

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

MEDITSIINITEADUSTE VALDKOND
BIO- JA SIIRDEMEDITSIINI INSTITUUT
MOLEKULAARPATOLOGIA UURIMISGRUPP

Epigeneetilised muutused monotsüütides seoses süsteemse erütematoosse luupusega

Magistritöö

30 EAP

Katrina Ahun

Juhendajad MSc Liis Haljasmägi
PhD Kai Kisand

TARTU 2022

Epigeneetilised muutused monotsüütides seoses süsteemse erütematoosse luupusega

Epigeneetiliste protsesside uurimine autoimmuunhaigustes on muutumas üha olulisemaks. Süsteemne erütematoosne luupus on autoimmuunhaigus, mille puhul on teada, et immuunrakkudes toimuvad epigeneetilised muutused. Süsteemse erütematoosse luupusega patsientide puhul on täheldatud interferoon alfa taseme tõusu, kusjuures on teada, et interferoon alfa mõjub vererakkudest kõige tugevamini just monotsüütidele. Seetõttu on epigeneetiliste muutuste uurimine monotsüütides selle haiguse puhul väga huvipakkuv. Tulenevalt haiguse heterogeensusest on haiguse uute markerite leidmine kriitilise tähtsusega, et patsientide raviga saaks alustada võimalikult varakult. Käesoleva magistritöö eesmärgiks on selgitada, kas patsientide ning kontrollgrupi monotsüütide vahel esineb epigeneetilisi muutusi. Samuti uurida, kas tervete isikute monotsüütides toimub interferoon alfaga mõjutades sarnaseid muutusi.

Märksõnad: epigeneetika, monotsüüdid, autoimmuunhaigus

CERCS: B500 Immunoloogia, seroloogia, transplantoloogia; B520 Üldpatoloogia, patoloogiline anatoomia

Epigenetic changes in monocytes due to systemic lupus erythematosus

Studying epigenetic changes in autoimmunity is becoming more and more relevant. Systemic lupus erythematosus is an autoimmune disease in which epigenetic changes are known to occur. Elevated levels of interferon alpha have been noted in systemic erythematosus lupus patients, moreover it is known that interferon alpha has the strongest effect on monocytes compared to other blood cells. Therefore, studying epigenetic changes in the monocytes of lupus patients is intriguing. Due to the heterogeneity of the disease, finding new markers for diagnosis is of critical importance, so that patients could start receiving treatment as soon as possible. The goal of this thesis is to study whether epigenetic changes occur between patients and controls. In addition, to find out whether healthy monocytes stimulated with interferon alpha show similarities to the monocytes of SLE patients.

Keywords: epigenetics, monocytes, autoimmune disease

CERCS: B500 Immunology, serology, transplantation; B520 General pathology, pathological anatomy

SISUKORD

SISUKORD	3
KASUTATUD LÜHENDID.....	5
SISSEJUHATUS.....	7
1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	8
1.1 Kaasasündinud immuunsus	8
1.2 Loomuliku immuunsüsteemi rakud	9
1.2.1 Monotsüüdid.....	9
1.3 Epigeneetilised geeniekspressiooni muutused	11
1.3.1 Histonide modifikatsioonid	11
1.3.2 Kromatiini immunopretsipitatsioon ehk ChIP ja ChIP-Seq	14
1.4 Autoimmuunhaigused.....	15
1.4.1 SEL	16
1.4.2 IFN- α ja monotsüütide roll SEL-is	18
2 EKSPERIMENTAALOSA	21
2.1 Töö eesmärgid	21
2.2 Materjal ja meetodika	21
2.2.1 Patsiendid ja kontrollisikud	21
2.2.2 In vitro stimuleeritud monotsüüdid	22
2.2.3 Kromatiini immunopretsipitatsioon ehk ChIP.....	24
2.2.4 Kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon ChIP proovidele	27
2.2.5 ChIP-Seq.....	28
2.3 Tulemused.....	30
2.3.1 ChIP-i katse kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon.....	30
2.3.2 Patsientide monotsüütide H3K27ac seondumiskohtade kattuvus genoomil	31
2.3.3 Seondumiskohtade visualiseerimine referentsgenoomil.....	32
2.3.4 Erinevalt rikastunud regioonid monotsüütides	32
2.4 Arutelu	37
KOKKUVÕTE.....	40
SUMMARY	41
TÄNUSÕNAD	43
KASUTATUD KIRJANDUS.....	44

KASUTATUD VEEBIAADRESSID	53
LISAD	54
LIHTLITSENTS.....	58

KASUTATUD LÜHENDID

AD	autoimmuunhaigus (<i>autoimmune disease</i>)
AP-1	aktivaator proteiin 1 (<i>activator protein 1</i>)
AR	androgeeni retseptor (<i>androgen receptor</i>)
BC	leukotsüütide rikas vereproovi fraktsioon (<i>buffy coat</i>)
ChIP	kromatiini immunopretsipitatsioon (<i>chromatin immunoprecipitation</i>)
ChIP-seq	kromatiin immunopretsipitatsiooni sekveneerimine (<i>chromatin immunoprecipitation sequencing</i>)
DAMP	kahjustusega seotud molekulaarsed mustrid (<i>damage-associated molecular patterns</i>)
DC	dendriitrakud (<i>dendritic cell</i>)
DE	erinevalt rikastunud (<i>differentially enriched</i>)
GAS	gamma-aktiveeritud järjestus (<i>gamma-activated sequence</i>)
GM-CSF	granulotsüüt-makrofaagi kolooniaid stimuleeriv faktor (<i>granulocyte-macrophage colony stimulating factor</i>)
HAT	histoonide atsetüültransferaasid (<i>histone acetyltransferases</i>)
HDAC	histooni deatsetülaasid (<i>histone deacetylases</i>)
HDM	histooni demetülaasid (<i>histone demethylase</i>)
HTM	histooni metüültransferaasid (<i>histone methyltransferases</i>)
IFN	interferoon (<i>interferon</i>)
IFN-I	I tüüpi interferoonid (<i>type I interferons</i>)
IFN-AR	interferoon alfa retseptor (<i>interferon alpha receptor</i>)
IKK	I κ B kinaas (<i>IκB kinase</i>)
IL-1 α	interleukiin-1 α (<i>interleukin 1 alpha</i>)
IL-1 β	interleukiin-1 β (<i>interleukin 1 beta</i>)
IL-6	interleukiin-6 (<i>interleukin 6</i>)
IRF9	interferooni regulaatorfaktor 9 (<i>interferon regulatory factor 9</i>)
ISG	interferoon-stimuleeritud geen (<i>interferon-stimulated gene</i>)
ISGF3	interferooni stimuleeritud geenifaktor 3 (<i>interferon-stimulated gene factor 3</i>)
ISRE	interferooni stimuleeritud vastuselement (<i>interferon-stimulated response element</i>)
JAK1	Janus kinaas 1 (<i>Janus kinase 1</i>)
LPS	lipopolüsahhariid (<i>lipopolysaccharide</i>)
MAPK	mitogeen-aktiveeritud proteiini kinaas (<i>mitogen-activated protein kinase</i>)

moDC	monotsüütidest pärinevad dendriittrakud (<i>monocyte-derived dendritic cells</i>)
NK cell	naturaalne tapjarakk (<i>natural killer cell</i>)
PAMP	patogeenidele omased molekulaarsed struktuurid (<i>pathogen-associated molecular patterns</i>)
PBMC	perifeerse vere mononukleaarsed rakud (<i>peripheral blood mononuclear cell</i>)
PCA	peakomponentanalüüs (<i>principal component analysis</i>)
PRR	kaasasündinud immuunsuse retseptorid (<i>pattern recognition receptors</i>)
qPCR	kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon (<i>quantitative polymerase chain reaction</i>)
RA	reumatoidartriit (<i>rheumatoid arthritis</i>)
SD	standardhälve (<i>standard deviation</i>)
SLE	süsteemne erütematoosne luupus (<i>systemic lupus erythematosus</i>)
STAT	signaali vahendaja ja transkriptsiooni aktivaator (<i>signal transducer and activator of transcription</i>)
TLR	Tolli-laadsed retseptorid (<i>Toll-like receptors</i>)
TNF- α	tuumori nekroosi faktor alfa (<i>tumor necrosis factor alpha</i>)
TSS	transkriptsiooni alguskoht (<i>transcription start site</i>)
Tyk2	türosiini kinaas 2 (<i>tyrosine kinase 2</i>)

SISSEJUHATUS

Epigeneetika kirjeldab nii mitootiliselt kui meiootiliselt päritud geeniekspressiooni muutusi ilma DNA nukleotiidset järjestust muutmata. Mida rohkem arenevad edasi metoodika- ning analüüsivõimalused, seda suuremat potentsiaali omab endas epigeneetiliste muutuste uurimine. Ka autoimmuunhaiguste patogenees ei ole epigeneetilistest mehhanismidest puutumata ning seetõttu on epigeneetika nende kontekstis väga oluline. Autoimmuunhaiguse süsteemse erütematoosse luupuse ehk SEL-i (*systemic lupus erythematosus*, SLE) puhul on teada, et immuunrakkudes leiavad aset epigeneetilised muutused, mis mõjutavad haiguse kulgu. Immuunrakkude puhul on teada nende võime sekreteerida tsütokiine, mis aktiveerivad erinevaid signaaliradu ning kaitsemehhanisme. Küll aga võib üleliigne tsütokiinide tase mõjuda kahjustavalt. SEL patsientide puhul on täheldatud interferoon (*interferon*, IFN) alfa taseme tõusu, kusjuures on teada, et vererakkudest mõjutab IFN- α kõige tugevamini just monotsüüte. Seetõttu on epigeneetiliste muutuste uurimine just monotsüütides äärmiselt huvipakkuv. Epigeneetilisi muutusi on mitut liiki, sealhulgas histoonide modifikatsioonid, mille puhul toimub posttranslatsiooniliselt aminoterminaalses otsas olevate „sabade“ modifitseerimine. Histoonide modifikatsioonid märgistavad nii eu- kui heterokromatiini ning on üks faktoritest, mis määravad DNA ligipääsetavuse. Seetõttu on nende uurimine SEL-i kontekstis oluline nii haiguse paremaks mõistmiseks ja raviks kui ka diagnoosimiseks. Tulenevalt SEL-i heterogeensusest on haiguse uute markerite leidmine kriitilise tähtsusega, et patsientide raviga saaks alustada võimalikult varakult.

Käesoleva magistritöö eesmärgiks on selgitada, kas patsientide ning kontrollgrupi monotsüütide vahel esineb epigeneetilisi muutusi. Samuti uurida, kas tervete monotsüütide stimuleerimisel IFN- α -ga võib näha sarnaseid muutusi.

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

1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Kaasasündinud immuunsus

Inimese immuunsüsteem jagatakse laias laastus kaheks osaks, kaasasündinud ja omandatud immuunsuseks, mis erinevad omavahel paljudes aspektides. Kaasasündinud ehk loomulik ehk mittespetsiifiline immuunsus tagab esmase kaitse infektsioonitekitajate vastu. Omandatud ehk adaptiivne ehk spetsiifiline immuunsus kujuneb välja aeglasemalt ja annab tugevama ning spetsiifilisema kaitse reaktsiooni haigustekitajatele.

Kaasasündinud immuunsust iseloomustab kiire reageerimisvõime, mille puhul toimub immuunrakkude aktiveerimine juba loetud tundide jooksul. Kaasasündinud immuunsüsteemi nimetatakse ka mittespetsiifiliseks immuunsüsteemiks seetõttu, et tema spetsiifilisus mikroobide vastu on madal (Iwasaki ja Medzhitov, 2004). Mittespetsiifilise immuunsüsteemi osad tunnevad ära erinevaid molekulaarseid struktuure, mida nimetatakse patogeenidele omasteks molekulaarseteks struktuurideks (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMP). PAMP-e jagavad erinevad mikroobide klassid, kuid peremeesrakkudel need enamasti puuduvad. Kaasasündinud immuunsüsteemi muudab eriliselt efektiivseks asjaolu, et ta tunneb ära mikroobide eluks vajalikke struktuure. Omandatud immuunsüsteemist eristavad kaasasündinud immuunsüsteemi veel retseptorid. Kui adaptiivse immuunsuse puhul toimub retseptoreid kodeerivates geenides somaatiline rekombinatsioon, siis mittespetsiifilise immuunsüsteemi retseptorid on iduliinis kodeeritud. Seetõttu on kaasasündinud immuunsuse mitmekesisus palju madalam kui omandatud immuunsuse puhul (Medzhitov ja Janeway, 1997). Väga pikka aega oli üldine konsensus, et kaasasündinud immuunsus immunoloogilist mälu ei oma. Nagu ütleb nimi, siis adaptiivne immuunsüsteem mäletab ja kohaneb infektsioonitekitajaga kokkupuutel, mille tulemusel järgmine vastus haigustekitajale on tugevam ning kiirem kui esmane vastus (Bonilla ja Oettgen, 2010). Arvati, et kaasasündinud immuunsus seda võimet ei oma, mis tähendab, et korduv infektsioonitekitajaga nakatumine ei muuda loomuliku immuunsuse vastust. Samas on viimastel aastatel esile kerkinud mõiste „treenitud immuunsus“, mis postuleerib, et ka kaasasündinud immuunsusel on võime oma vastust teistkordsel kokkupuutel muuta (Netea et al., 2011). Erinevalt adaptiivsest immuunsüsteemist toimib see aga läbi epigeneetilise ja metaboolse reprogrammeerimise, mitte geenirekombinatsiooni tõttu (Saeed et al., 2014).

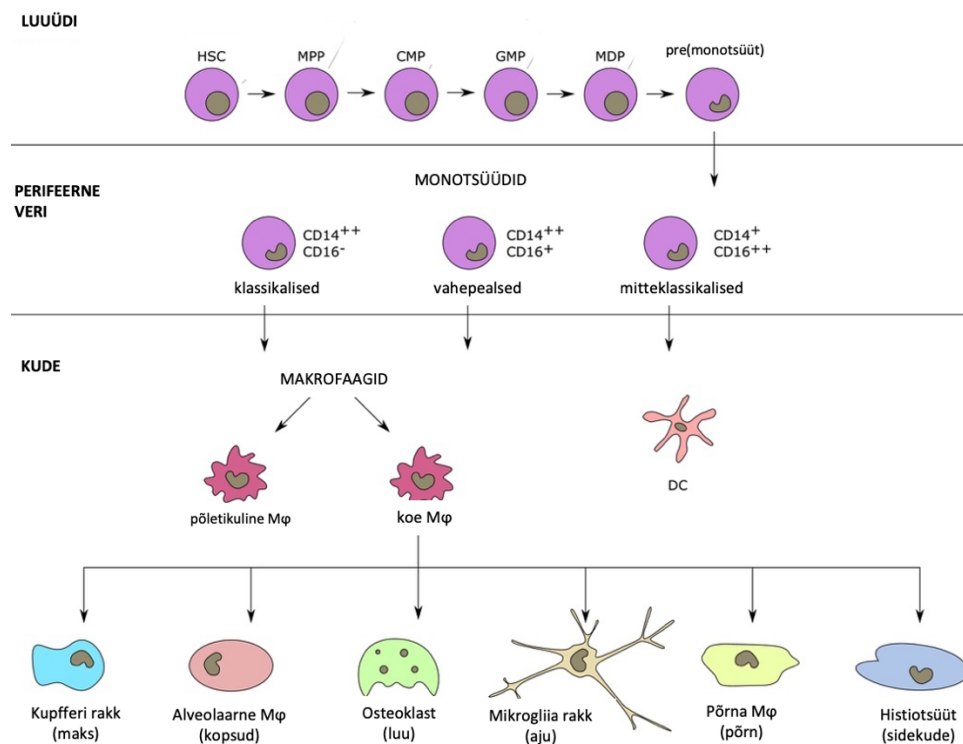
1.2 Loomuliku immuunsüsteemi rakud

Loomuliku immuunsüsteemi koosseisu kuuluvad mitmed rakud. Nendeks on fagotsüüdid ehk õgirakud, mille alla kuuluvad monotsüüdid, makrofaagid, neutrofiilid ja dendriittrakud, samuti nuumrakud, eosinofiilid, naturaalsed tapjarakud ehk NK-rakud (*natural killer cell*, NK cell) ja basofiilid (Sun et al., 2014). Fagotsüütide eripära seisneb selles, et infektsioonikoldesse jõudes nad tunnevad ära ning fagotsüteerivad mikroobid, hävitades need rakusisese lagundamise teel (Levin et al., 2016). Neutrofiilid on kõige arvukamad leukotsüüdid ning esimesed rakud, mis infektsioonikoldesse liiguvad. Neutrofiilid õgivad mikroobe nii infektsioonikoldes kui ka vereringes, infektsioonikoldes aga nad mõne tunni jooksul surevad. Neutrofiilide düsregulatsioon on seotud ägedatest infektsioonidest ja sepsisest paranemise aeglustumisega (Hampson et al., 2017). Monotsüüdid jäävad oma arvukuselt küll neutrofiilidele alla, kuid need rakud on palju mitmekülgsemad. Monotsüütidest tuleb pikemalt juttu järgmises peatükis. Dendriittrakud (*dendritic cell*, DC) on antigeeni esitavad rakud T-lümfotsüütidele, mis indutseerivad adaptiivse immuunsuse mehhanisme haigustekitajatele (Guilliams et al., 2016). Nuumrakud on luuüdist pärinevad rakud, mis on enim tuntud nende seose tõttu allergia ja anafülaktilise šokiga (Galli ja Tsai, 2012). Küll aga on nuumrakkudel ka väga oluline organismi kaitsev roll. Nuumrakud osalevad näiteks haavade parandamisel, angiogeneesis ning samuti parasiitinfektsioonidega võitlemisel (Mukai et al., 2016). Eosinofiilid on samuti luuüdi päritolu rakud ning nagu nuumrakud, mängivad ka nemad suurt rolli nii allergilistes reaktsioonides kui ka parasiitinfektsioonidega võitlemisel (Shamri et al., 2011). Basofiilid moodustavad lümfotsüütidest kõige väiksema osa ning on olulised vere hüübimise regulatsioonis ning põletikulises vastuses (Spiering, 2015). NK-rakud on granulaarsed lümfotsüüdid, mis moodustavad tervel inimesel 5-20% perifeersetest mononukleaarsetest rakkudest (Bonanni et al., 2019). NK-rakud tunnevad ära viirustega nakatunud rakke, kuid ka näiteks kasvajakasv. Nad vabastavad oma graanulitest tsütotoksilisi valke, mis hävitavad nakatunud rakud (Topham ja Hewitt, 2009).

