiivseid reguleerivaid elemente, mis võivad tugevalt mõjutada ka teiste geenide regulatsiooni ja ekspressiooni, ning mida tuleks veel täiendavalt uurida. Seda enam, et osad senised tulemused, mis näitavad, et retrotransposoonse päritoluga järjestustes olevatel reguleerivatel elementidel on oma osa ka näiteks amüotroofse lateraalskleroosi patoloogia väljakujunemisel (Savage jt., 2014). Samas võib arvestada, et ka teiste, genoomis HERVidega naabruses asuvate geenide aktiivsetel elementidel võib olla indutseeriv toime HERV geenidele, seepärast oleks huvitav uurida ka erinevaid promotoreid HERV geenide läheduses, millel võib antud juhul psoriaasi korral esineda HERV geenide ekspressiooni reguleerivaid modulaatoreid.

Nagu eelpool mainitud, on nii varasemad kui ka see töö kirjeldanud nähtust, mille puhul HERV geenid on ekspresseeritud psoriaatilise lööbega nahas võrrelduna visuaalselt terve nahaga ning tervete indiviidide kontrollproovidega. Kuigi pikalt on püütud tõestada HERVide põhjuslikku seostatust psoriaasi patoloogia tekkemehhanismidega, ei leidnud ka see töö sellele hüpoteesile otsest kinnitust. Samas esineb mitmeid väljapakutud ning ka magistratöökirjanduse osas põhjalikumalt analüüsitud mehhanisme nagu molekulaarne mimikri, mõju organismi geeniregulatsioonile ning superantigeenid, mis võiksid siiski seletada, kuidas HERVid võivad potentsiaalselt olla seotud konkreetse haiguse tekkepõhjustega, mistõttu ei tasuks selles kontekstis HERVide uurimist veel niipea lõpetada.

Kokkuvõte

Magistritöö eesmärgiks oli saada uusi teadmisi inimese endogeensete retroviiruste ja psoriaasi tekkemehhanismide vaheliste seoste kohta, kuna siiani avaldatud andmed on kirjeldanud HERV geenide nii baastasemest madalamat kui ka mõnel juhul kõrgemat ekspressiooni. Selleks uuriti ja analüüsiti töö raames erinevate molekulaarsete meetoditega meie uurimisgrupis eelnevalt teostatud kogu psoriaatilise koe RNA sekveneerimise andmete baasil enim huvi pakkunud HERV geenide ekspressiooni lööbelise ja mittelööbelise psoriaasiga ning terves nahas. Lisaks mõõdeti varem psoriaasiga seostatud geenide MX1 ja BST2 ekspressiooni ning visualiseeriti HERV-W *env* valgu ekspressioon ja lokalisatsioon psoriaatilises ning terves nahas immunofluorestsentsmeetodil.

Töös esitatud nii konventsionaalse kui ka reaallaja PCR meetodil saadud tulemused on enamjaolt kooskõlas varemkirjeldatud nähtuse ning hüpoteesiga, et HERV geenid on erinevate autoimmuunsete haiguste korral immuunsüsteemi poolt represseeritud põletikuliste reaktsioonide moduleerimise kaasmõjul. Tulemustest selgusid mitmed HERV ning ka mõne teise kordusjärjestuse geenid, mis on psoriaatilise lööbega nahas represseeritud statistiliselt olulisel määral, võrrelduna visuaalselt terve või terve kontrolli nahaga. Lisaks eristus ka vähemalt MX1 geeni puhul lööbelises nahas arvestatav üleekspressioon, mis viitab viraalset päritolu põletikulistele reaktsioonidele nahas. Samas ei õnnestunud tuvastada olulisi erinevusi HERV-W *env* valgu ekspressioonis psoriaatilise, visuaalselt terve ning terve kontrolli kudedes.

Gene and protein expression analysis of human endogenous retroviruses in psoriatic and healthy skin

Summary

Martin Kala

Understanding the mechanisms behind the pathogenesis of autoimmunity has long been a major challenge for researchers and physicians around the world. There are numerous hypotheses and explanations trying to understand the underlying cause for such condition yet so far no single fundamental aspect has been associated with the rise of autoimmune diseases. Among others, human endogenous retroviruses – the relatives of ancient exogenous viruses in our genomes – have been under investigation and considered as potential triggers of autoimmunity, although such a role has also not yet been confirmed. Even though the roughly 8% of HERV genes that reside in our genome are inactivated due to countless mutations that have accumulated during the past millions of years, some of them still retain functional open reading frames and active elements that could have an impact for the cells' normal homeostasis and thereby lead to possible pathologies.

One of the pathological conditions HERVs have been associated with before in numerous studies are autoimmune diseases. One of the most common diseases with an autoimmune background is psoriasis, which affects approximately 2–3% of Caucasians around the world. Although some therapies and drugs exist to alleviate the symptoms, no real treatment has been discovered so far. Previous studies trying to understand the connection between these two have described mixed results, showing that certain HERV genes are overexpressed in psoriatic skin and some have found them to be repressed compared to healthy controls.

