

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
MEDITSIINITEADUSTE VALDKOND
BIO- JA SIIRDEMEDITSIINI INSTITUUT
MOLEKULAARPATOLOOGIA UURIMISGRUPP

**I tüüpi interferoonide vastaste autoantikehade ja süljenäärme
põletiku dünaamika kirjeldamine Aire-puudulikel rottidel**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Elise Helena Armulik

Juhendajad MSc Artur Stoljar

PhD Martti Laan

MSc Sulev Kuuse

TARTU 2022

INFOLEHT

I TÜÜPI INTERFEROONIDE VASTASTE AUTOANTIKEHADE JA SÜLJENÄÄRME PÕLETIKU DÜNAAMIKA KIRJELDAMINE AIRE-PUUDULIKEL ROTTIDEL

Autoimmuunne regulaator (AIRE) osaleb tsentraalse tolerantsuse kujunemisel ja takistab autoimmuunhaiguste teket. Funktsionaalse AIRE valgu puudus põhjustab inimestel autoimmuunset poliendokrinopaatia-kandidoos-ektodermaalset düstroofiat (APECED), mis on hea mudelhaigus tsentraalse tolerantsuse kujunemise ning selle häiretest tingitud autoimmuunsuse uurimiseks. APECED uurimiseks on loodud mitmeid loommudeleid, millest kõige informatiivsem on Aire-puudulik rotimudel. Käesolevas bakalaureusetöös uuriti süstemaatiliselt Aire-puuduliku rotimudeli abil I tüüpi interferoon alfa vastaste autoantikehade ja süljenäärme põletiku dünaamikat ajas ning nendevahelist seost. Töö oluliseim tulemus viitab anti-interferoon alfa autoantikehade kaitsvale toimele autoimmuunpõletiku vastu Aire-puudulikul rotil.

Märksõnad: AIRE, APECED, autoantikehad, I tüüpi interferoonid, põletik

CERCS: B500 Immunoloogia, seroloogia, transplantoloogia

THE DYNAMICS OF TYPE I INTERFERON AUTOANTIBODIES AND SALIVARY GLAND INFLAMMATION IN AIRE-DEFICIENT RATS

Autoimmune regulator (AIRE) takes part in the development of central tolerance and prevents autoimmunity. Lack of functional AIRE protein causes a very rare autosomal-recessive disorder in humans called autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy (APECED), which is a good model disease for studying the formation of central tolerance and the autoimmunity caused by its disruption. Several animal models have been created to study the disease, of which the most informative is the Aire-deficient rat model. The aim of this bachelor's thesis was to systematically study the dynamics of type I interferon alpha autoantibodies and of the salivary gland inflammation over time and their relation in Aire-deficient rats. The most notable result indicates that anti-interferon alpha autoantibodies have a protective function against autoimmune inflammation in Aire-deficient rats.

Keywords: AIRE, APECED, autoantibodies, type I interferons, inflammation

CERCS: B500 Immunology, serology, transplantation

SISUKORD

INFOLEHT.....	2
KASUTATUD LÜHENDID.....	5
SISSEJUHATUS.....	7
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	8
1.1. Omandatud immuunsus.....	8
1.2. Tsentraalne tolerantsus.....	9
1.3. AIRE ja APECED.....	10
1.4. Põletik ja autoimmuunhaiguste patogenees.....	12
1.5. Autoantikehad.....	13
1.5.1. Tsütokiinide vastased autoantikehad.....	14
1.5.2. APECED autoantikehad.....	14
1.6. Interferoonid.....	15
2. EKSPERIMENTAALOSA.....	17
2.1. Töö eesmärgid.....	17
2.2. Materjal ja meetodika.....	17
2.2.1. Katseloomad.....	17
2.2.2. Immunofluorestsentsmikroskoopia.....	17
2.2.3. Voolutsütomeetria.....	19
2.2.4. Lutsiferaasi immunopretsipitatsiooni süsteem.....	20
2.2.5. Statistika.....	21
2.3. Tulemused ja arutelu.....	21
2.3.1. Anti-IFN- α 4 ja anti-IFN- α 11 vastased autoantikehad tekivad Aire-KO rottidel 3–5 kuu vanuselt ja jõuavad maksimaalsele tasemele 9–12 kuu vanuselt.....	21
2.3.2. Anti-IFN- α 4 ja anti-IFN- α 11 vastaste autoantikehade tootmine on omavahel korrelatsioonis.....	23
2.3.3. 3–5 kuu vanustel rottidel infiltreeruvad immuunrakud süljenäärmesse ja hiljem infiltraadid taanduvad.....	24
2.3.4. 11 kuu vanuste Aire-KO rottide süljenäärmete lümfotsüütiline koostis.....	27
2.3.5. Süljenäärme põletiku ja autoantikehade tiitrite dünaamika on negatiivses korrelatsioonis.....	29
KOKKUVÕTE.....	31