1.2.1 Monotsüüdid

Monotsüüdid on luuüdi-päritolu rakud ning pärast luuüdist lahkumist tsirkuleerivad veres keskmiselt 1-3 päeva. Klassikalised monotsüüdid ($CD14^{++} CD16^{-}$) moodustavad kogu populatsioonist umbes 85%, ülejäänud 15% koosneb vahepealsetest ($CD14^{++} CD16^{+}$) ja mitteklassikalistest ($CD14^{+} CD16^{++}$) rakkudest (Wong et al., 2011). Verest lahkumise järel liiguvad

monotsüüdid kudedesse, kus nad diferentseeruvad makrofaagideks ja dendriitrakkudeks (Huen ja Cantley, 2017). Monotsüütide areng on välja toodud joonisel 1.



Joonis 1. Monotsüütide areng ja jagunemine. Skeem näitab monopoese müeloidseid tasemeid ja makrofaagide heterogeensust rakkudes. CMP, ühine müeloidne prekursor; DC, dendriitrakk; GMP, granülotsüüt-makrofaag prekursor; HSC, hematopoeetiline tüvirakk; MDP, monotsüüt-makrofaag/dendriitraku prekursor; MPP, multipotentne prekursor; M ϕ , makrofaag (modifitseeritud Ożańska et al., 2020).

Kuigi monotsüüdid on eelkõige tuntud õgirakkudena, siis on nad ka olulised antigeeni esitlevad rakud ning lisaks toodavad mitmeid erinevaid tsütokiine (Gordon, 2002). Monotsüütidel on Tolli-laadsed retseptorid (*Toll-like receptors*, TLR), mis on võimelised ära tundma patogeene pinnaststruktuure ning aktiveerima immuunvastuse (Medzhitov, 2007). Tolli-laadseid retseptoreid leidub nii monotsüütide pinnal kui ka näiteks endosoomides. On olemas mitmeid erinevaid TLR-e, mis reageerivad erinevatele patogeene rühmadele ehk tunnevad ära erinevaid PAMP-e. Samuti tunnevad TLR-id ära ka kahjustusega seotud molekulaarseid mustreid (*damage-associated molecular patterns*, DAMPs) ehk TLR-id reageerivad nii patogeensetele ligandidele kui ka koekahjustustele (Kawasaki ja Kawai, 2014). Monotsüüdid ekspresseerivad enim TLR1, TLR2 ja TLR4. TLR1 on spetsiifiline gram-positiivsetele bakteritele. TLR2 tunneb ära mitmeid bakteriaalseid lipoglükaane, samuti on TLR2 oluline põletikumediaatorite tootmise aktiveerija (Jiménez-Dalmaroni et al., 2015). TLR4 on võimeline ära tundma bakteriaalset lipopolüsahhariidi (*lipopolysaccharide*, LPS), mida leidub gram-

negatiivsetel bakteritel (Nagai et al., 2002). Pärast PAMP-ide TLR retseptorile seandumist, käivitub signaaliraja kaskaad, mis viib antigeene esitavate rakkude küpsemisele ja põletikumediaatorite produktsioonile.

Monotsüüdid toodavad põhiliselt pro-inflammatoorseid tsütokiine nagu interleukiin-1 α (*interleukin 1 alpha*, IL-1 α), interleukiin-1 β (*interleukin 1 beta*, IL-1 β), interleukiin-6 (*interleukin 6*, IL-6) ning ka tuumori nekroosi faktor alfa (*tumor necrosis factor alpha*, TNF- α). Samuti aktiveerivad nad I tüüpi interferoonide rada (Zanoni et al., 2011). Lisaks toodavad monotsüüdid ka põletikuvastase toimega IL-1 retseptori antagonisti. Võrreldes neutrofiilide, nuumrakkude või eosinofiilidega, ei ole monotsüüdid nii tuntud oma seoste tõttu haiguste või allergiliste reaktsioonidega. Sellegipoolest on täheldatud monotsüütide rolli mitmete autoimmuunsete ja põletikuliste haiguste korral. On näidatud, et monotsüütidel on seos selliste autoimmuunhaigustega nagu süsteemne erütematoosne luupus ja reumatoidartriit (*rheumatoid arthritis*, RA), kuid täpsed mehhanismid on siiani ebaselged (Han et al., 2020; Liu et al., 2018).

1.3 Epigeneetilised geeniekspressiooni muutused

Kui geneetika hõlmab endas geenide funktsiooni ning nukleotiidsete järjestuste uurimist, siis epigeneetika kirjeldab nii mitootiliselt kui meiootiliselt päritud geeniekspressiooni muutusi ja modifikatsioone, säilitades DNA nukleotiidse järjestuse (Wu ja Morris, 2001). Epigeneetiliste protsesside alla kuuluvad näiteks kovalentsed modifikatsioonid nagu DNA metülatsoon, histoonide modifikatsioonid, erinevad mittekodeerivad RNA-d, nukleosoomi positsioneerimine ning DNA-ga seonduvad transkriptsioonifaktorid (Deng et al., 2001; Goodrich ja Kugel, 2006; Strahl ja Allis, 2000; Struhl ja Segal, 2013)

1.3.1 Histoonide modifikatsioonid

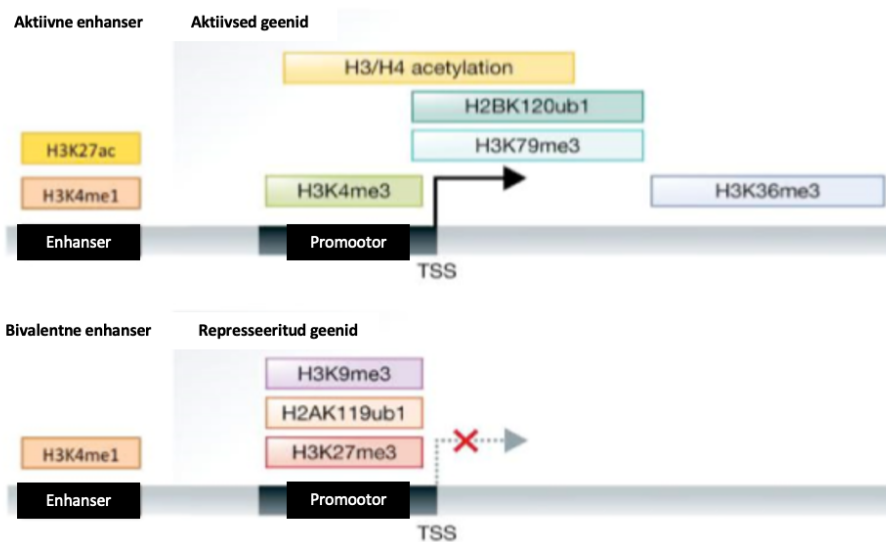
Inimese genoom on peaaegu kaks meetrit pikk, kuid peab ära mahtuma 10 μ m suurusesse tuuma. Selleks, et seda võimaldada, pakitakse DNA kokku (Richmond ja Davey, 2003). Selles mängivad olulist rolli histoonid, mis on 102-135 aminohappest, põhiliselt arginiinist ja lüsiinist, koosnevad valgud. On teada viit tüüpi histoone: H2A, H2B, H3, H4 ning H1. Nendest esimesed neli on nukleosoomsed histoonid ning moodustavad kahes korduses histooni oktameeri (Luger et al., 1997). Ühe histooni oktameeri ümber pakitakse 147 bp DNA-d ning tekkivat kompleksi nimetatakse nukleosoomiks (Richmond ja Davey, 2003). H1 on aga linkerhistoon, mis liitub

nukleosoomiga, moodustades kromatsoomi. Kromatsoome ühendab omavahel *linker* DNA, moodustades kromatiini nn „pärlikee“ struktuuri. Tihedalt kokku pakitud kromatiini nimetatakse heterokromatiiniks ning vabamalt pakitud eukromatiiniks. Üldiselt on aktiivsed geenid vähem kokku pakitud ning inaktiivsed geenid väga tihedalt kokku pakitud (Bednar et al., 2017). Seetõttu on histoonid geeni ekspressiooni regulatsioonis väga olulisel kohal.

Histoonide N- ehk aminoterminaaalses osas on „sabad“, mis on mobiilsed ning mida saab posttranslatsiooniliselt modifitseerida (Kouzarides, 2007). Histoonide modifikatsioone on erinevaid, millest tuntuimad on fosforülatsioon, metülatsioon, atsetülatsioon ja ubikvitineerimine (Alhamwe et al., 2018). Levinumad modifikatsioonid on lüsiinide atsetüleerimine ja metüleerimine, arginiinide metüleerimine ning seriinide/treoniinide fosforüleerimine (Alhamwe et al., 2018). Tuntuimad histoonide modifikatsioonid on toodud tabelis 1. Histooni kood on hüpotees, mis ütleb, et DNA transkriptsioon on suuresti reguleeritud histoonide posttranslatsioonilistest modifikatsioonidest. Histooni kood on oluliselt komplekssem kui geneetiline kood (Strahl ja Allis, 2000). Näiteks võib metülatsioon toimuda nii mono-, di- kui trimetüleerimisena ning erinevates aminohapetes erinevates histoonides. Histoonide modifikatsioonid on seotud nii transkriptsiooni kui ka kromatiini pakkimise, parandamise ning replikatsiooniga (Kouzarides, 2007). Histoonide modifikatsioonide paiknemine genoomis on toodud joonisel 2.

Tabel 1. Tuntuimad histoonide modifikatsioonid

Modifikatsioon	Funktsioon	Modifikatsiooni asukoht
Atsetüleerimine	Aktivatsioon	H3K9ac, H3K27ac (Creyghton et al., 2010; Grant et al., 1999)
Metüleerimine	Aktivatsioon	H3K4me1, H3K4me3 (Nishioka et al., 2002; Santos-Rosa et al., 2002)
Metüleerimine	Repressioon	H3K9me3, H3K27me3 (Petracovici ja Bonasio, 2021; Wang et al., 2004)
Fosforüleerimine	Aktivatsioon	H3S10ph (Clayton et al., 2000)



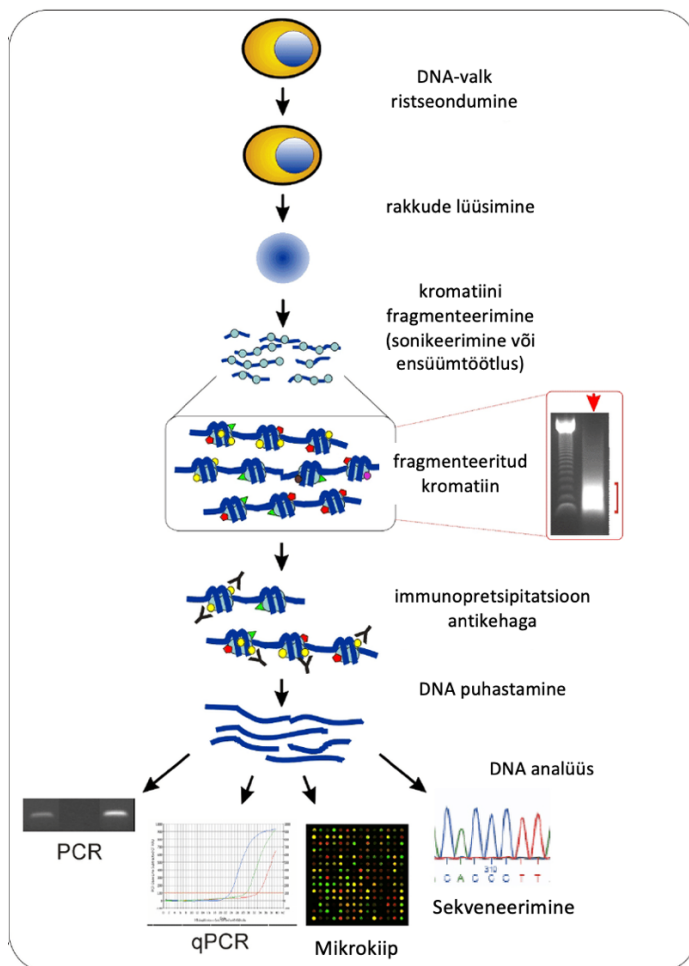
Joonis 2. Tuntuimate histooni modifikatsioonide paiknemine. Geeni aktivatsioon: H3K27ac ja H3K4me1 on seotud aktiivsete enhanseritega, H3K4me3 paikneb promootoralal ning H3/H4 atsetülatsioon, H2BK120ub1, H3K79me3 ning H3K36me3 transkriptsiooni alguspunkti läheduses. Geeni repressioon: H3K4me1 paikneb bivalentsel enhanseralal ning H3K9me3, H2AK119ub1, H3K27me3 paiknevad promootoralal, kuid represserivad transkriptsiooni (modifitseeritud Zhang, et al., 2015).

Atsetüleerimist viivad läbi histoonide atsetüültransferaasid (*histone acetyltransferases*, HAT), mille tulemusena eemaldatakse lüsiinijäägilt positiivne laeng ning histoonide ja DNA vahelised interaktsioonid nõrgenevad (Daskalaki et al., 2018). Lisaks atsetüültransferaasidele on vastupidise funktsiooniga histooni deatsetülaasid (*histone deacetylases*, HDAC). HDAC-id toimivad geeniekspressiooni repressoritena, eemaldades atsetüülrühma histoonide lüsiinijääkidelt (Daskalaki et al., 2018). Histooni metüleerimist viivad läbi histooni metüültransferaasid (*histone methyltransferase*, HMT), mis on võimelised lisama S-adenosüülilil saadud metüülrühma sihtmärk-histooni sabale (Barski et al., 2007). Vastupidise protsessi eest vastutavad histooni demetülaasid (*histone demethylase*, HDM), mis eemaldavad erinevaid metüülrühmi lüsiinidelt või arginiinidelt (Dimitrova et al., 2015). Histoonide fosforüleerimise eest vastutavad kahte tüüpi ensüümid: kinaasid ja fosfataasid. Kinaaside ülesandeks on ATP fosfaatrühma transport ja nad asendavad märklaud-aminohappe küljes oleva hüdroksüülrühma fosfaatrühmaga. Nagu atsetüleerimisegi puhul, muutub histooni laeng, sest ATP omab negatiivset laengut (Bannister ja Kouzarides, 2011). Ubikvitinatsioon on kõige vähem levinud histooni modifikatsioon. Lisaks erineb ubikvitinatsioon teistest modifikatsioonidest märgatavalt. Selle modifikatsiooni puhul lisatakse histoonile 76 aminohappe pikkune fragment (Mattioli ja Penengo, 2021). Ubikvitinatsioon on pöörduv modifikatsioon, mis osaleb mitmetes olulistes protsessides nagu DNA parandamine, transkriptsioon jpm (Cao ja Yan, 2012).

Antud töös uuriti kahte erinevat histooni modifikatsiooni: H3K4me3 ja H3K27ac, millest mõlemad on seotud aktiivse geeni transkriptsiooniga ning mille rikastuse muutusi on varasemalt seostatud autoimmuunhaigustega. H3K4me3 on üks olulisimaid ja rohkem uuritud geenitranskriptsiooni reguleerivatest histooni modifikatsioonidest (Santos-Rosa et al., 2002). See modifikatsioon on tugevalt seotud aktiivse geeni transkriptsiooniga ning leidub enamasti transkriptsiooni alguskohtade (*transcription start site*, TSS) ümbruses (Barski et al., 2007). Uuringud on näidanud, et H3K4me3 ja SEL on tugevalt seotud. TSS allavoolu nukleosoom on olulise tähtsusega transkriptsiooni muutuste regulaator SEL korral (Zhang et al., 2016, 2018). H3K27ac on levinud modifikatsioon geenide enhanseralades (Jeng et al., 2019). See modifikatsioon märgib aktiivse geenitranskriptsiooniga seotud enhansereid ning ka promootoreid (Creyghton et al., 2010). Varasemalt on psoriaasi näitel leitud, et H3K27ac muster on patsientidel ja tervetel kontrollidel erinev ning kõige üleekspresseeritumatel geenidel psoriaasis on H3K27ac rikastus (Masalha et al., 2021). Seetõttu on need modifikatsioonid huvipakkuvad kui potentsiaalsed markerid SEL haiguses.

1.3.2 Kromatiini immunopretsipitatsioon ehk ChIP ja ChIP-Seq

Kromatiini immunopretsipitatsioon (*chromatin immunoprecipitation*, ChIP) ehk kromatiini immunosadestamine töötati välja 1985. aastal, et vaadelda valkude seondumist spetsiifilistes genoomi regioonides (Solomon ja Varshavsky, 1985). ChIP-i kasutatakse epigeneetilistes uuringutes, et leida spetsiifilised regioonid genoomis, kuhu histooni modifikatsioonid seonduvad (Spencer et al., 2003). ChIP-i etapid võib lihtsustatult jagada kuueks, mis on välja toodud joonisel 3.



Joonis 3. Kromatiini immunopretsipitatsiooni põhietapid. ChIP analüüs koosneb lihtsustatult kuuest etapist: 1) DNA-alk ristseondumine; 2) rakkude lüüsimine; 3) kromatiini frgmenteeringimine, kasutades sonikeerimist või ensüümtöötlust; 4) immunopretsipitatsioon antikehaga; 5) DNA puhastamine; 6) DNA analüüs kasutades PCR-i, qPCR-i, mikrokiipi või sekveneerimist (modifitseeritud Collas ja Dahl, 2008).

Kromatiini immunopretsipitatsiooni sekveneerimine (*chromatin immunoprecipitation sequencing*, ChIP-seq) on meetodika, kus on omavahel liidetud ChIP ja massiivselt paralleelne DNA sekveneerimine (Furey, 2012). ChIP-seq analüüsis sekveneeritakse huvipakkuvad DNA frgmentid otse, mitte ei kasutata mikrokiibil hübriidatsiooni. ChIP-seq analüüsi eeliseks mikrokiibi ees on kõrgem resolutsioon, vähem artefakte ja suurem katvus (Park, 2009).

1.4 Autoimmuunhaigused

Normaalse ja terve immuunsüsteemi üks erilisemaid omadusi on see, et kuigi see on võimeline ära tundma ja reageerima lugematu arvu mikroobidega, ei reageeri see peremeesorganismi enda antigeenidega. Seda nähtust nimetatakse immuuntolerantsuseks (Smilek et al., 2014).