In this thesis, we have studied and evaluated the expression of selected HERV genes, based on previously conducted RNA sequencing results from our research group, in psoriatic and healthy skin using conventional and real-time PCR. We also analysed the expression and localization of HERV-W *env* protein in psoriatic and healthy skin biopsies and measured the gene expression of two antiviral proteins. Our results mostly correlated with previous findings that showed a significant repression of HERV genes in lesional skin samples compared to non-lesional and healthy skin. HERV-W *env* protein expression analysis in psoriatic and healthy skin biopsies did not find any relevant differences in its expression and localization.

Tänuavaldused

Eelkõige soovin tänada oma kaasjuhendajat, professor Margus Poogat, kes leidis ka oma puhkuse arvelt aega, et anda mu tööle väärtuslikku ning põhjalikku tagasisidet.

Lisaks soovin tänada kasulike tehniliste ja vormistuslike nõuannete eest Lumme Kadajat, Ele Pransi, Marko Piirsood ja professor Sulev Kõksi. Eraldi väärivad suurt tänu mu oma õde, Merike Kala, kes suutis minu kohati krüptilised laused kõigile loetavaks muuta ning ka mulle anonüümseks jäänud katseisikuid, kes olid sõna otseses mõttes nõus loovutama tüki endast käesoleva töö ning teaduse arengu hüvanguks..

Kirjanduse loetelu

Agmon-Levin, N., Ram, M. and Barzilai, O. (2009). Prevalence of hepatitis C serum antibody in autoimmune diseases. *J Autoimmun*; 32: 261–6.

Anderssen, S., Sjøttem, E., Svineng, G. and Johansen, T. (1997). Comparative analyses of LTRs of the ERV-H family of primate-specific retrovirus-like elements isolated from marmoset, African green monkey, and man. *Virology* 234, 14–30.

Arnett, F. C. and Reveille, J. D. (1992). Genetics of systemic lupus erythematosus. *Rheum Dis Clin North Am*; 18: 865–92.

Bannert, N. and Kurth, R. (2004). Retroelements and the human genome: new perspectives on an old relation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Oct 5; 101.

Bannert, N. and Kurth, R. (2006). The Evolutionary Dynamics of Human Endogenous Retroviral Families. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 7(1), 149–173.

Basavaraj, K. H., Ashok, N. M., Rashmi, R. and Praveen, T. K. (2010). The role of drugs in the induction and/or exacerbation of psoriasis. *Int J Dermatol*; 49: 1351–61.

Belshaw, R., Dawson A. L., Woolven-Allen, J., Redding, J., Burt, A., Tristem, M., (2005). Genomewide screening reveals high levels of insertional polymorphism in the human endogenous retrovirus family HERV- K(HML2): implications for present-day activity. *J. Virol.* 79, 12 507–12 514.

Bengtsson, A., Blomberg, J., Nived, O., Pipkorn, R., Toth, L. and Sturfelt, G. (1996). Selective antibody reactivity with peptides from human endogenous retroviruses and nonviral poly(amino acids) in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1996 Oct;39(10):1654–63.

Benit, L., Lallemand, JB., Casella, J. F., Philippe, H. and Heidmann T. (1999). ERV-L elements: a family of endogenous retrovirus-like elements active throughout the evolution of mammals. *J. Virol.* 73, 3301–3308.

Bessis, D., Moles, J. P., Basset-Seguín, N., Tesniere, A., Arpin, C. and Guilhou, J. J. (2004). Differential expression of a human endogenous retrovirus E transmembrane envelope glycoprotein in normal, psoriatic and atopic dermatitis human skin. *British Journal of Dermatology*, 151(4), 737–745.

Bijlmakers, M. J., Kanneganti, S. K., Barker, J. N., Trembath, R. C. and Capon, F. (2011). Functional analysis of the RNF114 psoriasis susceptibility gene implicates innate immune responses to double-stranded RNA in disease pathogenesis. *Hum Mol Genet*, 20:3129–3137.

Blank, M., Shoenfeld, Y., & Perl, A. (2009). Cross-talk of the environment with the host genome and the immune system through endogenous retroviruses in systemic lupus erythematosus. *Lupus*, 18(13), 1136–1143.

- Blomberg, J., Ushameckis, D. and Jern, J. (2013). Evolutionary Aspects of Human Endogenous Retroviral Sequences (HERVs) and Disease. Madame Curie Bioscience Database - NCBI Bookshelf
- Boehncke, W. H. and Schön, M. P. (2015). Seminar Psoriasis. *The Lancet*, 386(9997), 983–994.
- Boeke, J. D. and Stoye, J. P. (1997). Retrotransposons, endogenous retroviruses, and the evolution of retroelements. *Retroviruses*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, 343–435
- Brothman, A. R., Swanson, G., Maxwell, T. M., Cui, J., Murphy, K. J., Herrick, J., Speights, V. O., Isaac, J. and Rohr, L. R. (2005). Global hypomethylation is common in prostate cancer cells: a quantitative predictor for clinical outcome? *Cancer Genet Cytogenet.* Jan 1;156(1):31-6.
- Capon, F., Di-Meglio, P. and Szaub, J. (2007). Sequence variants in the genes for the interleukin-23 receptor (IL23R) and its ligand (IL12B) confer protection against psoriasis. *Hum Genet*; 122: 201–06.
- Chamian, F. and Krueger, J. G. (2004). Psoriasis vulgaris: an interplay of T lymphocytes, dendritic cells, and inflammatory cytokines in pathogenesis. *Curr Opin Rheumatol.* Jul;16(4):331-7.
- Chen, R. Z., Pettersson, U., Beard, C., Jackson-Grusby, L. and Jaenisch, R. (1998). DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates. *Nature*; 395: 89–93.
- Coffin, J. M. (1994). Structure and Classification of Retroviruses. 19–49. *In The Retroviridae*, J Levy (ed.). New York: Plenum.
- Conrad, B., Weissmahr, R. N., Böni, J., Arcari, R., Schüpbach, J. and Mach, B. (1997). A Human Endogenous Retroviral Superantigen as Candidate Autoimmune Gene in Type I Diabetes. *Cell*, Vol. 90, 303–313
- Contreras-Galindo, R., Kaplan, M. H., Leissner, P., Verjat, T., Ferlenghi, I., Bagnoli, F., ... Markovitz, D. M. (2008). Human Endogenous Retrovirus K (HML-2) Elements in the Plasma of People with Lymphoma and Breast Cancer. *Journal of Virology*, 82(19), 9329–9336.
- Costas, J. (2002). Characterization of the intragenomic spread of the human endogenous retrovirus family HERV-W. *Mol. Biol. Evol.* 19, 526 – 533.
- de Parseval, N., Casella, J., Gressin, L. and Heidmann, T. (2001). Characterization of the three HERV-H proviruses with an open envelope reading frame encompassing the immunosuppressive domain and evolutionary history in primates. *Virology* 279, 558–569.
- Deas, J. E., Thompson, J. J. and Fermin, C. D. (1999). Viral induction, transmission and apoptosis among cells infected by a Human Intracisternal A-type retrovirus. *Virus Res*; 61(1): 19–27.
- Denner, J. (2015). Immunosuppressive properties of retroviruses. *European Journal of Immunology*, 46(1), 253–255.
- Dewannieux, M., Harper, F., Richaud, A., Letzelter, C., Ribet, D., Pierron, G. and Heidmann, T. (2006). Identification of an infectious progenitor for the multiple-copy HERV-K human endogenous retroelements. *Genome Res.* 16, 1548–1556.

- Eguchi, K., Origuchi, T., Takashima, H., Iwata, K., Katamine, S. and Nagataki, S. (1996). High seroprevalence of anti-HTLV-I antibody in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*; 39: 463-6.
- Ejtehadi, H. D., Freimanis, G. L. and Ali, H. A. (2006). The potential role of human endogenous retrovirus K10 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: a preliminary study. *Ann Rheum Dis*; 65: 612-6.
- Elder, J. T., Bruce, A. T. and Gudjonsson, J. E. (2010). Molecular dissection of psoriasis: integrating genetics and biology. *J Invest Dermatol*; 130: 1213–26.
- Ellerhorst, J. A., Cooksley, C. D. and Grimm, E. A. (2001). Autoimmunity and hypothyroidism in patients with uveal melanoma. *Melanoma Res*; 11(6): 633-7.
- Ely, J. W. and Seabury-Stone, M. (2010). The generalized rash: part II. Diagnostic approach. *Am Fam Physician*. Mar 15;81(6):735-9.
- Esnault, C., Heidmann, O., Delebecque, F., Dewannieux, M., Ribet, D., Hance, A.J., Heidmann, T. and Schwartz, O. (2005). APOBEC3G cytidine deaminase inhibits retrotransposition of endogenous retroviruses. *Nature* 433, 430–433.
- Farber, E. M. and Nall, M. L. (1974). The natural history of psoriasis in 5,600 patients. *Dermatologica*; 148: 1–18.
- Florl, A. R., Löwer, R., Schmitz-Dräger, B. J. and Schulz, W. A. (1999). DNA methylation and expression of LINE-1 and HERV-K provirus sequences in urothelial and renal cell carcinomas. *Br J Cancer*. Jul;80(9):1312-21.
- Frank, O., Giehl, M., Zheng, C., Hehlmann, R., Leib-Mosch, C., and Seifarth, W. (2005). Human Endogenous Retrovirus Expression Profiles in Samples from Brains of Patients with Schizophrenia and Bipolar Disorders. *Journal of Virology*, 79(17), 10890–10901.
- Freimanis, G., Hooley, P., Ejtehadi, H. D., Ali, H. A., Veitch, A. and Rylance, P. B. (2010). A role for human endogenous retrovirus-K (HML-2) in rheumatoid arthritis: investigating mechanisms of pathogenesis. *Clinical & Experimental Immunology*, 160(3), 340–347.
- Fry, L. and Baker, B. S. (2007). Triggering psoriasis: the role of infections and medications. *Clin Dermatol*; 25: 606–15.
- Fujiwara, T. and Mizuuchi, K. (1988). Retroviral DNA integration: structure of an integration intermediate. *Cell*. 1988 Aug 12;54(4):497–504.
- Fäh, J., Pavlovic, J. and Burg, G. (1995). Expression of MxA protein in inflammatory dermatoses. *J Histochem Cytochem*. Jan;43(1):47–52.
- Gottlieb, A. B., Chamian, F., Masud, S., Cardinale, I., Abello, M. V., Lowes, M. A., Chen, F., Magliocco, M. and Krueger, J. G. (2005). TNF inhibition rapidly down-regulates multiple proinflammatory pathways in psoriasis plaques. *J Immunol*. Aug 15;175(4):2721-9.