Autoimmuunhaigusi (*autoimmune disease*, AD) defineeritakse kui immuunsüsteemi reaktsiooni autoantigeenide ehk organismi enda vastu, mille põhjustajaks on nii geneetilised faktorid kui ka keskkonnast tulenevad tegurid (Masters et al., 2009). Vastupidiselt levinud arvamusele, on AD-d üllatavalt levinud mõjutades 3-5 % rahvastikust (Eaton et al., 2007; Jacobson et al., 1997). Eriti on autoimmuunhaiguste suhtes haavatavad vanemaealised, lisaks enamik levinumatest AD-dest mõjutavad naisi kordades suuremal määral kui mehi (Fairweather et al., 2008). Autoimmuunhaigusi iseloomustab enim nende suur heterogeensus ja multifaktoriaalsus, mis muudab nende diagnoosimise ning ravi ebatavaliselt keerukaks (Cho ja Feldman, 2015). Sealjuures ei aita kaasa ka fakt, et sümptomid võivad erinevatel AD-del olla väga sarnased, kuid ravi kardinaalselt erinev (Icen et al., 2009). Seetõttu ongi oluline leida markereid, mille alusel võimalikult vara neid haigusi diagnoosida. Käesolevas töös uuriti süsteemset erütematooset luupust, millest tuleb juttu peatükis 1.4.1.

1.4.1 SEL

Süsteemne erütematoosne luupus on heterogeenne ja multisüsteemne autoimmuunhaigus, mida iseloomustab autoantikehade tootmine (Tsang-A-Sjoe ja Bultink, 2021). SEL väljakujunemine on seotud nii omandatud kui kaasasündinud immuunsuse defektidega, mis on põhjustatud nii geneetiliste, keskkonnast tulenevate kui ka hormonaalsete faktorite poolt (Kaul et al., 2016). Üldiselt iseloomustab SEL haiguse kulgu aktiivsete ja inaktiivsete haigusperioodide vaheldumine, kus inaktiivsetel perioodidel esineb vähem kaebusi (Tselios et al., 2019). Sealjuures aga aktiivset haiguse perioodi võivad iseloomustada tugevalt väljendunud sümptomid nagu palavik, kurnatus ning kaalulangus, pöördumatud organukahjustused ning kõrgeenenud suremus (Fernandez ja Kirou, 2016; Ugarte-Gil et al., 2015).

Oma heterogeensus tõttu on haiguse sümptomeid seinast sein ja need võivad patsientide vahel drastiliselt erineda, mis teeb luupuse diagnoosimise omakorda veelgi keerulisemaks (Maidhof ja Hilar, 2012). Põhilised sümptomid organsüsteemide järgi on välja toodud tabelis 2 (Cojocar et al., 2011). On loodud mitmeid erinevaid parameetreid, millega hinnata haiguse aktiivsust, millest enim kasutatakse SLEDAI skoori. SLEDAI skoor võtab arvesse 24 parameetrit, mis hõlmavad 9 organsüsteemi (Bombardier et al., 1992).

Tabel 2. Põhilised sümptomid süsteemse erütematoosse luupuse puhul.

Organ/-süsteem	Sümptomid
Nahk	„Liblikalööve“ näol, tundlikkus päikesevalgusele, Reynaud sündroom, urtikaaria
Tugi- ja liikumiselundkond	Liigesvalu, artriit
Hingamiselundkond	Valulik hingamine, hingeldamine, pulmonaalne hüpertensioon
Seedeelundkond	Iiveldus, oksendamine, kõhuvalu
Südame-ja veresoonekond	Perikardiit, müokardiit, endokardiit, ateroskleroos, aneemia, leukopeenia, trombotsütopeenia
Närvisüsteem	Peavalu, depressioon, ärevus, krambihood, insult
Erituselundkond	Vähenenud neerufunktsioon, nefriit

Euroopas on SEL-i keskmiseks levimuseks 30 kuni 70 isikut 100000 isiku kohta (Barber et al., 2021). Süsteemse erütematoosse luupuse esinemissagedus naiste hulgas on ligi 5 korda kõrgem kui meeste hulgas (Rees et al., 2016). Samuti avaldub SEL naistel nooremas eas (Arnaud et al., 2014). Haiguse suure varieeruvuse tõttu arvatakse, et selle diagnoosi alla mahub erineva patogeneesiga endotüüpe. Selle kasuks räägib perifeerse vere rakkude geeniekspressiooni analüüs. Nende andmete alusel moodustuvad erinevad molekulaarsed subtüübid (Banchereau et al., 2017; Perez et al., 2022)

SEL-ile endale ravi puudub, küll aga saab ravida erinevaid sümptomeid. Põhilised ravimeetodid on toodud tabelis 3 (Maidhof ja Hilas, 2012). Lisaks on kliiniliste uuringute faasis mitmeid ravimeid, mis blokeerivad I tüüpi interferoonide (*type I interferon*, IFN-I) seondumist retseptorile või vastavat retseptorit (Paredes ja Niewold, 2020). Üldised soovitusel SEL patsientidele on päikesekaitsevahendite kasutamine, tervislik toitumine ja eluviis, keheline

liikumine, suitsetamisest loobumine, immuniseerimine ning kaasuvate haiguste õigeaegne ravi (Maidhof ja Hilas, 2012).

Tabel 3. Põhilised ravimeetodid süsteemse erütematoosse luupuse puhul.

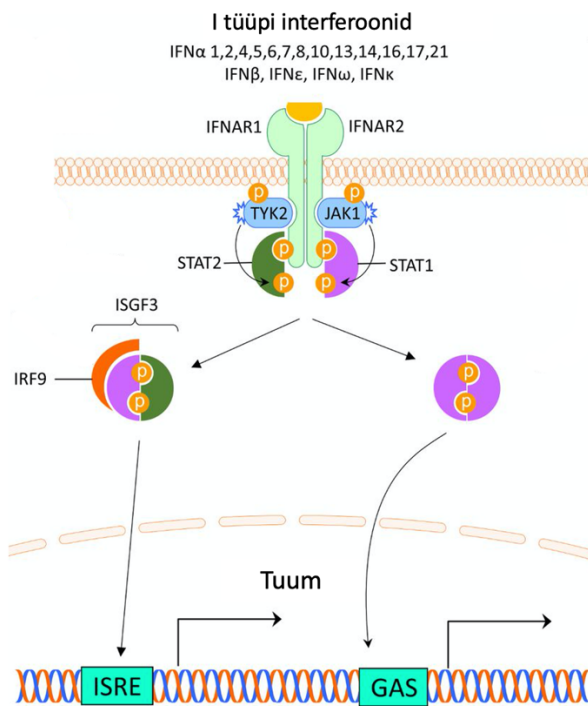
Ravimiklass	Toimemehhanism	Kasutatav(ad) ravim(id)
Mittesteroidsed põletikuvastased ravimid	Prostaglandiini sünteesi inhibitsioon	Erinevad ravimid
Antimalaaria ravimid	Ebaselge; võimalik, et häirivad T-raku aktivatsiooni ja inhibeerivad tsütokiini aktiivsust; intratsellulaarse TLR inhibeerimine	Hüdroklorokviin
Kortikosteroidid	Efekt immuunsüsteemile, näiteks tsütokiinide aktivatsiooni blokeerimine	Prednisoon
Monoklonaalsed antikehad	B-rakkude elimineerimine või elulemuse inhibeerimine; B-rakkude plasmarakkudeks diferentseerumise inhibeerimine	Rituximab Belimumab (Dubey et al., 2011; Thatayatikom ja White, 2006)
Immunosuppressandid	Efekt immuunsüsteemile, näiteks T- ja B-rakkude proliferatsiooni vähendamine	Tsüklofosfamiid (Gladstone et al., 2002)

1.4.2 IFN- α ja monotsüütide roll SEL-is

Interferoonidel on oluline roll SEL-i patogeneesis. Tihtipeale on süsteemse erütematoosse luupuse puhul patsientidel kõrgem IFN-I tase. Seetõttu on patsientidel enamasti kõrge interferoon-stimuleeritud geenide (*interferon-stimulated gene*, ISG) ekspressioon vererakkudes – nn IFN signatuur (Banchereau et al., 2017). IFN-I perekonda kuuluvad IFN- α , - β , - ϵ , - κ , - ω , - δ ja - τ , kusjuures IFN- α jaguneb 13. alatüübiks ning IFN- τ inimesel puudub (Theofilopoulos et al., 2005). *In vitro* on IFN- α võimeline aitama kaasa B-lümfotsüütide ellu

jäämisele, tõstma aktiveeritud B-lümfotsüütide diferentseerumist immunoglobuliini sekreteerivateks plasmarakkudeks ning indutseerima monotsüüte monotsüütidest pärinevateks dendriitrakkudeks (*monocyte-derived dendritic cells*, moDC) (Jego et al., 2003; Joo et al., 2012; Santini et al., 2003). IFN-I sekreteeritakse pärast kaasasündinud immuunsuse retseptorite (*pattern recognition receptors*, PRR) aktivatsiooni immuunrakkudel patogeenide poolt (Medzhitov, 2007). Tolli-laadsetest retseptoritest indutseerivad I tüüpi interferoone tootma TLR3, TLR4, TLR7, TLR8 ja TLR9 (Uematsu ja Akira, 2007) ja tsütoplasmaatilistest retseptoritest RIG perekonna valgud ning cGAS-STING rada (Kopitar-Jerala, 2017). Patogeenidelt pärinevate mustrite ära tundmine on kriitilise tähtsusega, kuid vead protsessis võivad viia peremees-nukleiinhapete äratundmiseni, mis omakorda võib initsieerida autoimmuunsust (Banchereau et al., 2017).

IFN-I seonduvad heterodimeersele interferoon alfa retseptorile (*interferon alpha receptors*, IFN-AR), mis koosneb subühikust 1 ja 2 (Ivashkiv ja Donlin, 2014). Peale IFN-I seondumist retseptorile aktiveeruvad türosiini kinaas 2 (*tyrosine kinase 2*, Tyk2) ja Janus kinaas 1 (*Janus kinase 1*, JAK1), millel on võime fosforüleerida signaali vahendaja ja transkriptsiooniaktivaatori (*signal transducer and activator of transcription*, STAT) valke (Platanias, 2005). STAT perekond moodustub kuuest valgust STAT1-6, millest IFN-I aktiveerib enim STAT1, STAT2 ja STAT3, mis moodustavad omavahel erinevaid dimeere (Lukhele et al., 2019). STAT1/STAT2 heterodimeeri fosforüleerumisel seondub nendega interferooni regulaatorfaktor 9 (*interferon regulatory factor 9*, IRF9). Moodustuvat kompleksi nimetatakse interferooni stimuleeritud geenifaktor 3 (*interferon-stimulated gene factor 3*, ISGF3) (Stark ja Darnell, 2012). See omakorda seondub interferooni stimuleeritud vastuselemendile (*interferon-stimulated response element*, ISRE), mille tagajärjel aktiveeritakse antiviraalsed geenid (Lukhele et al., 2019). STAT1 ja STAT3 homodimeerid seonduvad aga gamma-aktiveeritud järjestusele (*gamma-activated sequence*, GAS), mis indutseerib erinevaid põletikuvastuses osalevaid märklaugeene (Ivashkiv ja Donlin, 2014) (joonis 4). Kõrge interferooni taseme tagajärjel tekib ISG signatuur, mis tähendab, et ISG-d on kõrgelt ekspresseeritud (Kyogoku et al., 2013).



Joonis 4. IFN-I signaalirada. IFN-I seondumisel retseptorile aktiveeruvad Tyk2 ja Jak1, mis fosforüleerivad STAT valke ning moodustub kas STAT1/2 heterodimeer, STAT1 homodimeer või STAT2 homodimeer. STAT1/2 heterodimeeriga seondub ka IRF9, moodustuvat kompleksi nimetatakse ISGF3. Heterodimeer seondub ISRE järjestusele, mis vallandab antiviraalse vastuse, homodimeerid seonduvad aga GAS järjestusele, mis vallandab põletikuvastuse (modifitseeritud Rönnblom ja Leonard, 2019).

Kuigi interferoon alfa retseptorid on olemas pea kõigil rakkudel, on IFN-I toimed kõigist vererakkudest just monotsüütidele kõige tugevamad, mis teeb neist huvipakkuva kandidaadi SEL uurimisel (Perez et al., 2022). SEL patsientide seerumis on täheldatud suurenenud IFN- α aktiivsust, samuti indutseerib IFN- α tervete monotsüütide diferentseerumist küpseteks dendriitrakkudeks (Blanco et al., 2001). Lisaks on varasemalt näidatud, et ravi IFN- α -ga on võimeline tekitama *de novo* SEL-i (Niewold ja Swedler, 2005; Rönnblom, 1990).

Kuna IFN- α -l on oluline roll süsteemses erütematoosses luupuses, siis teostati antud töös tervete monotsüütide peal kahenädalane IFN- α stimulatsioon, et mimikeerida IFN- α signatuuri SEL-is. Lisaks teostati ChIP ja ChIP-Seq SEL patsientide, kontrollide ja stimuleeritud tervete monotsüütidega.

2 EKSPERIMENTAALOSA

2.1 Töö eesmärgid

Hüpoteesid:

1. Patsientide ja kontrollisikute monotsüütides on erinevad histoonide seondumismustrid;
2. IFN- α toimetel tekivad monotsüütides epigeneetilised muutused.

Eksperimentaalse töö eesmärgid:

1. Võrrelda aktiivsele kromatiinile iseloomulike histooni modifikatsioonide jaotumist SEL patsientide ja kontrollisikute monotsüütide kromatiinil;
2. Uurida epigeneetilisi muutusi monotsüütides IFN- α juuresolekul *in vitro*.

2.2 Materjal ja meetoodika

2.2.1 Patsiendid ja kontrollisikud

Töös uuriti 24 SEL diagnoosiga patsienti (keskmine vanus 52 aastat; SD = 11,8; 3 meest ja 21 naist). Võrdluseks kasutati 24 tervet kontrollisikut (keskmine vanus 52 aastat; SD = 11,3; 3 meest ja 21 naist). Lisas 1 on välja toodud patsientide koodid, sugu, vanus, IFN- α kontsentratsioon ning SLEDAI skoor. IFN- α kontsentratsioon määrati koostöös Pariisi Pasteuri instituudi uurimisgrupiga kasutades Simoa meetodit (*Single Molecul Array*). Kontrollisikud kaasati uuringusse Ida-Tallinna Keskhaigla patsientide ning Tartu Ülikooli Bio- ja siirdemeditiini instituudi töötajate hulgast, kellel ei esinenud autoimmuunhaigusi. Uuring on läbi viidud kooskõlas Eetikakomiteega (TAIEK otsus 564, TAIEK otsus 630) ning kõik uuritavad allkirjastasid informeeritud nõusoleku.

2.2.1.1 Perifeerse vere mononukleaarsete rakkude eraldamine verest

Patsientidelt ning kontrollisikutelt koguti kaks katsutit verd. Patsientide ja kontrollisikute perifeerse vere mononukleaarset rakud (*peripheral blood mononuclear cell*, PBMC) eraldati

vere leukotsüütide kihist. Selle jaoks koguti veri CPT katsutitesse (Becton Dickinson), mida fuugiti kiirusel 1800 x g 25 minutit. Tsentrifugimise järgselt eraldati katsutitest ettevaatlikult PBMC-de fraktsioon ning tõsteti ümber 15 ml katsutisse. Seejärel pesti rakke 10 ml PBS-iga (Lonza) ning tsentrifugiti 10 min 200 x g. Rakud suspendeeriti 10 ml PBS-iga, loendati ning tsentrifugiti 10 min 300 x g 4 °C.

2.2.1.2 Monotsüütide isoleerimine

PBMC-de eraldamise järgselt jätkati kohe monotsüütide ehk CD14+ rakkude isoleerimisega. Monotsüütide eraldamine toimus *Dynabeads Human T-expander CD14* magnetkeradega (Gibco, Life Technologies) järgides tootja protokollit. Rakud võeti üles RB puhvril (50 ml (0,5%) BSA + 2 ml (2mM) EDTA + 450 ml PBS) arvestades 10⁷ raku kohta 80 µl puhvrit. Seejärel lisati CD14 magnetkerad arvestades 10⁷ raku kohta 20 µl kerasil. Proove inkubeeriti 15 min 4 °C juures pimedas. Seejärel pesti rakke 8 ml RB-ga ning tsentrifugiti 7 min 300 x g. Rakkude eraldamine toimus MS kolonnidega (Miltenyi Biotech) MACSi Separator magnetalusel (Miltenyi Biotech). Kolonnid tasakaalustati 1 ml külma RB puhvriga ning kolonnide alla asetati 15 ml katsutid. Rakkudelt eemaldati imuriga supernatant ning võeti üles 1 ml külmas RB puhvril. Seejärel pipeteeriti suspensioon MS kolonnile. Rakususpensiooni läbitilkumise järel pesti kolonni kolm korda 500 µl RB puhvriga. Kolonn eemaldati magnetaluselt ning tõsteti uue 15 ml katsuti peale. Kolonnile lisati 2 ml RB puhvrit ning koheselt suruti vedelik läbi kolonni. Katsutisse jääv fraktsioon sisaldas monotsüüte ehk CD14+ rakke. Monotsüüdid loendati ning seejärel tsentrifugiti 300 x g 10 min 4 °C.

2.2.2 *In vitro* stimuleeritud monotsüüdid

Selleks, et imiteerida, kuidas SEL haigus ja IFN- α mõjutavad monotsüüte, teostati IFN- α stimulatsioon tervetele rakkudele. Selle jaoks kasutati leukotsüütide rikkast vereproovi fraktsioonist (*buffy coat*, BC) eraldatud monotsüüte. Antud töös kasutati 4 veredoonori *buffy coat*-i proove, mis saadi Tartu Ülikooli kliinikumi verekeskusest.

2.2.2.1 PBMC-de eraldamine buffy coat-ist

Buffy coatist PBMC-de eraldamine toimus kasutades Ficoll gradienttsentrifuugimist. BC-st saadud veri lahjendati toasooja PBS-iga 1:1-le ning seejärel segati. 50 ml katsutite põhja pipeteeriti 10 ml Ficolli lahust (Ficoll-Paque PLUS, GE Healthcare Bio-Science AB) ning seejärel jaotati ettevaatlikult vere ja PBS-i segu 25 ml kaupa Ficolli lahusele, fraktsioone segi ajamata. Katsuteid tsentrifuugiti 400 x g 30 min 20 °C ilma kiirenduse ja pidurduseta. Plasma eemaldati imuriga, lümfotsüüdid korjati kokku steriilse Pasteuri pipetiga ning tõsteti puhtasse 50 ml katsutisse. Rakke pesti 50 ml PBS-iga ning tsentrifuugiti 200 x g 10 min 20 °C. Seejärel eemaldati imuriga supernatant ning võeti rakud üles 50 ml PBS-is. Rakud loendati ning tsentrifuugiti 300 x g 10 min 4 °C.