- Greenwood, A. D., Stengel, A., Erfle, V., Seifarth, W. and Leib-Mösch, C. (2005). The distribution of pol containing human endogenous retroviruses in non-human primates. *Virology*, 334(2), 203–213.
- Grice, K., Sattar, H., Baker, H. and Sharratt, M. (1975). The relationship of transepidermal water loss to skin temperature in psoriasis and eczema. *J Invest Dermatol.* May; 64(5):313-5.
- Gupta, R., Michaud, H.-A., Zeng, X., Debbaneh, M., Arron, S. T., Jones, R. B., ... Liao, W. (2014). Diminished humoral responses against and reduced gene expression levels of human endogenous retrovirus-K (HERV-K) in psoriasis, 1–8.
- Haase, K. (2015). Differential expression analysis of human endogenous retroviruses based on ENCODE RNA-seq data. *BMC Medical Genomics*, 1–12.
- Hägg, D., Eriksson, M., Sundström, A. and Schmitt-Egenolf, M. (2013). The Higher Proportion of Men with Psoriasis Treated with Biologics May Be Explained by More Severe Disease in Men. *PLoS ONE*, 8(5), e63619–6.
- Hahn, S., Ugurel, S., Hanschmann, K.-M., Strobel, H., Tondera, C. and Schadendorf, D. (2008). Serological Response to Human Endogenous Retrovirus K in Melanoma Patients Correlates with Survival Probability. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 24(5), 717–723.
- Haider, A. S., Lowes, M. A. and Suárez-Fariñas, M. (2008). Cellular genomic maps help dissect pathology in human skin disease. *J Invest Dermatol*; 128: 606–15.
- Harley, J. B. and James, J. A. (2006). Epstein-Barr virus infection induces lupus autoimmunity. *Bull NYU Hosp Jt Dis*; 64(1-2): 45–50.
- Henseler, T. and Christophers, E. (1985). Psoriasis of early and late onset: characterization of two types of psoriasis vulgaris. *J Am Acad Dermatol*; 13: 450–56.
- Herrera, R. J., Garcia-Bertrand, R., Salzano, F. M. (2016). *Genomes, Evolution, and Culture: Past, Present, and Future of Humankind*. Wiley-Blackwell ISBN: 978-1-118-87640-4264
- Herve, C. A., Lugli, E. B., Brand, A., Griffiths, D. J. and Venables P. J. (2002). Autoantibodies to human endogenous retrovirus-K are frequently detected in health and disease and react with multiple epitopes. *Clin Exp Immunol*; 128: 75–82.
- Heyn, H., Moran, S. and Esteller, M. (2013). Aberrant DNA methylation profiles in the premature aging disorders Hutchinson-Gilford Progeria and Werner syndrome. *Epigenetics*. Jan;8(1):28–33.
- Ioannidis, J. P. A. (2005). Why Most Published Research Findings Are False. *PLoS Medicine*, 2(8), e124–6.
- Jern, P. and Coffin, J. M. (2008). Effects of Retroviruses on Host Genome Function. *Annual Review of Genetics*, 42(1), 709–732.
- Jern, P., Sperber, G. O. and Blomberg, J. (2004). Definition and variation of human endogenous retrovirus H. *Virology*, 327(1), 93–110.

- Johnson W. E, Coffin J. M. (1999). Constructing primate phylogenies from ancient retrovirus sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Aug 31;96(18):10254-60.
- Johnston, J. B., Silva, C., Holden, J., Warren, K. G., Clark, A. W. and Power, C. (2001). Monocyte activation and differentiation augment human endogenous retrovirus expression: implications for inflammatory brain diseases. *Ann Neurol*. Oct;50(4):434-42.
- Kamradt, T. and Mitchison, N. A. (2001). Tolerance and autoimmunity. *N Engl J Med*; 344(9): 655-64.
- Karouzakis, E., Gay, R. E., Michel, B. A., Gay, S. and Neidhart, M. (2009). DNA hypomethylation in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum*; 60: 3613-22.
- Kassiotis, G. (2014). Endogenous retroviruses and the development of cancer. *J Immunol*. Feb 15;192(4):1343-9.
- Katzourakis A, Rambaut A, Pybus OG. (2005). The evolutionary dynamics of endogenous retroviruses. *Trends Microbiol*. 13, 463–468.
- Katzourakis, A., Rambaut, A., & Pybus, O. G. (2005). The evolutionary dynamics of endogenous retroviruses. *Trends in Microbiology*, 13(10), 463–468.
- Kazazian, H. H. Jr. (2000). L1 retrotransposons shape the mammalian genome. *Science*. Aug 18;289(5482):1152-3.
- Keermann, M., Kõks, S., Reimann, E., Prans, E., Abram, K., and Kingo, K. (2015). Transcriptional landscape of psoriasis identifies the involvement of IL36 and IL36RN. *BMC Genomics* 16, 322.
- Kim, H. S., Takenaka, O. and Crow, T. J. (1999). Isolation and phylogeny of endogenous retrovirus sequences belonging to the HERV-W family in primates. *J. Gen. Virol.* 80, 2613–2619.
- Kingo, K., Kõks, S., Nikopensius, T., Silm, H. and Vasar, E. (2004). Polymorphisms in the interleukin-20 gene: relationships to plaque-type psoriasis. *Genes Immun*. 2004 Mar;5(2):117-21.
- Koonin, E. V., Dolja, V. V., and Krupovic, M. (2015). Origins and evolution of viruses of eukaryotes: The ultimate modularity. *Virology*, 479-480(C), 2–25.
- Krieg, A. M., Gourley, M. F., Perl, A. (1992). Endogenous retroviruses: potential etiologic agents in autoimmunity. *FASEB J*; 6: 2537-44.
- Krieg, A. M. and Steinberg, A. D. (1990). Retroviruses and autoimmunity. *J Autoimmun*; 3: 137-66.
- Krueger. J. G. (2002). The immunologic basis for the treatment of psoriasis with new biologic agents. *J Am Acad Dermatol*. Jan; 46(1):1-23.
- Kudaka, W., Oda, T., Jinno, Y., Yoshimi, N. and Aoki, Y. (2008). Cellular localization of placenta-specific human endogenous retrovirus (HERV) transcripts and their possible implication in pregnancy-induced hypertension. *Placenta*. Mar;29(3):282-9.

- Kulka, M., Calvo, M. S., Ngo, D. T., Wales, S. Q. and Goswami, B. B. (2009). Activation of the 2-5OAS/RNase L pathway in CVB1 or HAV/18f infected FRhK-4 cells does not require induction of OAS1 or OAS2 expression. *Virology*. 388(1):169–84.
- Lahouassa, H., Daddacha, W., Hofmann, ... Margottin-Goguet, F. (2012). SAMHD1 restricts HIV-1 by reducing the intracellular pool of deoxynucleotide triphosphates. *Nat. Immunol.* 13, 223–228.
- Lai, O. Y., Chen, H., Michaud, H.-A., Hayashi, G., Kuebler, P. J., Hultman, G. K., ... Liao, W. (2012). Protective Effect of Human Endogenous Retrovirus K dUTPase Variants on Psoriasis Susceptibility. *The Journal of Investigative Dermatology*, 132(7), 1833–1840.
- Langley, R. G., Elewski, B. E., Lebwohl, M. (2014). Secukinumab in plaque psoriasis—results of two phase 3 trials. *N Engl J Med*; 24: 371: 326–38.
- Larsson, E., Kato, N., and Cohen, M. (1989). Human endogenous proviruses, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 148:115
- Laska, M. J., Brudek, T., Nissen, K. K., Christensen, T., Moller-Larsen, A., Petersen, T., and Nexø, B. A. (2012). Expression of HERV-Fc1, a Human Endogenous Retrovirus, is Increased in Patients with Active Multiple Sclerosis. *Journal of Virology*, 86(7), 3713–3722.
- Laska, M. J., Nissen, K. K., and Nexø, B. A. (2013). (Some) Cellular Mechanisms Influencing the Transcription of Human Endogenous Retrovirus, HERV-Fc1. *PLoS ONE*, 8(1), e53895–12.
- Lebwohl, M. (2003). Psoriasis. *The Lancet*. Volume 361, No. 9364, 1197–1204.
- Leib-Mösch, C., Haltmeier, M., Werner, T., Geigl, E. M., Brack-Werner, R., Francke, U., Erfle, V., Hehlmann, R. (1993). Genomic distribution and transcription of solitary HERV-K LTRs. *Genomics*. 1993 Nov;18(2):261-9.
- Liu, Y., Helms, C., Liao, W., ... Bowcock, A. M. (2008). A genome-wide association study of psoriasis and psoriatic arthritis identifies new disease loci. *PLoS Genet*. Mar 28;4(3):e1000041.
- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, 25(4), 402–408.
- Lønning, A. S., Skov, L., Skytthe, A., Kyvik, K. O., Pedersen, O. B. and Thomsen, S. F. (2013). Heritability of psoriasis in a large twin sample. *British Journal of Dermatology*, 169(2), 412–416.
- Louthrenoo, W. (2008). Rheumatic manifestations of human immunodeficiency virus infection. *Curr Opin Rheumatol*; 20: 92-9.
- Lunardi, C., Tinazzi, E., Bason, C., Dolcino, M., Corrocher, R. and Puccetti, A. (2008). Human parvovirus B19 infection and autoimmunity. *Autoimmun Rev*; 8: 116-20.
- Löwer, R., Löwer, J., Kurth, R. (1996). The viruses in all of us: characteristics and biological significance of human endogenous retrovirus sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, pp. 5177–5184