2.2.2.2 Monotsüütide isoleerimine BC-st

Monotsüütide isoleerimine toimus *buffy coat*-i proovide puhul nagu kirjeldatud punktis 2.2.1.2. Rakke pesti 10 ml RB puhvriga ning tsentrifuugiti 300 x g 7 min 4 °C. Kuna rakkude maht oli BC puhul suurem kui SEL patsientidel ja kontrollidel, kasutati rakkude eraldamiseks LS kolonne (Milteny Biotech). Et vältida kolonnide ummistamist rakuklompidega, kasutati LS kolonnide peal ka *Pre-Separation* 30 um filtreid (Milteny Biotech). *Pre-Separation* filtrid ning kolonnid tasakaalustati 3 ml külma RB puhvriga ning kolonnide alla asetati 15 ml katsutid. Rakkudelt eemaldati imuriga supernatant ning võeti üles 3 ml külmas RB puhvris. Seejärel pipeteeriti suspensioon *Pre-Separation* filtrile. Vedeliku läbitilkumise järel lisati pesemiseks 3 ml külma RB puhvrit. Pesu korrati 3 korda. Kolonn eemaldati magnetaluselt ning tõsteti uue 15 ml katsuti peale. Kolonnile lisati 2 ml RB puhvrit ning koheselt suruti vedelik läbi kolonni. Katsutisse jääv fraktsioon sisaldas monotsüüte ehk CD14+ rakke.

2.2.2.3 Monotsüütide stimuleerimine

Rakkude isoleerimise järgselt jagati monotsüüdid keskmiselt 20 miljoni kaupa 10 cm läbimõõduga koekultuuri tassidele. Rakke kasvatati 10 ml RPMI (Corning) söötmes 37 °C juures 5% CO₂ inkubaatoris. Söötmesse lisati 10 % 56 °C juures inaktiveeritud vasikaloote seerumit, 100 U/ml penitsilliini (Corning), 100 µg/ml streptomütsiini (Corning) ja 2 mM L-glutamiini (Lanlab). Samuti lisati söötmele granülotsüüt-makrofaagi kolooniaid stimuleerivat

faktorit (*granulocyte-macrophage colony stimulating factor*, GM-CSF) (Peprotech) lõppkontsentratsiooniga 50 ng/ml. Stimulatsiooni pikkuseks oli 14 päeva, kusjuures neljandal, kaheksandal ja üheteistkümnendal päeval vahetati pool söödet ning lisati uuesti GM-CSF-i. Rakkude eemaldamiseks koekultuuri tassidelt kasutati rakukraapijat. Sööde koguti 50 ml katsutisse, koekultuuri tassidele lisati 2 x 2 ml PBS puhvrit ning ettevaatlikult kraabiti rakud kokku ning tõsteti samasse katsutisse. Rakud tsentrifugeeriti 300 x g 10 min 4 °C. Sellele järgnes pesu 10 ml PBS-ga. Rakud loendati ning tsentrifugeeriti 300 x g 10 min 4 °C. Selleks, et mimikeerida SEL haigust *in vitro* kasutati IFN- α -2a (MACS, Milteny Biotech) tsütokiini lõppkontsentratsioonis 1000 U/ml. Kokku kasutati töös rakke neljast erinevast *buffy coat*-ist, kõigi puhul 1 paralleel stimuleerimata rakke ning 1 paralleel IFN- α -ga stimuleeritud rakke. Edaspidi viidatakse antud proovidele kui *in vitro* stimuleeritud monotsüüdid või *in vitro* MO.

2.2.3 Kromatiini immunopretsipitatsioon ehk ChIP

2.2.3.1 Ristsidemete moodustumine

Ristsidemete moodustumiseks võeti CD14⁺ rakud üles PBS puhvris arvestades 1 ml puhvrit 10⁶ raku kohta. Ristsidemete moodustamiseks DNA ja valkude vahel lisati rakkudele 100 μ l 11% formaldehüüdi lahust (50 mM Hepes-KOH, pH 7.3, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 11 % Formaldehyde, MQH₂O). Katsuteid segati ning inkubeeriti toatemperatuuril 10 min. Ristsidemete moodustumise peatamiseks lisati rakkudele 100 μ l 1,25 M glütsiini (AppliChem), segati ning inkubeeriti toatemperatuuril 10 min. Seejärel tsentrifugeeriti rakud põhja 1000 x g 10 min 4 °C. Pärast tsentrifugeerimist hoiti rakke jääl ning pesti 1 ml külma PBS-iga, mille järel tsentrifugeeriti rakke 1000 x g 10 min 4 °C. Pesu korrati veel ühe korra. Seejärel eemaldati supernatant ning rakud kiirkülmutati vedelas lämmastikus. Proove säilitati -80 °C juures.

2.2.3.2 Rakkude lüüsimine ja kromatiini sonikeerimine

Rakkude lüüsimiseks võeti proovid -80 °C juurest ning sulatati jääl 10 min jooksul. Sellele järgnes rakkude ülesvõtmine 500 μ l NCP I puhvris (10 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 0,25% Triton X-100, MQH₂O + 10 mM Na-butüraat, proteaasi inhibiitor (*HaltTM Protease Inhibitor Cocktail, EDTA-free (100X)*), Thermo Fisher Scientific). Proove tsentrifugeeriti 7 min 1000 x g 4

°C, mille järgselt supernatant eemaldati. Järgmiseks resuspendeeriti rakud 500 µl NCP II (1 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 10 mM Hepes, pH 6.5, 200 mM NaCl, MQH₂O + 10 mM Na-butüraat, proteaasi inhibiitor) puhvis, millele järgnes samuti tsentrifuugimine 7 min 1000 x g 4 °C. Seejärel eemaldati ettevaatlikult supernatant ning resuspendeeriti rakud 115 µl lüüsi puhvis (10 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 8.1, 0,5 % NP-40, 0,5 % SDS, MQH₂O + Na-butüraat, proteaasi inhibiitor). Rakke inkubeeriti 10 min toatemperatuuril (*room temperature*, RT), millele järgnes sonikeerimine Bioruptor UCD-200 sonikaatoriga (Diagenode). Proove sonikeeriti kokku 24 minutit kõrgeima võimsuse juures (High, 200 W), võttes üheks tsükliks 12 minutit (30 sek On ja Off), mille järgselt masinat jahutati jääga ja tsentrifuugiti lühidalt 5 sek 2000 x g.

2.2.3.3 Antikehade ja magnetkerade ettevalmistus

Uuritavateks antikehadeks olid histooni modifikatsiooni markerid H3K4me₃ (Millipore, 07-473) ning H3K27ac (Abcam, ab4729) ning kontrolliks kasutati Normal Rabbit IgG-d (Millipore, 12-370). 0,2 ml katsutitesse lisati 2 µl 1 µg/µl antikeha ning 98 µl BSA lahust (0,25 g Probumin (Bovine Serum Albumin, BSA) ning 50 ml PBS). Katsutid tsentrifuugiti lühidalt 10 s 2000 x g. CHIP katse jaoks kasutati kokku 1 miljon rakku. Iga antikeha jaoks kasutati $3 \cdot 10^5$ rakku, *inputi* jaoks kasutati sellest 20%. Selleks, et immunopretsipitatsiooni läbi viia, kasutati Dynabeads Sheep anti-Rabbit IgG M-280 magnetkerasid (Life Technologies). Magnetkerad pipeteeriti 0,2 ml katsutitesse ning lisati 200 µl BSA lahust. Pesemiseks asetati katsutid magnetlusele, et magnetkerad kinnituksid katsutite seinale. Seejärel eemaldati supernatant ning korrati pesu kolm korda. Lõpuks suspendeeriti magnetkerad 10 µl puhtas BSA lahuses.

2.2.3.4 Kromatiini ettevalmistamine

Sonikeerimise järgselt tsentrifuugiti proove 10 min maksimaalsel kiirusel 4 °C juures. *Input* proovi jaoks võeti 6,7 µl supernatanti, mis hoiustati -20 °C juures. Ülejäänud kromatiin jagati 33,3 µl kaupa 3 katsutisse (H3K4me₃, H3K27ac ning IgG antikehade jaoks). Igale proovile lisati seejärel 42 µl TE puhvrit (10mM Tris, pH 8,0, 1 mM EDTA, pH 8,0) ning 25 µl Triton X lahust (1% Triton X 100, 0,1% DOC, 1X proteaasi inhibiitori tablett, 1X TE).

2.2.3.5 Kromatiini immunopretsipitatsioon

Immunopretsipitatsioon viidi läbi masinaga ChIP IP-Star (SX-8G, Diagenode). Masinasse asetati 10 rida 0,2 ml katsuteid, mis sisaldasid erinevaid puhvreid: magnetkerad, BSA puhver, antikehade segu, kromatiinisegu, RIPA puhver (50 mM Hepes-KOH, pH 7.6, 500 mM LiCl, 1 mM EDTA, 1 % NP-40, 0.7 % DOC, MQH₂O + 10 mM Na-butüraat, proteaasi inhibiitori kokteil) ja elueerimispuhver (10 mM Tris, pH 8.0, 1 mM EDTA, 1% SDS, MQH₂O). Lihtsustamiseks on tuubide järjestus toodud tabelis 4.

Tabel 4. ChIP tuubide järjestus.

Rida	Puhver	Lõppmaht
12	Elueerimispuhver	100 µl
11	RIPA	100 µl
10	RIPA	100 µl
9	RIPA	100 µl
8	RIPA	100 µl
7	Kromatiinisegu	100 µl
6	Antikehasegu	100 µl
5	BSA puhver	50 µl
4	BSA puhver	50 µl
3	Magnetkerad	10 µl
2		
1	Järgmisel päeval -> <i>Input</i>	100 µl

Masinal kasutati programmi „*ChIP Ipure 16 100 vol*“. Järgmisel päeval programmi lõppemisel lisati esimesse ritta input proovid (6,7 µl kromatiini + 93,3 µl elueerimispuhvrit). Kuna ChIP proovid koos magnetkeradega olid selleks hetkeks liikunud 12. ritta, eemaldati ülejäänud katsutid ning ChIP proove ja input proove inkubeeriti masinas 4 h 65 °C juures. Inkubatsiooni lõppedes tõsteti ChIP proovidega katsutid magnetlusele ning eraldati supernatant uude katsutisse. Seejärel töödeldi proove termomikseril RNAas A-ga (500 U/ml, RNase Cocktail Enzyme Mix, Ambion, Life Technologies) ning Proteinaas K-ga (10 mg/ml, Thermo Scientific), kasutades järgnevat skeemi:

5 µl RNAas A 500 U/ml	700 rpm 1 h 37 °C
5 µl Proteinaas K 10 mg/ml	700 rpm 1 h 55 °C

Seejärel puhastati ja kontsentreeriti DNA *DNA Clean & Concentrator* kitiga (Zymo Research) vastavalt tootja protokollile ning elueeriti 20 µl-s elueerimispuhvrts.

2.2.4 Kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon ChIP proovidele

Kvantitatiivse polümeraasi ahelreaktsiooni (*quantitative polymerase chain reaction*, qPCR) analüüs teostati, et näha immunosadestatud kromatiini alade rikastust võrreldes kogu kromatiiniga. Kasutati 2 ChIP praimerit, B2M ja MYOD1, mille järjestused on toodud tabelis 5.

Tabel 5. Praimerite järjestused.

Geen	Forward praimer	Reverse praimer
<i>B2M</i>	CTCTCTCGCTCCGTGACT	GCCGAAAGGGGCAAGTAG
<i>MYOD1</i>	GTAGGAGAGGCGGGAGAA	TAGGTCTGCGAGGGTCTC

Proovide analüüsimiseks kasutati Viia 7 qPCR masinat (Applied Biosystems). Reaktsioonisegusse lisati ühe proovi kohta 16,3 µl *2x Maxima™ SYBR Green/ROX qPCR Master Mix* (Fermentas), 14,6 µl MQ ning 1,5 µl 5 mM *forward* ja *reverse* praimerite segu. DNA-d lisati reaktsioonisegule 1 µl ning seejärel jagati reaktsioonisegu 10 µl kaupa 384-kannulisele mikrotiiterplaadile laiali. Kõikide praimerite puhul kasutati kontrollina MQ-d. qPCR-i programmietapid olid 1 tsüklil 10 minutit 95 °C juures polümeraasi aktivatsiooni, denaturatsiooni 45 tsüklit 15 sekundit 95 °C juures, praimerite seondumine ning produkti paljundamine 1 minut 60 °C juures, 1 tsüklil 95°C juures 15 sekundit dissotsiatsiooni etappi, 60 °C 1 minuti juures, millele järgnes 1 tsüklil sulamiskõvera analüüsi. Andmete analüüsiks kasutati võrdlevat Ct meetodit ning selle jaoks kasutati valemit $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak ja Schmittgen, 2001). Proovid normaliseeriti *input*-i põhjal (% *input*-ist).

2.2.5 ChIP-Seq

2.2.5.1 Raamatukogude ettevalmistamine

Raamatukogude valmistamisel kasutati materjalina ChIP proove, mis saadi SEL patsientidest, kontrollidest ning *in vitro* stimuleeritud monotsüütidest. Kokku valmistati 108 raamatukogu: 4 *input* proovi (1 SEL patsient, 1 kontroll, 2 *in vitro* MO *input* proovi), 24 SEL patsienti ja 24 kontrolli H3K4me3 ja H3K27ac antikehadega ning 8 *in vitro* MO proovi H3K27ac antikehaga. Raamatukogude tegemiseks kasutati NEBNext® Ultra™ II DNA Library Prep Kit for Illumina® (New England BioLabs) järgides tootja protokoll. Raamatukogude jaoks võeti 15 µl ChIP DNA-d, mille kogus oli hinnanguliselt 1-2 ng. *Input* proovide ning *in vitro* MO proovide puhul teostati DNA lahjendamist.

2.2.5.2 Sekveneerimine

Raamatukogude sekveneerimine viidi läbi Novogene Co. (Hiina) firma poolt. Proovid sekveneeriti Illumina NovaSeq 6000 masinaga (Illumina, San Diego, USA) vastavalt tootja protokollile kasutades *paired-end* 150 bp järjestusi.

2.2.5.3 ChIP-Seq andmeanalüüs

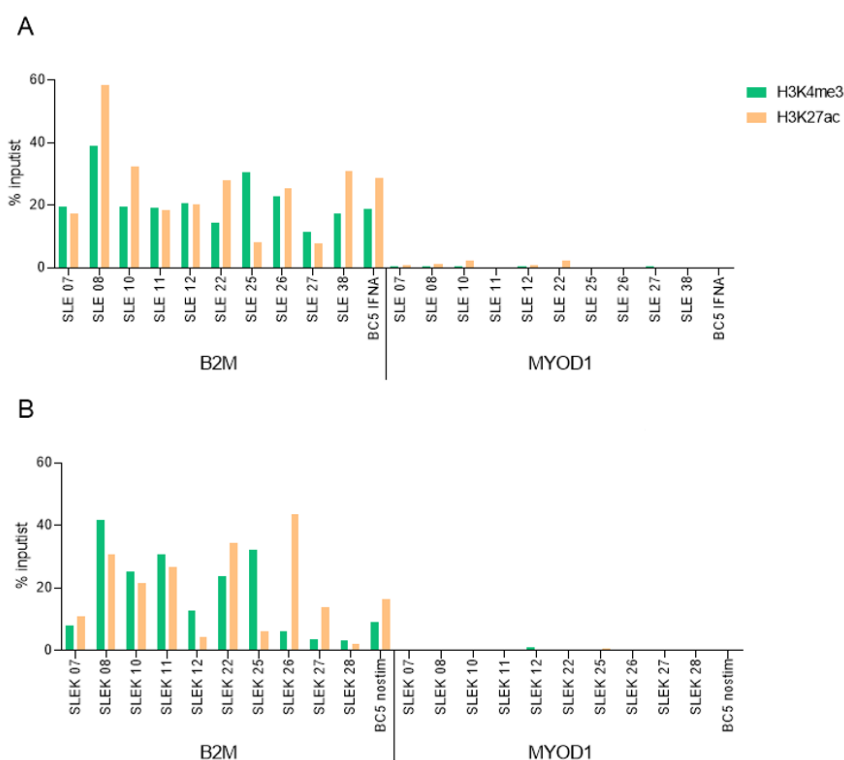
Sekveneerimisandmete analüüs sooritati HPC klastris. Kõigepealt sooritati kvaliteedikontroll programmiga FasctQC¹, et veenduda sekveneerimisandmete kvaliteedis. Seejärel eemaldati ebakvaliteetsed lugemid kasutades programmi Trim Galore². Ebakvaliteetsete lugemite kvaliteedipiiriks oli Phred score = 30, mis annab ühe nukleotiidi täpsuseks 99,9% ehk ebatäpseid nukleotiide on 1/1000 kohta. Järgnevalt joondati lugemid referentsgenoomile GRCh37/hg19, mille jaoks kasutati programmi Bowtie2³. Seejärel teostati lugemite filtreerimine ning duplikaatide märgistamine ja eemaldamine. Filtreerimine teostati Samtools 1.15 programmiga⁴ ning filtreeriti lugemid, mille MAPQ skoor jäi alla 30 (täpsus 99,9%) ja millele ei leidunud paarilist lugemit. Alles jäeti unikaalsed lugemid, mis pärinesid DNA fragmentide mõlemast otsast. Sellele järgnes duplikaatide eemaldamine, milleks kasutati samuti Samtools programmi. Selleks, et leida H3K27ac seondumiskohad ehk piigid genoomis, kasutati programmi MACS2⁵. Saadud piigid filtreeriti nn mustas nimekirjas olevate

genoomsete piirkondade suhtes, mis annavad alati teatud kohtadesse genoomil rikastuse (nt tsentrosoomil)⁶. Lisas 2 on toodud sekveneerimisandmete esmase analüüsi kokkuvõte. Saadud piike annoteeriti kasutades GREAT⁷, MEME-ChIP⁸, ChromHMM⁹ ning Diffbind¹⁰ programme ning tulemused visualiseeriti IGV brauseris¹¹.