- Mager, D. L. and Freeman, J. D. (1995). HERV-H endogenous retroviruses: presence in the New World branch but amplification in the Old World primate lineage. *Virology* 213, 395–404.
- Magiorkinis, G., Belshaw, R., and Katzourakis, A. (2013). “There and back again”: revisiting the pathophysiological roles of human endogenous retroviruses in the post-genomic era. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 368(1626), 20120504–20120504.
- Martin, M. A., Bryan, T., Rasheed, S. and Khan, A. S. (1981). Identification and cloning of endogenous retroviral sequences present in human DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Aug; 78(8): 4892–4896.
- Mayer, J., Blomberg, J. and Seal, R. L. (2011). A revised nomenclature for transcribed human endogenous retroviral loci. *Mob DNA*. May 4;2(1):7.
- Medstrand, P. and Mager, D. L. (1998). Human-specific integrations of the HERV-K endogenous retrovirus family. *J Virol*. Dec ;72(12):9782-7.
- Menendez, L., Benigno, B. B., McDonald, J. F. (2004). L1 and HERV-W retrotransposons are hypomethylated in human ovarian carcinomas. *Mol Cancer*. 2004 Apr 26;3:12.
- Mi, S., Lee, X., Li, X., ... McCoy, J. M. (2000). Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. *Nature* 403, 785–789.
- Mills, R. E., Bennett, E. A., Iskow, R. C., and Devine, S. E. (2007). Which transposable elements are active in the human genome? *Trends in Genetics*, 23(4), 183–191.
- Mizugaki, M., Yamaguchi, T., Ishiwata, S., Shindo, H., Hishinuma, T., Nozaki, S., Nose, M. (1997). Alteration of DNA methylation levels in MRL lupus mice. *Clin Exp Immunol*; 110: 265-9.
- Molès, J.-P., Tesniere, A. and Guilhou, J.-J. (2005). A new endogenous retroviral sequence is expressed in skin of patients with psoriasis. *Br J Dermatol*; 153(1): 83-9.
- Molès, J.-P., Griez, A., Guilhou, J.-J., Girard, C., Nagot, N., Van de Perre, P., and Dujols, P. (2017). Cytosolic RNA:DNA Duplexes Generated by Endogenous Reverse Transcriptase Activity as Autonomous Inducers of Skin Inflammation in Psoriasis. *PLOS ONE* 12,e0169879.
- Morandi, E., Tanasescu, R., Tarlinton, R. E., Constantinescu, C. S., Zhang, W., Tench, C., and Gran, B. (2017). The association between human endogenous retroviruses and multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE*, 12(2), e0172415–18.
- Nair, R. P., Stuart, P. E. and Nistor, I. (2006). Sequence and haplotype analysis supports HLA-C as the psoriasis susceptibility 1 gene. *Am J Hum Genet*; 78: 827–51.
- Nakagawa, K., Brusica, V., McColl, G. and Harrison, L. C. (1997). Direct evidence for the expression of multiple endogenous retroviruses in the synovial compartment in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*; 40(4): 627-38.
- Nast, A., Boehncke, W. H., Mrowietz, U., ... Rzany, B. (2012). S3—guidelines on the treatment of psoriasis vulgaris (English version). Update. *J Dtsch Dermatol Ges*; 10 (suppl 2): S1–95.

- Neil, S. J., Zang, T. and Bieniasz, P. D. (2008). Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1. *Vpu. Nature*. Jan 24;451(7177):425-30.
- Nelson, P. N., Carnegie, P. R., Martin, J., Davari Ejtehad, H., Hooley, P., Roden, D., Rowland-Jones, S., Warren, P., Astley, J., and Murray, P. G. (2003). Demystified . . . Human endogenous retroviruses *Mol Pathol*. Feb; 56(1): 11–18.PMCID: PMC1187282
- Nestle, F. O. and Gilliet, M. (2005). Defining upstream elements of psoriasis pathogenesis: an emerging role for interferon alpha. *J Invest Dermatol*. Nov;125(5):xiv-xv.
- Nestle, F. O., Kaplan, D. H. and Barker, J. (2009). MECHANISMS OF DISEASE Psoriasis. *N Engl J Med*; 361:496-509 July 30.
- Nexø, B. A., Christensen, T., Frederiksen, J., Møller-Larsen, A., Oturai, A. B. and Villesen, P. (2011). The Etiology of Multiple Sclerosis: Genetic Evidence for the Involvement of the Human Endogenous Retrovirus HERV-Fc1. *PLoS ONE*, 6(2), e16652–5.
- Nogueira, M. A., Gavioli, C. F., Pereira, N. Z., de Carvalho, G. C., Domingues, R., Aoki, V. and Sato, M. N. (2015). Human endogenous retrovirus expression is inversely related with the up-regulation of interferon-inducible genes in the skin of patients with lichen planus. *Arch Dermatol Res*. Apr;307(3):259-64.
- Ogasawara, H., Hishikawa, T., Sekigawa, I., Hashimoto, H., Yamamoto, N. and Maruyama, N. (2000). Sequence analysis of human endogenous retrovirus clone 4-1 in systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity*; 33: 15-21.
- Ogasawara, H., Okada, M., Kaneko, H., Hishikawa, T., Sekigawa, I. and Hashimoto H. (2003). Possible role of DNA hypomethylation in the induction of SLE: relationship to the transcription of human endogenous retroviruses. *Clin Exp Rheumatol*. Nov-Dec;21(6):733-8.
- Oldstone, M. B. (2006). Viral persistence: parameters, mechanisms and future predictions. *Virology*. Jan 5;344(1):111-8.
- Pastore, S., Mascia, F., Mariani, V. and Girolomoni, G. (2008). The epidermal growth factor receptor system in skin repair and inflammation. *J Invest Dermatol*. Jun;128(6):1365-74.
- Patzke, S., Lindeskog, M., Munthe, E. and Aasheim, H.-C. (2002). Characterization of a Novel Human Endogenous Retrovirus, HERV-H/F, Expressed in Human Leukemia Cell Lines. *Virology*, 303(1), 164–173.
- Pavlicek, A., Paces, J., Elleder, D. and Hejnar, J. (2002). Processed pseudogenes of human endogenous retroviruses generated by LINES: their integration, stability, and distribution. *Genome Res*. 12, 391–399.
- Paz, M. F., Fraga, M. F., Avila, S., Guo, M., Pollan, M., Herman, J. G. and Esteller, M. (2003). A systematic profile of DNA methylation in human cancer cell lines. *Cancer Res*. Mar 1;63(5):1114-21.
- Perl, A. (1999). Mechanisms of viral pathogenesis in rheumatic disease. *Ann Rheum Dis*; 58: 454-61.

- Poiesz, B. J., Poiesz, M. J. and Choi, D. (2003). The human T-cell lymphoma/leukemia viruses. *Cancer Invest*; 21: 253-77.
- Pullmann, R. Jr., Bonilla, E., Phillips, P. E., Middleton, F. A. and Perl, A. (2008). Haplotypes of the HRES-1 endogenous retrovirus are associated with development and disease manifestations of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*; 58: 532-40.
- QIAGEN GmbH. (2011). QIAGEN Sample and Assay Technologies, 1–32.
- Raposo, R. A., Gupta, R., Abdel-Mohsen, M., ... Liao, W. (2015). Antiviral gene expression in psoriasis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 29(10), 1951–1957.
- Rashedi, I., Panigrahi, S. and Ezzati, P. (2007). Autoimmunity and apoptosis – therapeutic implications. *Curr Med Chem*; 14: 3139-51.
- Raychaudhuri, S. P. and Farber, E. M. (2001). The prevalence of psoriasis in the world. *J Eur Acad Dermatol Venereol*; 15:16–17.
- Reiss, D., Zhang, Y., and Mager, D. L. (2007). Widely variable endogenous retroviral methylation levels in human placenta. *Nucleic Acids Research*, 35(14), 4743–4754.
- Roberts, J. D., Bebenek, K. and Kunkel, T. A. (1988) The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. *Science*. Nov 25;242(4882):1171-3.
- Rongioletti, F., Fiorucci, C. and Parodi, A. (2009). Psoriasis induced or aggravated by drugs. *J Rheumatol Suppl*, 83:59–61.
- Rucheton, M., Graafland, H., Fanton, H., Ursule, L., Ferrier, P. and Larsen C. J. (1985). Presence of circulating antibodies against gag-gene MuLV proteins in patients with autoimmune connective tissue disorders. *Virology* 144: 468-480
- Savage, A. L., Wilm, T. P., Khursheed, K., ... Quinn, J. P. (2014). An evaluation of a SVA retrotransposon in the FUS promoter as a transcriptional regulator and its association to ALS. *PLoS One*. Mar 7;9(6):e90833.
- Schmid, P., Itin, P., Cox, D., McMaster, G. K. and Horisberger, M. A. (1994). The type I interferon system is locally activated in psoriatic lesions. *J Interferon Res*. Oct;14(5):229-34.
- Schmitt, J. and Wozel, G. (2005). The psoriasis area and severity index is the adequate criterion to define severity in chronic plaque-type psoriasis. *Dermatology*; 210: 194–99.
- Schön, M. P. and Boehncke, W. H. (2005). Psoriasis. *N Engl J Med*; 352: 1899–912.
- Seifarth, W., Frank, O., Zeilfelder, U., Spiess, B., Greenwood, A. D., Hehlmann, R., and Leib-Mosch, C. (2004). Comprehensive Analysis of Human Endogenous Retrovirus Transcriptional Activity in Human Tissues with a Retrovirus-Specific Microarray. *Journal of Virology*, 79(1), 341–352.