2.3 Tulemused

2.3.1 ChIP-i katse kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon

ChIP-i katse sooritati kõikidele valimis osalenud monotsüütide proovidele. Selleks, et välja selgitada, kas ChIP-i katsed õnnestusid ning näha rikastust genoomi kontrollregioonides, sooritati kõigile proovidele qPCR. Positiivseks kontrolliks kasutati koduhoidjageeni *B2M* ning negatiivseks kontrolliks geeni *MYOD1*. qPCR katse näitlikustamiseks on allpool olevatel graafikutel välja toodud 10 SEL patsiendi, 10 kontrolli ning 1 stimuleeritud ja 1 stimuleerimata *in vitro* MO proovi tulemused (joonis 5). Nagu oli arvata, on MYOD1 rikastus igal pool madal. B2M puhul on näha rikastust mõlema histooni modifikatsiooni osas. Sekvenerimisse saadeti patsientide ja kontrollide puhul nii H3K4me3 kui ka H3K27ac modifikatsioon. Koekultuuris kasvatatud monotsüütide puhul saadeti sekvenerimisse vaid H3K27ac, sest need proovid näitasid tugevamat rikastust just selle modifikatsiooni suhtes.

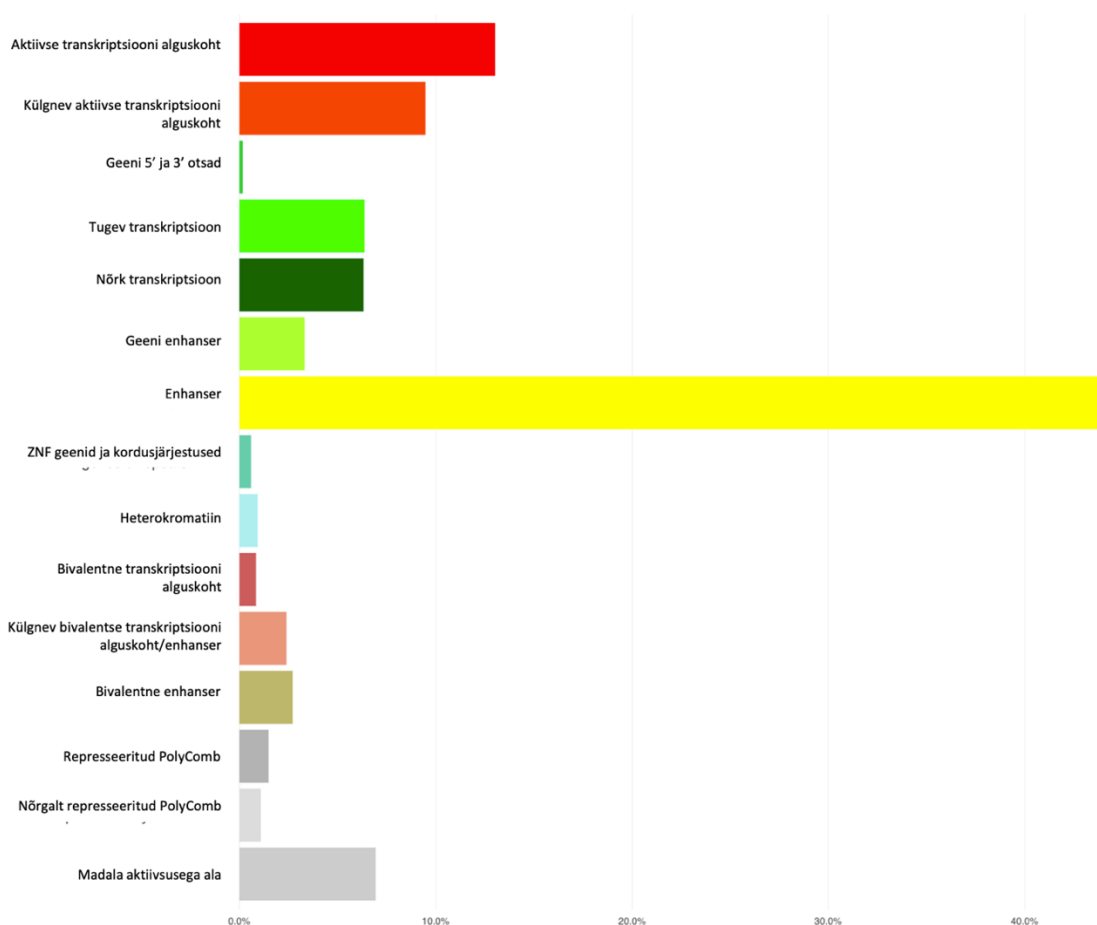


Joonis 5. SEL patsientide, kontrollide ning *in vitro* stimuleeritud ja stimuleerimata monotsüütide ChIP-i katse qPCR. qPCR katsetes kontrolliti ChIP-i õnnestumist ehk vaadeldi H3K4me3 ja H3K27ac modifikatsiooniga märgistatud genoomi regioonides proovide rikastust. (A) SEL patsientide ning *in vitro* IFN- α -ga stimuleeritud monotsüüdid. (B) Kontrollide ning *in vitro* IFN- α -ga stimuleeritud monotsüüdid.

in vitro stimuleerimata monotsüüdid. Kõik proovid on normaliseeritud ChIP-i katse *inputi* suhtes. Graafiku y-teljel on toodud *B2M* ja *MYOD1* rikastuse tasemed protsentides.

2.3.2 Patsientide monotsüütide H3K27ac seondumiskohtade kattuvus genoomil

Kuigi sekveneerimisse saadeti nii H3K4me3 kui ka H3K27ac antikehadega sadestatud ChIP-i proovid, siis antud töös keskendutakse neist viimasele. Selle jaoks, et uurida H3K27ac ülegenoomseid seondumiskohti, sekveneeriti ning analüüsiti ChIP-i materjal. Selleks, et teada saada, mis genoomi osades H3K27ac modifikatsiooni seondumiskohad asuvad, võrreldi proove ChromHMM¹¹ andmestikuga *E124 Monocytes-CD14+ RO01746 Primary Cells*, mis kirjeldab inimese monotsüüte. Tulemustest tuleb selgelt välja, et enamuse (ca 45%) proovide seondumiskohtadest asuvad enhanseralades. Lisaks on H3K27ac modifikatsiooni seondumiskohad transkriptsiooni alguskohtades ning sellega külgnevates alades. Graafikul on näitena toodud patsientide lugemite kattuvus erinevates genoomi regioonides (joonis 6). Lisas 3 on välja toodud ka teiste gruppide andmed, mis sarnanesid kõik üldiselt alltoodud joonisele.

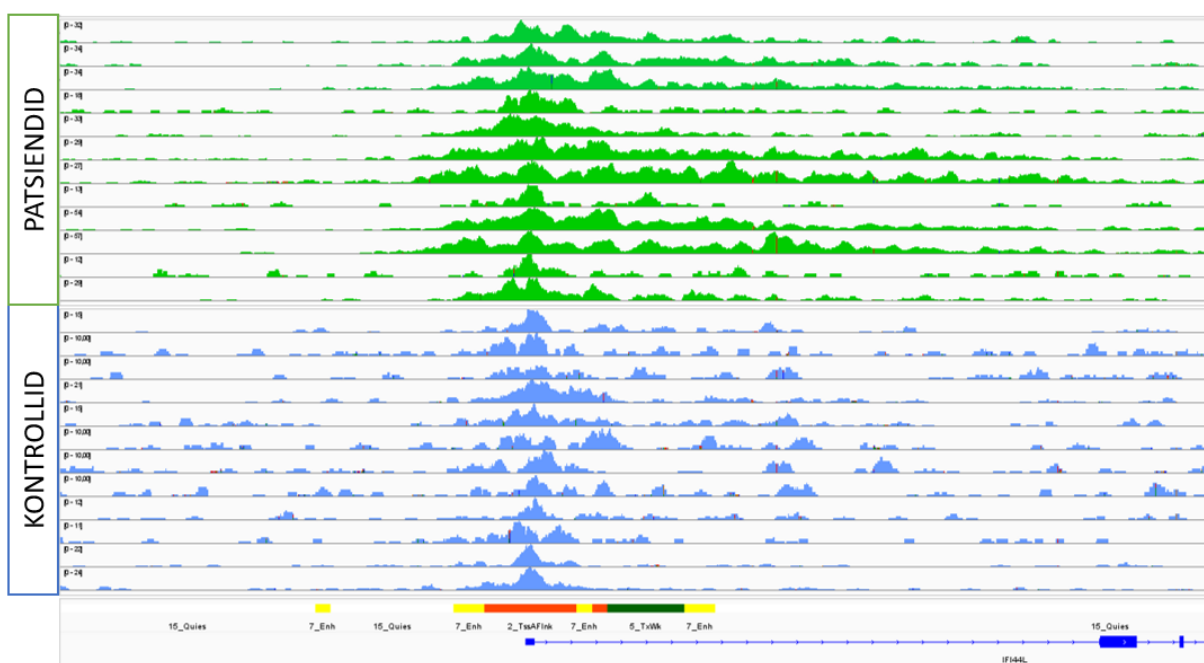


Joonis 6. H3K27ac seondumiskohtade kattuvus genoomil SEL patsientide näitel. Seondumiskohtade ülegenoomilist kattuvust uuriti ChromHMM¹¹ andmebaasist pärit inimese

monotsüütide andmestikuga *E124 Monocytes-CD14+ RO01746 Primary Cells*. Joonise y-teljel on toodud erinevad genoomi regioonid ning x-teljel protsent seondumiskohtade kattuvusest vastavate regioonidega.

2.3.3 Seondumiskohtade visualiseerimine referentsgenoomil

Selleks, et visualiseerida ChromHMM andmebaasist saadud tulemusi referentsgenoomil, kasutati IGV brauserit. Antud töös on näitena toodud H3K27ac modifikatsiooni rikastus *IFI44L* geenis, mille ekspresioonitaseme tõusu on nähtud varasemates SEL monotsüütide uuringutes (Luo et al., 2022). Nii patsientide kui ka kontrollgrupi proovides esineb tugev rikastumine aktiivse transkriptsiooni külgnevas alas (*TssAFlnk*). Samuti on näha SEL patsientide proovide tugevamat rikastust enhanseralades (*Enh*), võrreldes kontrollproovidega (joonis 7).

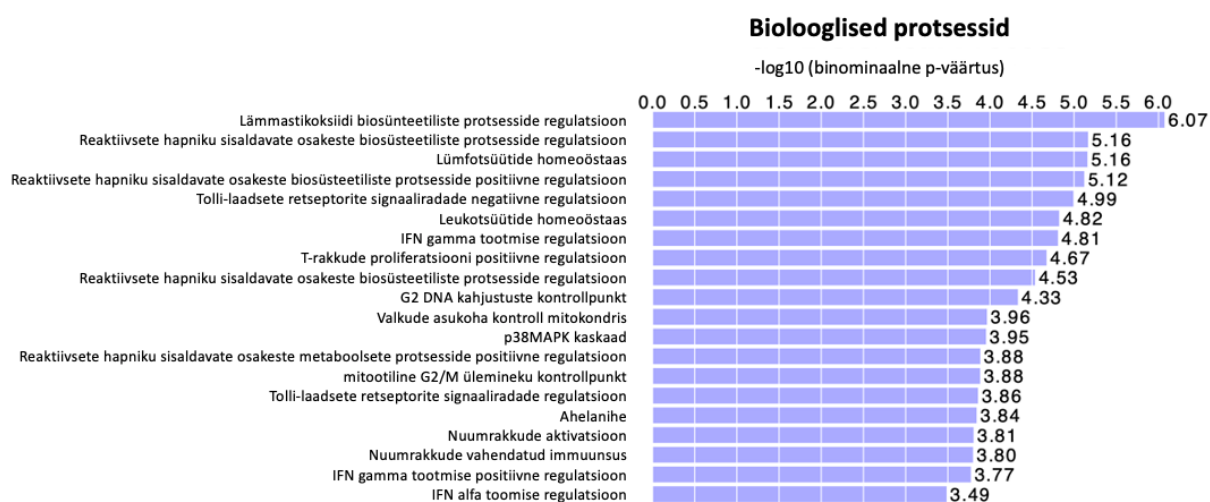


Joonis 7. H3K27ac modifikatsiooni visualiseerimine IGV brauseris. Antud joonisel on visualiseeritud SEL patsientide proovid rohelise ning kontrollide proovid sinisega. Proovide seondumiskohti vaadeldi *IFI44L* geenis. Selleks, et uuritavaid seondumiskohti võrrelda, kasutati *E124 Monocytes-CD14+ RO01746 Primary Cells* andmestikku. Kromatiini regioonid on toodud samades värvides nagu joonisel 5. TssAFlnk – külgnev aktiivse transkriptsiooni alguskoht (*Flanking Active TSS*), Enh – enhanserala (*Enhancer*); TxWk – nõrk transkriptsioon (*Weak transcription*).

2.3.4 Erinevalt rikastunud regioonid monotsüütides

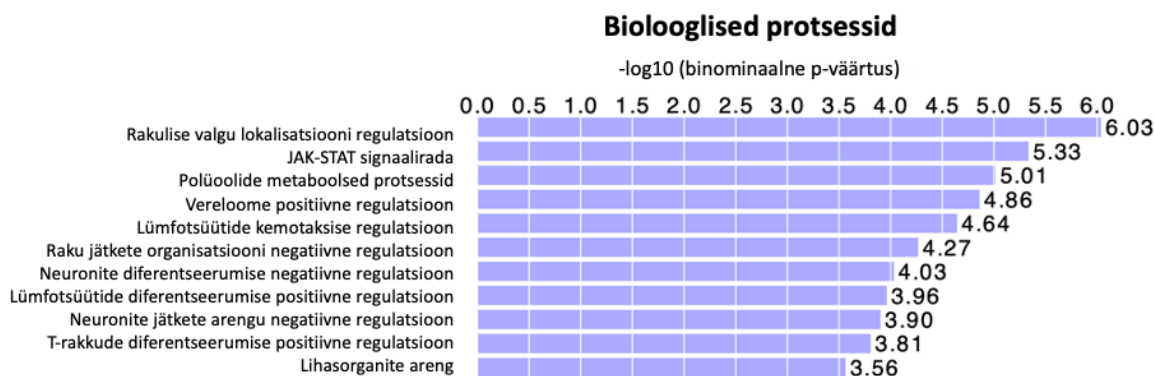
Erinevalt rikastunud (*differentially enriched*, DE) regioonide leidmiseks kasutati programmi Diffbind. Kokku tehti kolm erinevat võrdlust: SEL patsiendid versus kontrollid, *in vitro* IFN- α

stimuleeritud monotsüüdid versus mittestimuleeritud monotsüüdid ning SEL IFN- α kõrge versus madala kontsentratsiooniga patsientide monotsüüdid. Võrreldes SEL patsiente kontrollisikutega, leiti kokku 6011 erinevalt rikastunud regiooni, millest 4788 olid ülesreguleeritud ehk positiivselt rikastunud ning 1223 olid allareguleeritud ehk negatiivselt rikastunud. See tähendab, et ülesreguleeritud regioonide puhul oli rikastus SEL patsientides kõrgem ning allareguleeritud proovide puhul madalam. Selleks, et teostada erinevalt rikastunud regioonidele annotatsiooniuuring, kasutati andmebaasi GREAT ning vaadeldi DE regioonide seotust bioloogiliste protsessidega, milleks kasutati andmebaasi *Gene Ontology Biological Processes*¹². Annotatsiooniuuringus vaadeldi koos nii positiivselt kui negatiivselt rikastunud regioone. Sellest analüüsist selgus, et erinevalt rikastunud regioonid olid seotud paljude erinevate protsessidega, mille seast võib välja tuua Tolli-laadsete retseptorite ja oksüdatiivse stressi regulatsiooni, p38MAPK kaskaadi, millega võib seotud olla ka lämmastikoksiidi biosünteesiliste protsesside regulatsioon, ning ka interferoonide tootmise regulatsiooni (joonis 8).



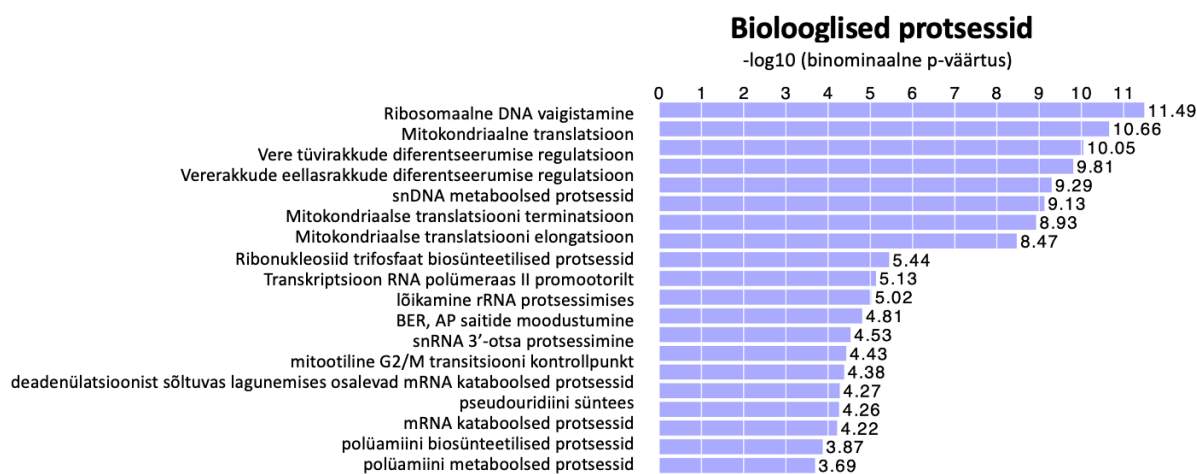
Joonis 8. SEL patsientide erinevalt rikastunud regioonide uurimine. Annotatsiooniuuringuks kasutati GREAT andmebaasi koos *GO Biological Process* andmebaasiga, mis otsib binominaalse p-väärtuse alusel DE regioonidega seotud bioloogilised protsessid.

Järgnevalt vaadeldi DE regioone *in vitro* IFN- α stimuleeritud monotsüütides võrreldes mittestimuleeritud rakkudega. Kokku leiti 531 erinevalt rikastunud regiooni, millest 231 olid ülesreguleeritud ja 300 allareguleeritud. Sarnaselt eelmisele grupile vaadeldi annotatsiooniuuringus nii positiivselt kui negatiivselt rikastunud regioone koos. Tulemustest selgus, et DE regioonid olid seotud JAK-STAT signaalirajaga, vereloome ning vererakkude diferentseerumise regulatsiooniga (joonis 9).