- Singh, M. D., King, V., Baldwin, H., Burden, D., Thorrat, A. and Holmes, S. (2012). Elevated Expression of the Chemokine-Scavenging Receptor D6 Is Associated with Impaired Lesion Development in Psoriasis. *Ajpa*, 181(4), 1158–1164.
- Stocking, C. and Kozak, C. A. (2008). Endogenous retroviruses. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(21), 3383–3398.
- Stoye, J. P. (2001). Endogenous retroviruses: Still active after all these years?, *Current Biology*, 11:R914–R9161–3.
- Subramanian, R. P., Wildschutte, J. H., Russo, C. and Coffin, J. M. (2011). Identification, characterization, and comparative genomic distribution of the HERV-K (HML-2) group of human endogenous retroviruses. *Retrovirology* 8, 90.
- Suntsova, M., Garazha, A., Ivanova, A., Kaminsky, D., Zhavoronkov, A., and Buzdin, A. (2015). Molecular functions of human endogenous retroviruses in health and disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(19), 3653–3675.
- Sutkowski, N., Conrad, B., Thorley-Lawson, D. A. and Huber, B. T. (2001). Epstein- Barr virus transactivates the human endogenous retrovirus HERVK18 that encodes a superantigen. *Immunity*; 15(4): 579-89.
- Torres, B. A., Kominsky, S., Perrin, G. Q., Hobeika, A. C., Johnson, H. M. (2001). Superantigens: The good, the bad, and the ugly. *Exp Biol Med*; 226: 164-76.
- Trela, M., Nelson, P. N., and Rylance, P. B. (2016). The role of molecular mimicry and other factors in the association of Human Endogenous Retroviruses and autoimmunity. *Apmis*, 124(1-2), 88–104.
- Tsai, T. F., Ho, V., Song, M., Szapary, P., Kato, T., Wasfi, Y., Li, S., Shen, Y. K. and Leonardi, C. (2012). The safety of ustekinumab treatment in patients with moderate-to-severe psoriasis and latent tuberculosis infection. *Br J Dermatol*. Nov;167(5):1145-52.
- Tugnet, N., Rylance, P., Roden, D., Trela, M. and Nelson, P. (2013). Human Endogenous Retroviruses (HERVs) and Autoimmune Rheumatic Disease: Is There a Link? *Open Rheumatol J*. 2013 Mar 22;7:13–21.
- Viswanathan, K., Smith, M. S., Malouli, D., Mansouri, M., Nelson, J. A. and Früh, K. (2011). BST2/Tetherin enhances entry of human cytomegalovirus. *PLoS Pathog*. Nov;7(11):e1002332.
- Weiss, R. A. (2016). Human endogenous retroviruses: friend or foe? *Apmis*, 124(1-2), 4–10.
- Wentzensen, N., Coy, J. F., Knaebel, H.-P., Linnebacher, M., Wilz, B., Gebert, J., and Knebel Doeberitz, von, M. (2007). Expression of an endogenous retroviral sequence from the HERV-H group in gastrointestinal cancers. *International Journal of Cancer*, 121(7), 1417–1423.
- Wildschutte, J. H., Williams, Z. H., Montesion, M., Subramanian, R. P., Kidd, J. M., and Coffin, J. M. (2016). Discovery of unfixed endogenous retrovirus insertions in diverse human populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(16), E2326–E2334.

Wolk, K., Witte, K., Witte, E., ... Sabat, R. (2013). IL-29 Is Produced by TH17 Cells and Mediates the Cutaneous Antiviral Competence in Psoriasis. *Science Translational Medicine*, 5(204), 204ra129–204ra129.

Yohn, C. T., Jiang, Z., McGrath, ... Eichler, E. E (2005). Lineage-Specific Expansions of Retroviral Insertions within the Genomes of African Great Apes but Not Humans and Orangutans. *PLoS Biology*, 3(4), e110–11.

Kasutatud veebiaadressid

Kõikide väljatöötatud veebiaadresside andmeid ning veebitööriistu kasutati ajavahemikul aprill 2017 – august 2017.

<http://www.abcam.com/herv-antibody-ab71115.html>

<http://bioinfo.ut.ee/genometester/>

<http://dfam.org/entry/DF0001065>

<http://dfam.org/entry/DF0000190>

<http://dfam.org/entry/LTR57>

<http://dfam.org/entry/MER21A>

<http://dfam.org/entry/MER20>

<http://www.girinst.org/repbase/>

https://www.niams.nih.gov/health_info/Psoriasis/default.asp#5

<http://primer3.ut.ee>

<http://www.psoriaasikeskus.ee/psoriaas/Psoriaas.htm>

<http://tagc.dk/products-services/custom-oligos/>

<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>

<http://www.thermoscientificbio.com/webtools/tmc/>

<http://www.virology.ws/2011/01/04/retroviral-integration-and-the-xmrv-provirus/>

Lihtlitsents

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Martin Kala (sünnikuupäev: 30.07.1991),

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Inimese endogeensete retroviiruste geeni- ja HERV-W valguekspressiooni analüüs psoriaatilises ja terves nahas“, mille juhendajad on Sulev Kõks ja Margus Pooga,
 - 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 **07.08.2020** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 07.08.2017