Joonis 9. *In vitro* IFN- α stimuleeritud proovide erinevalt rikastunud regioonide uurimine. Annotatsiooniuringuks kasutati GREAT andmebaasi koos *GO Biological Process* andmebaasiga, mis otsib binominaalse p-väärtuse alusel DE regioonidega seotud bioloogilised protsessid.

Viimaseks uuriti, kas ka IFN- α kõrge ja madala seerumikontsentratsiooniga patsientide gruppide vahel esineb monotsüütides histoonide seondumismustrites erinevusi. Selle jaoks jaotati SEL-i patsiendid kahte gruppi, kus kontsentratsiooniga üle 100 fg/ml patsiendid moodustasid kõrge kontsentratsiooniga grupi ning alla selle moodustasid madala kontsentratsiooniga grupi. Kõrgesse gruppi kuulus 9 patsienti ning madalasse 15 patsienti. Kokku leiti 8832 erinevalt rikastunud regiooni, millest 7951 olid ülesreguleeritud ning 881 olid allareguleeritud. Annotatsiooniuringus vaadeldi samuti nii üles- kui allareguleeritud regioone koos (joonis 10). Otsingutulemustest selgus, et erinevalt rikastunud regioonid olid seotud vere tüvi- ning eellasrakkude diferentseerumise regulatsiooni, polüamiinide biosünteesiliste ja metaboolsete protsesside ning mitokondriaalse translatsiooniga seotud protsessidega.



Joonis 10. SEL patsientide kõrge IFN- α kontsentratsiooniga proovide erinevalt rikastunud regioonide uurimine. Annotatsiooniuringuks kasutati GREAT andmebaasi koos *GO Biological Process* andmebaasiga, mis otsib binominaalse p-väärtuse alusel DE regioonidega seotud bioloogilised protsessid. Analüüs viidi läbi kõigi regioonidega.

Lisaks sooritati peakomponentanalüüs (*principal component analysis*, PCA), mis konstrueerib 2 peamist komponenti, mille alusel paigutub iga proov joonisele. Peakomponentanalüüsil grupeeruvad sarnased proovid kokku. Graafikud on toodud lisa 4.




2.3.4.1 Seondumismotiivid

Viimaseks sooviti uurida transkriptsioonifaktorite seondumismotiive, mis kattuksid positiivsete erinevalt rikastunud regioonidega. Esimesena otsiti patsientide ja kontrollide monotsüütide analüüsil tuvastatud DE regioonides paiknevaid seondumismotiive. Motiivide leidmiseks võeti ülesreguleeritud regioonidest FASTA järjestused, mis sisestati MEME-ChIP andmebaasi. Otsinguga leiti ülesreguleeritud regioonidega seitse kattuvat seondumismotiivi, millest on tabelis 6 välja toodud väikseima E-väärtusega motiiv. Ülesreguleeritud regioonides leiti sarnaseid motiive *IRF1*, *ANDR*, *STAT2* geenidega.

Samuti uuriti ka *in vitro* stimuleeritud monotsüütides IFN- α toimel tuvastatud ülesreguleeritud DE regioonide seondumismotiive. Seal leiti otsinguga ülesreguleeritud regioonidega kolm kattuvat seondumismotiivi, millest on tabelis 6 toodud väikseima E-väärtusega motiiv. Ülesreguleeritud regioonides leiti sarnane motiiv geeniga *IKZF1*.

Lõpetuseks vaadeldi ka IFN- α kõrge ja madala kontsentratsiooniga grupi DE regioonide seondumismotiive. Otsinguga leiti positiivsete regioonidega 8 kattuvat motiivi, millest on tabelis 6 välja toodud väikseima E-väärtusega motiiv. Sarnaseid motiive leiti geenide *PRDM6*, *NFATC1* ja *FOXJ3*.

Tabel 6. SEL patsientide erinevalt rikastunud regioonide sagedaseimad seondumismotiivid võrreldes kontrollidega. Tabelis on välja toodud 4 erinevat motiivi, millest 2 esimest on positiivsetes DE regioonides ning 2 teist negatiivsetes DE regioonides. Lisatud on ka teadaolevad või sarnaste motiividega geeninimed ning E-väärtus, mis näitab, tulemuse statistilist olulisust.

Grupp	Motiiv	E-väärtus	Teadaolevad või sarnased motiivid
patsiendid vs kontrollid		7,5e-064	IRF1 ANDR STAT2
stimuleeritud vs mitte-stimuleeritud		1,6e-017	IKZF1
IFN-α kõrge vs madal kontsentratsioon		1,1e-062	PRDM6 NFATC1 FOXJ3

2.4 Arutelu

Süsteemne erütematoosne luupus on heterogeenne haigus, mille puhul võib aktiivsus olla varieeruv ning ka haiguse kulg ettearvamatu. Varasemalt on näidatud, et haigus jaguneb mitmeks endotüübiks, millest mõned on rohkem ja mõned vähem seotud I tüüpi interferoonidega (Banchereau et al., 2016; Nehar-Belaid et al., 2020). Selline suur varieeruvus ning erinev olemus patsientide vahel võib olla põhjuseks, miks kliinilised uuringud ebaõnnestuvad ning tänaseni on meil vaid üks otsene ravim SEL-i jaoks.

Kuigi SEL-i patogeneesis osalevad mitmed immuunrakud, on monotsüütidel oluline roll põletikumehhanismide võimendamisel, kuid epigeneetilisi muutusi nendes rakkudes pole seoses luupusega veel uuritud (Luo et al., 2022). Teiste põletikuliste haiguste puhul on kirjanduses küll viiteid „treenitud immuunsuse“ olulisusest põletiku käiguhoidmisel. Näiteks on H3K27ac muster psoriaasi patsientidel ja tervete kontrollide nahaproovides erinev ning kõige üleekspresseritumatel geenidel psoriaasis on H3K27ac rikastus (Masalha et al., 2021). Histooni modifikatsioon H3K27ac on tugevalt seotud avatud kromatiiniga ning tavaliselt märgistab nii enhanser- kui ka TSS alasid (Creyghton et al., 2010). Seetõttu pakub H3K27ac kõrget huvi ka SEL-i patogeneesis.

SEL patsientide ja kontrollide monotsüütide võrdluses leiti kokku 6011 H3K27ac suhtes erinevalt rikastunud regiooni, millest 4788 olid positiivselt ning 1223 negatiivselt rikastunud. DE regioonid selles grupis olid seotud interferoonide tootmise regulatsiooniga, millega omakorda olid seotud samades regioonides tuvastatud IFN signaalirajas osalevate transkriptsioonifaktorite IRF1 ja STAT2 seondumismotiivid. Varasemad uuringud on näidanud IRF1 rikastust SEL-patsientide monotsüütide kromatiinil ning sellega seotud muutusi epigenoomil (Zhang et al., 2015). DE regioonide võrdlemine tuvastas veel mitmeid omavahel seotud erinevusi bioloogilistes protsessides nagu näiteks Tolli-laadsete retseptorite regulatsiooni, p38MAPK kaskaadi, lämmastikoksiidi biosünteesiliste ja hapniku vabade radikaalidega seotud protsesside regulatsiooni. Need kõik on SEL-i kontekstis olulised protsessid. Hiire mudelis on varasemalt näidatud, et p38 MAPK kaskaadi inhibeerimine võib aidata SEL-i sümptomeid leevendada (Jin et al., 2011). Samuti on teada, et IFN-I stimuleerivad arginiinist sõltuvat lämmastikoksiidi tootmist ning soodustavad oksüdatiivset stressi (Fritsch ja Weichhart, 2016). Tuvastatud seondumismotiividest pakub huvi veel *ANDR* geen, mis kodeerib androgeeni retseptorit (*androgen receptor*, AR). On palju spekuleeritud selle üle, miks SEL

mõjutab põhiliselt naisi ning üks potentsiaalsetest selgitustest on just hormoonidega seotud muutused. Varasemalt on näidatud, et AR blokeerimine võib aidata alandada põletikku ning aidata kaasa M2 makrofaagide polarisatsioonile müokardiidi *in vitro* mudelis (Ma et al., 2019). Lisaks on uuritud ka androgeeni retseptori polümorfisme ning leitud, et need võivad mõjutada SEL kulgu ning androgeeni tasemeid naistel (Robeva et al., 2013). SEL patsientide vs kontrollide monotsüütidele sooritati ka peakomponentanalüüs. Kuigi graafikul ei ole proovid nii selgelt grupeerunud, võib siiski ka seal mõningast segregeerumist märgata. Peakomponentanalüüs leiab sarnased omadused, mille alusel näidatakse jaotuvust nii, et sarnasemad proovid grupeeruvad kokku. Tõenäoliselt mõjutab patsientide-kontrollide võrdlemisel mitte nii selget grupeerumist nii suur valim kui ka fakt, et vaadati vaid monotsüüte, mis on üksteisele sarnased.

Järgnevalt vaadeldi *in vitro* IFN- α -ga stimuleeritud rakke võrreldes mittestimuleeritud rakkudega, mille puhul leiti 531 erinevalt rikastunud regiooni. Leiti, et need regioonid on seotud näiteks JAK-STAT signaalirajaga ning samuti vereloome ning vererakkude diferentseerumise regulatsiooniga, mis samuti seostub monotsüütide, interferoonide ning SEL-iga. Motiivide uuringust tuvastati Ikarose (*IKZF1*) seondumismotiiv. See on tuntud B rakkude diferentseerumises olulise transkriptsioonifaktorina, kuid omab vähem tuntud rolli ka müeloidsete rakkude diferentseerumises (Boutboul et al., 2018). Ka on märgitud selle geeni olulisust IFN-I tootmises ning samuti on täheldatud selle geeni variantide seotust SEL-iga (Graham et al., 2011). Ka *in vitro* IFN- α -ga stimuleeritud vs stimuleerimata monotsüütidele sooritati peakomponentanalüüs. Siin oli näha selget jaotumist stimuleerimata ja stimuleeritud rakkude vahel.

Viimasena vaadeldi erinevalt rikastunud regioonide bioloogilisi protsesse SEL patsientide IFN- α kõrge kontsentratsiooniga grupis võrreldes madala grupiga. Leiti 8832 erinevalt rikastunud regiooni. Tuvastati, et need regioonid on seotud näiteks vere tüvi- ning eellasrakkude diferentseerumise regulatsiooniga, polüamiinide biosünteesiliste ja metaboolsete protsesside ning mitokondriaalse translatsiooniga seotud protsessidega. Kim et al. leidsid oma töös, et SEL-i patsientidel olid märgatavalt vähenenud 4 polüamiini tasemed: N¹-atsetüülkadaveriin, spermidiin, N¹-atsetüülspermidiin ning spermiin. Töös toodi välja, et nende polüamiinide alanenud tasemed on seotud nende ära kasutamisega põletikulistes protsessides või panustavad SEL-i patogeneesimehhanismidesse. Samuti leiti, et mitmete polüamiinide tasemed olid korrelatsioonis haiguse aktiivsuse markeritega (Kim et al., 2018). Lisaks on varasemalt

näidatud, et IFN- α vahendab mtDNA akumulatsiooni SEL-i monotsüütides, mis väldib autofaagiat ning käitub kui autonoomne DAMP. Sellele järgnev äratundmine viib STING raja aktiveerumisele, mis omakorda indutseerib tugevnenud MHCII ja CD86 ekspressiooni ning tsütokiinide TNF- α ja IL-6 sekretsiooni, mis viib autoimmuunsusele oma DNA vastu ning soodustab autoreaktiivsete lümfotsüütide klonaalset paljunemist (Gkirtzimanaki et al., 2018). See demonstreerib järjekordselt IFN- α rolli ning potentsiaali ühe võimaliku kandidaadina ravis, kuid see nõuab patsientide kategoriseerimist kõrge IFN- α aktiivsusega gruppidesse, et sihtida just IFN- α -st põhjustatud muutusi. See omakorda näitlikustab SEL-i heterogeensust ning patsientide subgruppidesse jagamise olulisust. Seondumismotiivide uurimisel olid huvipakkuvad geenid *NFATC1* ning *PRDM6*. *NFATC1* on olulise tähtsusega T-rakkude aktivatsioonis ning varasemalt on näidatud, et SEL patsiendid mobiliseerivad seda kiiremini kui terved kontrollid (Kytтарыs et al., 2011). On teada, et ka klassikalised ning mitteklassikalised monotsüüdid ekspresseerivad *NFATC1*¹³. *PRDM6* on teadaolev epigeneetiline modifikaator, kuid vajaks edasist uurimist, et leida seos süsteemse erütematoosse luupusega.

Edasi minnes tuleks kindlasti analüüsidesse rohkem haarata kliinilist informatsiooni ning grupeerida patsiente haiguse fenotüübi alusel, kuna SEL on niivõrd heterogeenne haigus, mille raviviis ja tulemused sõltuvad patsiendi iseärasustest. Samuti tuleks järgmisena sooritada analüüs ka H3K4me3 histooni modifikatsiooni andmetega. Kindlasti on oluline uurida ka histooni modifikatsioonide seost ja korrelatsiooni geeniekspressiooni andmetega, pöörates erilist tähelepanu erinevate kontsentratsioonidega IFN- α gruppidele. Töö puudusena võiks välja tuua vaid ühe ajapunkti uurimise. Banchereau et al., on oma töös välja toonud, et haiguse uurimisel on väga oluline vaadelda erinevaid ajapunkte koos haiguse aktiivsuse (SLEDAI skoori) ära märkimisega, sest ühe ajapunkti uurimine ei pruugi anda terviklikku pilti, eriti kui ühel ajapunktil on patsiendid parajasti remissiooni faasis (Banchereau et al., 2017). Patsientide erinevate ajapunktide analüüs ning kliinilise informatsiooni kaasamine koos geeniekspressiooni analüüsiga oleks edasise uurimise jaoks kõige perspektiivikam variant.

KOKKUVÕTE

IFN- α rolli SEL-i patogeneesis on palju uuritud, kuid epigeneetilistele muutustele monotsüütides ei ole eriti keskendutud. Seevastu on teada, et just monotsüütidele mõjub IFN- α vererakkudest kõige tugevamini. Seetõttu oligi selle töö eesmärgiks uurida epigeneetilisi muutusi just SEL patsientide monotsüütides ning mõista IFN- α rolli SEL patogeneesis, stimuleerides *in vitro* tervete isikute monotsüüte. Selleks kasutati ChIPseq meetodit – sekveneeriti kromatiini regioonid, mis olid seotud aktiivsele kromatiinile iseloomulike histooni modifikatsioonidega H3K4me3 ja H3K27ac. Bioinformaatiline analüüs teostati H3K27ac antikeha abil immuunsadestatud regioonidega.

Tulemustes keskenduti kolmele võrdlusele: patsiendid vs kontrollid, *in vitro* IFN- α -ga stimuleeritud vs mittestimuleeritud monotsüüdid ning patsientide IFN- α kõrge vs madala kontsentratsiooniga grupp. Uurides gruppide vahelisi erinevalt rikastunud regioone, leiti seoseid erinevate bioloogiliste protsessidega. Patsientide vs kontrollide monotsüütides erinevalt rikastunud regioonid olid eelkõige seotud põletikuga: Tolli-laadsete retseptorite regulatsiooni, p38MAPK kaskaadi, lämmastikoksiidi biosünteesiliste ja hapniku vabade radikaalidega seotud protsessidega. Neid protsesse võivad vahendada transkriptsioonifaktorid *IRF1*, *ANDR* ja *STAT2*, mille seondumismotiivid olid vastavates regioonides ülesindatud. IFN- α -ga stimuleeritud vs mittestimuleeritud monotsüütides olid H3K27ac seondumissaidid erinevalt rikastunud JAK-STAT signaaliraja geenidel ning samuti vereloome ning vererakkude diferentseerumise regulatsiooniga seotud geenidel. TF seondumismotiivide uurimine viitas *IKZF1* geenile, mida on ka varasemates töodes IFN-I ja SEL-iga seostatud. Kui patsientide monotsüüdid jagati seerumi IFN- α kontsentratsiooni järgi gruppidesse (kõrge > 100 fg/ml, madal < 100 fg/ml) ja tehti monotsüütide DE regioonide analüüs, siis leiti seoseid vere tüvi- ning eellasrakkude diferentseerumise regulatsiooni, polüamiinide biosünteesiliste ja metaboolsete protsesside ning mitokondriaalse translatsiooniga, mida on samuti seostatud IFN-I toimetega. Transkriptsioonifaktorite uurimisel leiti sarnaseid motiive geenide *PRDM6*, *FOXJ3* ning *NFATC1*-ga.

On selge, et nii SEL-i patsientides kui IFN- α -ga stimuleeritud tervete isikute monotsüütides tekivad epigeneetilised muutused. IFN- α sihtmärgina kasutamine SEL-i ravis on potentsiaalne väljavaade, kuid see nõuab haiguse endotüübi kindlaksmääramist. Seetõttu on oluline arvestada patsientide vaheliste erinevustega ning võtta arvesse kliinilisi andmeid.

Epigenetic changes in monocytes due to systemic lupus erythematosus

Katrina Ahun

SUMMARY

Epigenetics is the study of mitotically and meiotically inherited gene expression changes without altering DNA sequence. As methods improve, researching epigenetic changes in the context of autoimmune diseases is becoming more and more important. It is known that epigenetics plays a large role in the immune cells of SLE. Immune cells are known for their cytokine producing ability, which harbours many defensive mechanisms. However, excessive cytokine production can be damaging. It has been noted, that SLE patients have higher levels of IFN- α and that out of all immune cells, monocytes are most affected by it. There are many types of epigenetic changes, including histone modifications. Histone modifications are one of the factors that determine the availability of DNA. That makes histone modifications a compelling target for studying, understanding, and treating SLE. Because of SLE's heterogeneity, finding new disease markers is of utmost importance.

The objective of this thesis was to determine whether there are epigenetic changes between the monocytes of SLE patients and healthy controls and to study the effects of IFN- α on healthy monocytes.

This study focused on three comparisons: 1) SLE patients vs controls; 2) *in vitro* IFN- α stimulated monocytes vs *in vitro* not stimulated monocytes; 3) patients divided to two groups by their serum IFN- α concentration. All studied comparisons showed many differentially enriched (DE) regions. When looking at the biological processes that were associated with the DE regions, it was found that patients vs control monocytes' DE regions were affiliated mostly with inflammation: TLR regulation, p38MAPK cascade, NO biosynthetic and oxidative stress processes. These processes might be mediated by transcription factors *IRF1*, *ANDR* and *STAT2*, binding motives of which were upregulated in corresponding regions. Differentially enriched regions of H3K27ac binding sites between *in vitro* IFN- α stimulated and not stimulated monocytes showed connections with JAK-STAT signalling pathway and regulation of hemopoiesis and lymphocyte differentiation. TF binding motifs hinted at IFZF1 gene, that has been previously connected to SLE and IFN-I. When patients' monocytes were divided into two groups based on the patients' serum IFN- α concentrations (high > 100 fg/ml, low < 100 fg/ml) the DE regions revealed association with the regulation of blood stem and precursor cell

differentiation, polyamine biosynthetic and metabolic processes, and mitochondrial translation, all of which have been previously found to be linked to IFN-I. When looking at transcription factors, similar motifs were found with genes *PRDM6*, *FOXJ3* and *NFATC1*.

It was revealed that epigenetic changes do indeed take place in the monocytes of patients affected with SLE. The use of IFN- α as a target in the treatment of SLE is a potential outlook, but it requires establishing the endotype of the disease. That makes it important to consider the differences between patients and take into account the clinical data.

TÄNUSÕNAD

Suurimaid tänusõnu väärivad muidugi minu juhendajad Liis Haljasmägi ja Kai Kisand. Aitäh, Liis, et olid alati oma jõu ja nõuga olemas ning abistasid mind absoluutselt iga murega igal ajal. Aitäh, Kai, et andsid alati parimat nõu oma lõputust teadmistepagasist. Tänan ka kogu oma uurimisrühma, töökaaslasi ning perekonda ja lähedasi nende vankumatu toetuse eest.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Alaskhar Alhamwe, B., Khalaila, R., Wolf, J., ... Potaczek, D. P. (2018). Histone modifications and their role in epigenetics of atopy and allergic diseases. *Allergy, Asthma, and Clinical Immunology: Official Journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology*, 14(1): 39.
- Arnaud, L., Fagot, J. P., Mathian, A., Paita, M., Fagot-Campagna, A., & Amoura, Z. (2014). Prevalence and incidence of systemic lupus erythematosus in France: a 2010 nation-wide population-based study. *Autoimmun. Rev.*, 13(11): 1082–1089.
- Banchereau, R., Cepika, A. M., Banchereau, J., & Pascual, V. (2017). Understanding Human Autoimmunity and Autoinflammation Through Transcriptomics. *Annual Review of Immunology*, 35: 337.
- Banchereau, R., Hong, S., Cantarel, B., ... Pascual, V. (2016). Personalized Immunomonitoring Uncovers Molecular Networks that Stratify Lupus Patients. *Cell*, 165(3): 551–565.
- Bannister, A. J., & Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Research*, 21(3): 381–395.
- Barber, M. R. W., Drenkard, C., Falasinnu, T., ... Ramsey-Goldman, R. (2021). Global epidemiology of systemic lupus erythematosus. *Nature Reviews Rheumatology*, 7(9): 515–532.
- Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., ... Zhao, K. (2007). High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell*, 129(4): 823–837.
- Bednar, J., Garcia-Saez, I., Boopathi, R., ... Dimitrov, S. (2017). Structure and Dynamics of a 197 bp Nucleosome in Complex with Linker Histone H1. *Molecular Cell*, 66(3): 384-397.
- Blanco, P., Palucka, A. K., Gill, M., Pascual, V., & Banchereau, J. (2001). Induction of dendritic cell differentiation by IFN- α in systemic lupus erythematosus. *Science (New York, N.Y.)*, 294(5546): 1540–1543.
- Bombardier, C., Gladman, D. D., Urowitz, M. B., ... Schur, P. H. (1992). Derivation of the sledai. A disease activity index for lupus patients. *Arthritis & Rheumatism*, 35(6): 630–640.
- Bonanni, V., Sciumè, G., Santoni, A., & Bernardini, G. (2019). Bone marrow NK cells: Origin, distinctive features, and requirements for tissue localization. *Frontiers in Immunology*, 10: 1569.
- Bonilla, F. A., & Oettgen, H. C. (2010). Adaptive immunity. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125.

- Boutboul, D., Kuehn, H. S., Van De Wyngaert, Z., ... Rosenzweig, S. D. (2018). Dominant-negative IKZF1 mutations cause a T, B, and myeloid cell combined immunodeficiency. *The Journal of Clinical Investigation*, 128(7): 3071–3087.
- Cao, J., & Yan, Q. (2012). Histone ubiquitination and deubiquitination in transcription, DNA damage response, and cancer. *Frontiers in Oncology*, 2.
- Cho, J. H., & Feldman, M. (2015). Heterogeneity of autoimmune diseases: pathophysiologic insights from genetics and implications for new therapies. *Nature Medicine*, 21(7): 730.
- Clayton, A. L., Rose, S., Barratt, M. J., & Mahadevan, L. C. (2000). Phosphoacetylation of histone H3 on c-fos- and c-jun-associated nucleosomes upon gene activation. *The EMBO Journal*, 19(14): 3714.
- Cojocaru, M., Cojocaru, I. M., Silosi, I., & Doina Vrabie, C. (2011). Manifestations of Systemic Lupus Erythematosus. *Mædica*, 6(4): 330.
- Collas, P., & Dahl, J. A. (2008). Chop it, ChIP it, check it: The current status of chromatin immunoprecipitation. *Frontiers in Bioscience*, 13(3): 929–943.
- Creyghton, M. P., Cheng, A. W., Welstead, G. G., ... Jaenisch, R. (2010). Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(50): 21931–21936.
- Daskalaki, M. G., Tsatsanis, C., & Kampranis, S. C. (2018). Histone methylation and acetylation in macrophages as a mechanism for regulation of inflammatory responses. *Journal of Cellular Physiology*, 233(9): 6495–6507.
- Deng, G., Chen, A., Pong, E., & Kim, Y. S. (2001). Methylation in hMLH1 promoter interferes with its binding to transcription factor CBF and inhibits gene expression. *Oncogene*, 20(48): 7120–7127.
- Dimitrova, E., Turberfield, A. H., & Klose, R. J. (2015). “Histones and Chromatin” Review Series: Histone demethylases in chromatin biology and beyond. *EMBO Reports*, 16(12): 1620.
- Dubey, A. K., Handu, S. S., Dubey, S., Sharma, P., Sharma, K. K., & Ahmed, Q. M. (2011). Belimumab: First targeted biological treatment for systemic lupus erythematosus. *Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics*, 2(4): 317.
- Eaton, W. W., Rose, N. R., Kalaydjian, A., Pedersen, M. G., & Mortensen, P. B. (2007). Epidemiology of autoimmune diseases in Denmark. *Journal of Autoimmunity*, 29(1): 1–9.
- Fairweather, D., Frisancho-Kiss, S., & Rose, N. R. (2008). Sex Differences in Autoimmune

- Disease from a Pathological Perspective. *The American Journal of Pathology*, 173(3): 600.
- Fernandez, D., & Kirou, K. A. (2016). What causes lupus flares? *Current Rheumatology Reports*, 18(3): 1–10.
- Fritsch, S. D., & Weichhart, T. (2016). Effects of interferons and viruses on metabolism. *Frontiers in Immunology*, 7: 630.
- Furey, T. S. (2012). ChIP–seq and beyond: new and improved methodologies to detect and characterize protein–DNA interactions. *Nature Reviews Genetics* 2012 13:12, 13(12): 840–852.
- Galli, S. J., & Tsai, M. (2012). IgE and mast cells in allergic disease. *Nature Medicine*, 18(5): 693–704.
- Gkirtzimanaki, K., Kabrani, E., Nikoleri, D., ... Verginis, P. (2018). IFN α Impairs Autophagic Degradation of mtDNA Promoting Autoreactivity of SLE Monocytes in a STING-Dependent Fashion. *Cell Reports*, 25(4): 921-933.
- Gladstone, D. E., Prestrud, A. A., Pradhan, A., ... Brodsky, I. (2002). High-dose cyclophosphamide for severe systemic lupus erythematosus. *Lupus*, 11(7): 405–410.
- Goodrich, J. A., & Kugel, J. F. (2006). Non-coding-RNA regulators of RNA polymerase II transcription. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2006 7:8, 7(8): 612–616.
- Gordon, S. (2002). Pattern Recognition Receptors: Doubling Up for the Innate Immune Response. *Cell*, 111(7): 927–930.
- Graham, D. S., Morris, D. L., Bhangale, T. R., ... Vyse, T. J. (2011). Association of NCF2, IKZF1, IRF8, IFIH1, and TYK2 with Systemic Lupus Erythematosus. *PLOS Genetics*, 7(10).
- Grant, P. A., Eberharter, A., John, S., Cook, R. G., Turner, B. M., & Workman, J. L. (1999). Expanded lysine acetylation specificity of Gcn5 in native complexes. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(9): 5895–5900.
- Guilliams, M., Dutertre, C. A., Scott, C. L., ... Ginhoux, F. (2016). Unsupervised High-Dimensional Analysis Aligns Dendritic Cells across Tissues and Species. *Immunity*, 45(3): 669.
- Hampson, P., Dinsdale, R. J., Wearn, C. M., ... Lord, J. M. (2017). Neutrophil Dysfunction, Immature Granulocytes, and Cell-free DNA are Early Biomarkers of Sepsis in Burn-injured Patients: A Prospective Observational Cohort Study. *Annals of Surgery*, 265(6): 1241–1249.
- Han, S., Zhuang, H., Lee, P. Y., Li, M., Yang, L., Nigrovic, P. A., & Reeves, W. H. (2020). Differential responsiveness of monocyte and macrophage subsets to interferon. *Arthritis*

- & *Rheumatology*, 72(1): 100.
- Huen, S. C., & Cantley, L. G. (2017). Macrophages in Renal Injury and Repair. *Annu Rev Physiol.*, 79: 449–469.
- Icen, M., Nicola, P. J., Maradit-Kremers, H., Crowson, C. S., Therneau, T. M., Matteson, E. L., & Gabriel, S. E. (2009). Systemic Lupus Erythematosus Features in Rheumatoid Arthritis and Their Impact on Overall Mortality. *The Journal of Rheumatology*, 36(1): 50.
- Ivashkiv, L. B., & Donlin, L. T. (2014, January 23). Regulation of type I interferon responses. *Nature Reviews Immunology*, 14: 36–49.
- Iwasaki, A., & Medzhitov, R. (2004). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nature Immunology*, 5(10): 987–995.
- Jacobson, D. L., Gange, S. J., Rose, N. R., & Graham, N. M. H. (1997). Epidemiology and estimated population burden of selected autoimmune diseases in the United States. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 84(3): 223–243.
- Jego, G., Palucka, A. K., Blanck, J. P., Chalouni, C., Pascual, V., & Banchereau, J. (2003). Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. *Immunity*, 19(2): 225–234.
- Jeng, M. Y., Mumbach, M. R., Granja, J. M., Satpathy, A. T., Chang, H. Y., & Chang, A. L. S. (2019). Enhancer Connectome Nominates Target Genes of Inherited Risk Variants from Inflammatory Skin Disorders. *Journal of Investigative Dermatology*, 139(3): 605–614.
- Jiménez-Dalmaroni, M. J., Radcliffe, C. M., Harvey, D. J., ... Wilson, I. A. (2015). Soluble human TLR2 ectodomain binds diacylglycerol from microbial lipopeptides and glycolipids. *Innate Immunity*, 21(2): 175.
- Jin, N., Wang, Q., Zhang, X., Jiang, D., Cheng, H., & Zhu, K. (2011). The selective p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor, SB203580, improves renal disease in MRL/lpr mouse model of systemic lupus. *International Immunopharmacology*, 11(9): 1319–1326.
- Joo, H. M., Coquery, C., Xue, Y., ... Oh, S. K. (2012). Serum from patients with SLE instructs monocytes to promote IgG and IgA plasmablast differentiation. *The Journal of Experimental Medicine*, 209(7): 1335.
- Kaul, A., Gordon, C., Crow, M. K., ... Hughes, G. (2016). Systemic lupus erythematosus. *Nature Reviews. Disease Primers*, 2.
- Kawasaki, T., & Kawai, T. (2014). Toll-like receptor signaling pathways. *Frontiers in Immunology*, 5: 461.
- Kim, H. A., Lee, H. S., Shin, T. H., ... Suh, C. H. (2018). Polyamine patterns in plasma of patients with systemic lupus erythematosus and fever. *Lupus*, 27(6): 930–938.

- Kopitar-Jerala, N. (2017). The role of interferons in inflammation and inflammasome activation. *Frontiers in Immunology*, 8: 873.
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin Modifications and Their Function. *Cell*, 128(4), 693–705.
- Kyogoku, C., Smiljanovic, B., Grün, J. R., ... Grützkau, A. (2013). Cell-specific type I IFN signatures in autoimmunity and viral infection: What makes the difference? *PLoS ONE*, 8(12).
- Kyttaris, V. C., Zhang, Z., Kampagianni, O., & Tsokos, G. C. (2011). Calcium signaling in systemic lupus erythematosus T cells: a treatment target. *Arthritis and Rheumatism*, 63(7): 2058.
- Landt, S. G., Marinov, G. K., Kundaje, A., ... Snyder, M. (2012). ChIP-seq guidelines and practices of the ENCODE and modENCODE consortia. *Genome Research*, 22(9): 1813.
- Levin, R., Grinstein, S., & Canton, J. (2016). The life cycle of phagosomes: formation, maturation, and resolution. *Immunological Reviews*, 273(1): 156–179.
- Liu, W., Zhang, Y., Zhu, W., Ma, C., Ruan, J., Long, H., & Wang, Y. (2018). Sinomenine Inhibits the Progression of Rheumatoid Arthritis by Regulating the Secretion of Inflammatory Cytokines and Monocyte/Macrophage Subsets. *Frontiers in Immunology*, 9.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2^{-C_T} Method. *METHODS*, 25: 402–408.
- Luger, K., Mäder, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F., & Richmond, T. J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, 389(6648): 251–260.
- Lukhele, S., Boukhaled, G. M., & Brooks, D. G. (2019). Type I interferon signaling, regulation and gene stimulation in chronic virus infection. *Seminars in Immunology*, 43, 101277.
- Luo, S., Wu, R., Li, Q., & Zhang, G. (2022). Epigenetic Regulation of IFI44L Expression in Monocytes Affects the Functions of Monocyte-Derived Dendritic Cells in Systemic Lupus Erythematosus. *Journal of Immunology Research*, 2022, 1–12.
- Ma, W., Zhang, J., Guo, L., ... Wei, F. (2019). Suppressed androgen receptor expression promotes M2 macrophage reprogramming through the STAT3/SOCS3 pathway. *EXCLI Journal*, 18: 21.
- Maidhof, W., & Hilas, O. (2012). Lupus: An Overview of the Disease And Management Options. *Pharmacy and Therapeutics*, 37(4): 240.
- Masalha, M., Ben-Dov, I. Z., Ram, O., ... Avni, D. (2021). H3K27Ac modification and gene expression in psoriasis. *Journal of Dermatological Science*, 103(2): 93–100.
- Masters, S. L., Simon, A., Aksentijevich, I., & Kastner, D. L. (2009). Horror

- Autoinflammaticus: The Molecular Pathophysiology of Autoinflammatory Disease. *Annual Review of Immunology*, 27: 621.
- Mattiroli, F., & Penengo, L. (2021). Histone Ubiquitination: An Integrative Signaling Platform in Genome Stability. *Trends in Genetics*, 37(6): 566–581.
- Medzhitov, R. (2007). Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*, 449(7164): 819–826.
- Medzhitov, R., & Janeway, C. A. (1997). Innate Immunity: The Virtues of a Nonclonal System of Recognition. *Cell*, 91(3): 295–298.
- Mukai, K., Tsai, M., Starkl, P., Marichal, T., & Galli, S. J. (2016). IgE and mast cells in host defense against parasites and venoms. *Seminars in Immunopathology*, 38(5): 581–603.
- Nagai, Y., Akashi, S., Nagafuku, M., ... Miyake, K. (2002). Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nature Immunology*, 3(7): 667–672.
- Nehar-Belaid, D., Hong, S., Marches, R., ... Banchereau, J. F. (2020). Mapping Systemic Lupus Erythematosus heterogeneity at the single-cell level. *Nature Immunology*, 21(9): 1094.
- Netea, M. G., Quintin, J., & Van Der Meer, J. W. M. (2011). Trained Immunity: A Memory for Innate Host Defense. *Cell Host & Microbe*, 9(5): 355–361.
- Niewold, T. B., & Swedler, W. I. (2005). Systemic lupus erythematosus arising during interferon-alpha therapy for cryoglobulinemic vasculitis associated with hepatitis C. *Clinical Rheumatology*, 24(2): 178–181.
- Nishioka, K., Chuikov, S., Sarma, K., Erdjument-Bromage, H., Allis, C. D., Tempst, P., & Reinberg, D. (2002). Set9, a novel histone H3 methyltransferase that facilitates transcription by precluding histone tail modifications required for heterochromatin formation. *Genes & Development*, 16(4): 479.
- Ożańska, A., Szymczak, D., & Rybka, J. (2020). Pattern of human monocyte subpopulations in health and disease. *Scandinavian Journal of Immunology*, 92(1): e12883.
- Paredes, J. L., & Niewold, T. B. (2020). Type I interferon antagonists in clinical development for lupus. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 29(9): 1025.
- Park, P. J. (2009). ChIP-seq: advantages and challenges of a maturing technology. *Nature Reviews Genetics* 2009 10:10, 10(10): 669–680.
- Perez, R. K., Gordon, M. G., Subramaniam, M., ... Ye, C. J. (2022). Single-cell RNA-seq reveals cell type-specific molecular and genetic associations to lupus. *Science*, 376(6589): eabf1970.
- Petracovici, A., & Bonasio, R. (2021). Distinct PRC2 subunits regulate maintenance and

- establishment of Polycomb repression during differentiation. *Molecular Cell*, 81(12): 2625-2639.
- Platanias, L. C. (2005, May). Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nature Reviews Immunology*, 5: 375–386.
- Rees, F., Doherty, M., Grainge, M., Davenport, G., Lanyon, P., & Zhang, W. (2016). The incidence and prevalence of systemic lupus erythematosus in the UK, 1999–2012. *Ann. Rheum. Dis.*, 75(1): 136–141.
- Richmond, T. J., & Davey, C. A. (2003). The structure of DNA in the nucleosome core. *Nature*, 423(6936): 145–150.
- Robeva, R., Tanev, D., Andonova, S., ... Kolarov, Z. (2013). Androgen receptor (CAG)n polymorphism and androgen levels in women with systemic lupus erythematosus and healthy controls. *Rheumatology International*, 33(8): 2031–2038.
- Rönblom, L. E., Alm, G. V., & Öberg, K. E. (1990). Possible induction of systemic lupus erythematosus by interferon-alpha treatment in a patient with a malignant carcinoid tumour. *Journal of Internal Medicine*, 227(3): 207–210.
- Rönblom, L., & Leonard, D. (2019). Interferon pathway in SLE: one key to unlocking the mystery of the disease. *Lupus Science & Medicine*, 6(1): e000270.
- Saeed, S., Quintin, J., Kerstens, H. H. D., ... Stunnenberg, H. G. (2014). Epigenetic programming during monocyte to macrophage differentiation and trained innate immunity. *Science*, 345(6204): 1251086.
- Santini, S. M., Pucchio, T. Di, Lapenta, C., Parlato, S., Logozzi, M., Belardelli, F., & Di Pucchio, T. (2003). A New Type I IFN-Mediated Pathway for the Rapid Differentiation of Monocytes into Highly Active Dendritic Cells. *Stem Cells*, 21(3): 357–362.
- Santos-Rosa, H., Schneider, R., Bannister, A. J., ... Kouzarides, T. (2002). Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature*, 419(6905): 407–411.
- Shamri, R., Xenakis, J. J., & Spencer, L. A. (2011). Eosinophils in innate immunity: an evolving story. *Cell and Tissue Research*, 343(1): 57.
- Smilek, D. E., Ehlers, M. R., & Nepom, G. T. (2014). Restoring the balance: immunotherapeutic combinations for autoimmune disease. *Disease Models & Mechanisms*, 7(5): 503–513.
- Solomon, M. J., & Varshavsky, A. (1985). Formaldehyde-mediated DNA-protein cross-linking: a probe for in vivo chromatin structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82(19): 6470–6474.
- Spencer, V. A., Sun, J. M., Li, L., & Davie, J. R. (2003). Chromatin immunoprecipitation: a

- tool for studying histone acetylation and transcription factor binding. *Methods*, 31(1): 67–75.
- Spiering, M. J. (2015). Primer on the Immune System. *Alcohol Research : Current Reviews*, 37(2): 171.
- Stark, G. R., & Darnell, J. E. (2012, April 20). The JAK-STAT Pathway at Twenty. *Immunity*, 36: 503–514.
- Strahl, B. D., & Allis, C. D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature*, 403(6765): 41–45.
- Struhl, K., & Segal, E. (2013). Determinants of nucleosome positioning. *Nature Structural & Molecular Biology*, 20(3): 267.
- Sun, J. C., Ugolini, S., & Vivier, E. (2014). Immunological memory within the innate immune system. *The EMBO Journal*, 33(12): 1295.
- Thatayatikom, A., & White, A. J. (2006). Rituximab: a promising therapy in systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity Reviews*, 5(1): 18–24.
- Theofilopoulos, A. N., Baccala, R., Beutler, B., & Kono, D. H. (2005). Type I interferons (alpha/beta) in immunity and autoimmunity. *Annual Review of Immunology*, 23: 307–336.
- Topham, N. J., & Hewitt, E. W. (2009). Natural killer cell cytotoxicity: how do they pull the trigger? *Immunology*, 128(1): 7.
- Tsang-A-Sjoe, M. W. P., & Bultink, I. E. M. (2021). New developments in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology*, 60: vi21–vi28.
- Tselios, K., Gladman, D. D., Touma, Z., Su, J., Anderson, N., & Urowitz, M. B. (2019). Disease course patterns in systemic lupus erythematosus. *Lupus*, 28: 114–122.
- Uematsu, S., & Akira, S. (2007). Toll-like Receptors and Type I Interferons. *Journal of Biological Chemistry*, 282(21): 15319–15323.
- Ugarte-Gil, M. F., Acevedo-Vásquez, E., Alarcón, G. S., ... Pons-Estel, B. A. (2015). The number of flares patients experience impacts on damage accrual in systemic lupus erythematosus: data from a multiethnic Latin American cohort. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 74(6): 1019–1023.
- Wang, H., Wang, L., Erdjument-Bromage, H., Vidal, M., Tempst, P., Jones, R. S., & Zhang, Y. (2004). Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. *Nature*, 431(7010): 873–878.
- Wong, K. L., Tai, J. J. Y., Wong, W. C., ... Wong, S. C. (2011). Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human

- monocyte subsets. *Blood*, 118(5).
- Wu, C. T., & Morris, J. R. (2001). Genes, genetics, and epigenetics: a correspondence. *Science* (New York, N.Y.), 293(5532): 1103–1105.
- Zanoni, I., Ostuni, R., Marek, L. R., ... Kagan, J. C. (2011). CD14 controls the LPS-induced endocytosis of Toll-like Receptor 4. *Cell*, 147(4): 868.
- Zhang, T., Cooper, S., & Brockdorff, N. (2015). The interplay of histone modifications – writers that read. *EMBO Reports*, 16(11): 1467.
- Zhang, Z., Shi, L., Dawany, N., Kelsen, J., Petri, M. A., & Sullivan, K. E. (2016). H3K4 trimethylation breadth at transcription start sites impacts the transcriptome of systemic lupus erythematosus. *Clinical Epigenetics*, 8(1): 1–13.
- Zhang, Z., Shi, L., Song, L., Ephrem, E., Petri, M., & Sullivan, K. E. (2015). IRF1 marks activated genes in SLE and can induce target gene expression. *Arthritis & Rheumatology* (Hoboken, N.J.), 67(3): 785.
- Zhang, Z., Shi, L., Song, L., Maurer, K., Petri, M. A., & Sullivan, K. E. (2018). Overall downregulation of mRNAs and enrichment of H3K4me3 change near genome-wide association study signals in systemic lupus erythematosus: Cell-specific effects. *Frontiers in Immunology*, 9.

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

- ¹ <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> (külastatud 29.04.22)
- ² http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/ (külastatud 29.04.22)
- ³ <http://www.nature.com/nmeth/journal/v9/n4/full/nmeth.1923.html> (külastatud 29.04.22)
- ⁴ <http://www.htslib.org/> (külastatud 29.04.22)
- ⁵ <https://github.com/taoliu/MACS/> (külastatud 29.04.22)
- ⁶ <http://hgdownload.cse.ucsc.edu/goldenPath/hg19/encodeDCC/wgEncodeMapability/wgEncodeDacMapabilityConsensusExcludable.bed.gz> (külastatud 29.04.22)
- ⁷ <http://great.stanford.edu/public/html/> (külastatud 15.05.22)
- ⁸ <http://meme-suite.org/tools/meme-chip/> (külastatud 16.05.22)
- ⁹ https://egg2.wustl.edu/roadmap/web_portal/chr_state_learning.html (külastatud 29.04.22)
- ¹⁰ <https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/DiffBind.html> (külastatud 29.04.22)
- ¹¹ <http://www.nature.com/nbt/journal/v29/n1/abs/nbt.1754.html> (külastatud 15.05.22)
- ¹² <http://geneontology.org> (külastatud 16.05.22)
- ¹³ <https://dice-database.org/genes/NFATC1> (külastatud 27.05.22)

LISAD

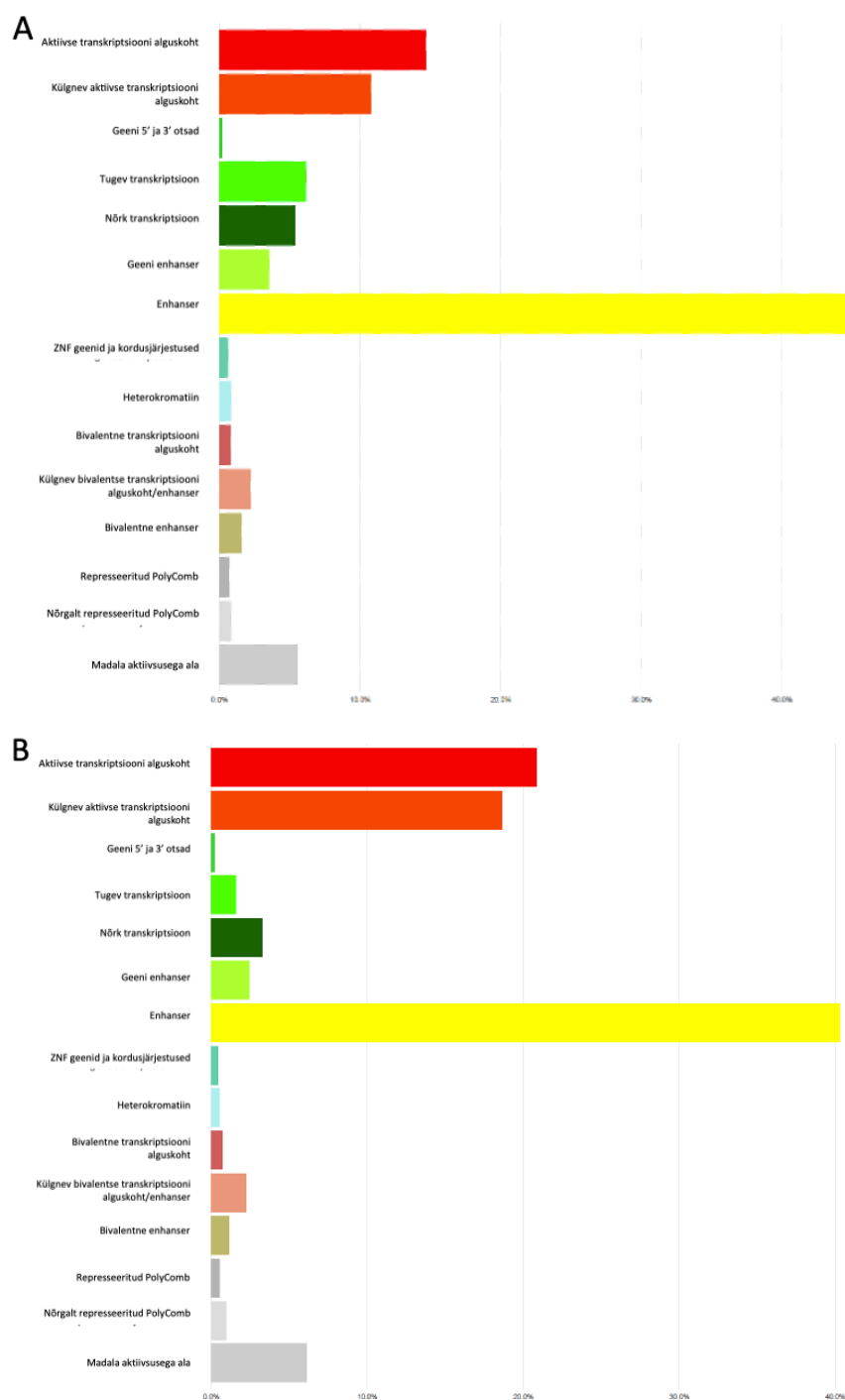
Lisa 1. SEL patsientide iseloomustus. Tabelis on toodud SEL patsientide koodid, vanused, sugu, IFN- α kontsentratsioon (fg/ml) ning SLEDAI skoor.

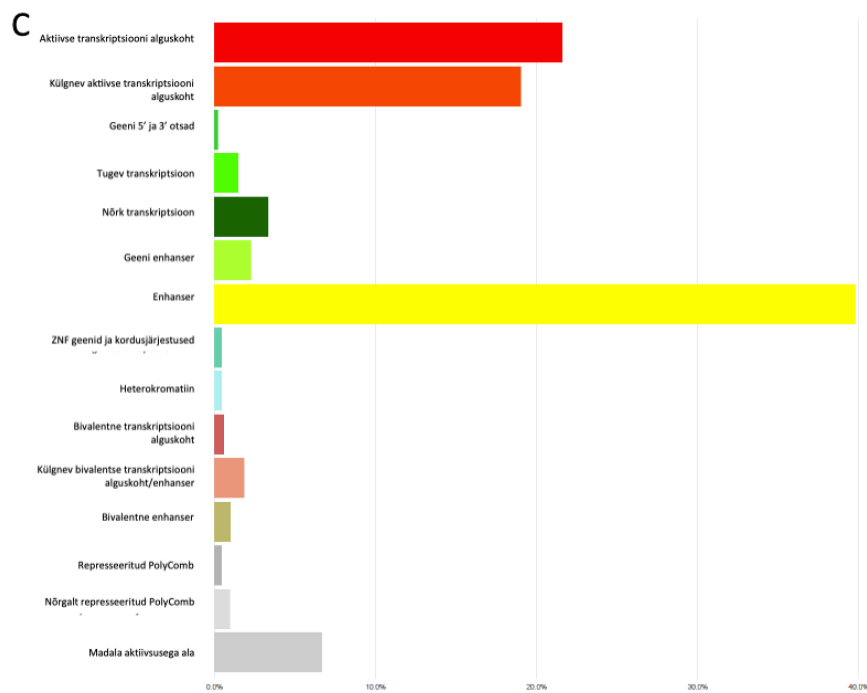
SEL patsient	Vanus	Sugu	IFN- α kontsentratsioon (fg/ml)	SLEDAI skoor
SLE 07	53	N	0,13	8
SLE 08	51	N	591,52	6
SLE 09	54	N	4,34	6
SLE 10	51	N	38,67	8
SLE 11	42	N	22,00	6
SLE 12	49	N	440,88	10
SLE 16	37	N	93,95	11
SLE 17	59	N	24,14	10
SLE 18	60	M	869,00	16
SLE 19	62	N	76,93	18
SLE 20	44	M	76,87	8
SLE 22	71	N	152,22	12
SLE 23	58	N	2369,58	8
SLE 24	29	N	432,07	11
SLE 25	42	N	0,40	8
SLE 26	69	N	0,42	5
SLE 27	76	N	7,31	6
SLE 28	45	N	8,80	13
SLE 29	59	N	1,85	13
SLE 30	56	N	162,18	6
SLE 31	65	N	43,31	6
SLE 32	47	M	297,38	17
SLE 36	45	N	6875,71	14
SLE 38	33	N	74,60	16

Lisa 2. Lugemite esmane analüüs. Tabelis on toodud iga uuritavate grupi (SEL patsiendid, kontrollid, *in vitro* IFN- α stimuleeritud ja *in vitro* mittestimuleeritud) monotsüütide ChIPi materjali sekventsides kohta genomile joondatud fragmentide, piikide ja filtreeritud piikide arvud: keskmine ja sulgudes standardhälve. ChIPseq eksperimentide puhul peetakse minimaalseks vajalikuks fragmentide arvuks proovi kohta 20 miljonit (Landt et al., 2012), seega on selles katses fragmente edasiseks analüüsiks piisavalt.

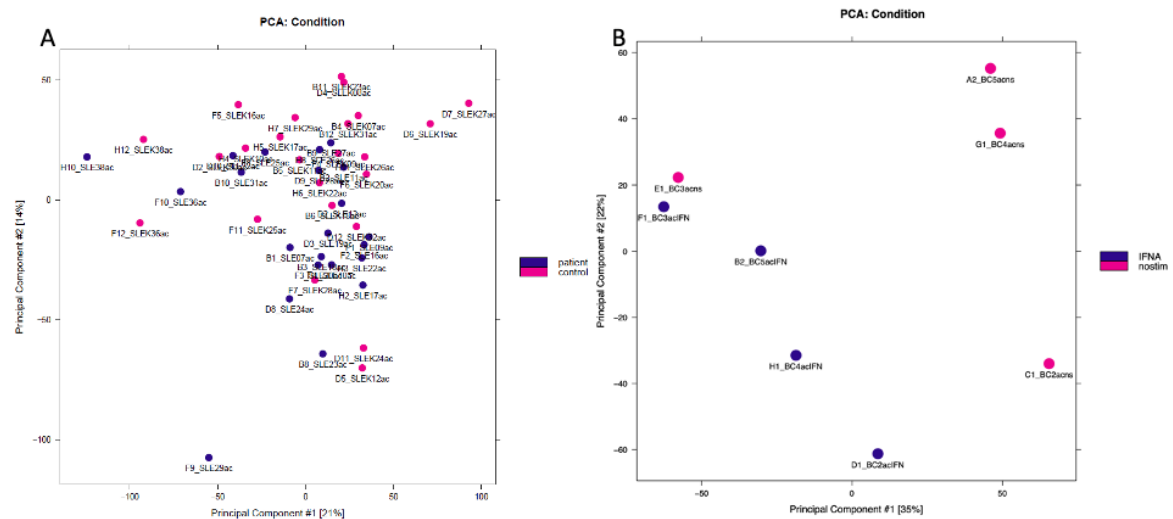
Grupi nimi	Genoomile joondatud fragmentide arv	Piigid	Filtreeritud piigid
Patsiendid	43126266 (9671321)	33000 (7134)	32972 (7136)
Kontrollid	36709845 (3955939)	29868 (3721)	29842 (3722)
<i>In vitro</i> IFN- α stimuleeritud	39818418 (3926359)	32172 (6413)	32147 (6414)
<i>In vitro</i> mittestimuleeritud	44152162 (8537251)	28888 (6186)	28865 (6185)

Lisa 3. Seondumiskohtade kattuvus genoomil. Joonisel on välja toodud kontrollide (A), *in vitro* kasvatatud IFN- α stimuleeritud (B) ja *in vitro* kasvatatud mittestimuleeritud (C) gruppide seondumiskohtade kattuvus genoomil. Seondumiskohtade ülegenoomilist kattuvust uuriti ChromHMM¹¹ andmebaasist pärit inimese monotsüütide andmestikuga *E124 Monocytes-CD14+ RO01746 Primary Cells*. Joonise y-teljel on toodud erinevad genoomi regioonid ning x-teljel seondumiskohtade kattuvus vastavate regioonidega protsentides.





Lisa 4. PCA joonis. Joonisel A on võrreldud SEL patsientide gruppi kontrollidega ning joonisel B on sama tehtud *in vitro* IFN- α stimuleeritud ja mittestimuleeritud rakkudega. PCA konstrueerib 2 peamist komponenti, mille alusel paigutab iga proovi joonisele.



LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Katrina Ahun,

(sünnikuupäev: 28.02.1998)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose, „Epigeneetilised muutused süsteemse erütematoosse luupusega patsientide monotsüütides“ mille juhendajad on Liis Haljasmägi ja Kai Kisand, reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Katrina Ahun

30.05.2022