SUMMARY.....	32
TÄNUSÕNAD.....	33
KASUTATUD ALLIKAD.....	34
Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks.....	42

KASUTATUD LÜHENDID

7-AAD – 7-amino-aktinomütsiin-D

aCA – tsütokiini vastased autoantikehad, *anti-cytokine autoantibodies*

AIRE – autoimmuunne regulaator, *autoimmune regulator*

APC – antigeeni esitav rakk, *antigen-presenting cell*

APECED – autoimmuunne polüendokrinopaatia-kandidoos-ektodermaalne düstroofia, *autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy*

APS-1 – 1. tüüpi autoimmuunne polüendokrinopaatia sündroom, *autoimmune polyglandular syndrome type 1*

BSA – veise seerumi albumiin, *bovine serum albumin*

CD – diferentseerumise klaster, *cluster of differentiation*

CMC – krooniline mukokutaanne kandidoos, *chronic mucocutaneous candidiasis*

cTEC – tüümuse koore epiteelirakk, *cortical thymic epithelial cell*

DAPI – 4',6-diamidiino-2-fenüülindool

DC – dendriitrakud, *dendritic cells*

DMEM – Dulbecco modifitseeritud Eagle'i sööde, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DN – topeltnegatiivne, *double negative*

DP – topeltpositiivne, *double positive*

FBS – veise loote seerum, *fetal bovine serum*

H&E – hematoksülin ja eosiin

HBSS – Hanki balansseeritud soolalahus, *Hank's balance salt solution*

HP – hüoparatüreoidism, *hypoparathyroidism*

IF – immunofluorestsentsmikroskoopia

IFN – interferoon

ISG – interferoonide stimuleeritud geenid, *interferon stimulated genes*

LIPS – lutsiferaasi immunopretsipitatsiooni süsteem, *luciferase immunoprecipitation system*

MHC – peamine koesobivuskompleks, *major histocompatibility complex*

mTEC – tüümuse säsi epiteelirakk, *medullary thymic epithelial cell*

NGS – tavaline kitse seerum, *normal goat serum*

PBMC – perifeerne vere mononukleaarne rakk, *peripheral blood mononuclear cell*

PBS – fosfaadiga puhverdatud soolalahus, *phosphate-buffered saline*

RB – jooksutamispuhver, *running buffer*

RPMI – *Roswell Park Memorial Institute (medium)*

SP – üksikpositiivne, *single positive*

TCR – T-raku retseptor, *T-cell receptor*

TRA – koespetsiifiline antigeen, *tissue-restricted antigen*

Treg – reguleeriv T-lümfotsüüt

SISSEJUHATUS

Omandatud immuunsuse ülesandeks on kaitsta organismi patogeenide eest, kasutades selleks unikaalsete antigeeni spetsiifiliste retseptoritega immuunrakke ehk lümfotsüüte. Nende retseptorite loomine põhineb juhuslikul geenilõikude rekombinatsioonil ning seetõttu peavad lümfotsüüdid läbima küpsemise jooksul kindlaid kontrollpunkte, et tagada üldine tolerantsus organismi enda komponentide suhtes. Tolerantsuse tagamises mängib olulist rolli autoimmuunne regulaator (AIRE), mis reguleerib organismi koespetsiifiliste antigeenide esitamist arenevatele T-lümfotsüütidele. Antud mehhanism võimaldab tuumuses varakult tuvastada ja kõrvaldada autoreaktiivseid rakke, et ei tekiks autoimmuunvastust, mille käigus hävitatakse organismi enda rakke.

AIRE valgu puuduliku funktsiooni tagajärjel tekib inimestel autoimmuunne polüendokrinopaatia-kandidoos-ektodermaalne düstroofia (APECED). APECED-ile iseloomulikke patoloogilisi muutusi põhjustavad elimineerimistest pääsenud autoreaktiivsed lümfotsüüdid, mis hakkavad ründama erinevaid kudesid ja organeid, põhjustades nende kahjustusi ja põletikke. Kuigi selle väga haruldase haiguse kliiniline pilt ja raskusaste on varieeruv, siis ühisosana on kõigil APECED haigetel tuvastatud I tüüpi interferoonide vastased autoantikehad. APECED-i paremaks uurimiseks on loodud mitmeid loommudeleid, millest hetkel on kõige informatiivsem Aire-puudulik rotimudel.

Antud bakalaureusetöö eesmärkideks oli süstemaatiliselt uurida Aire-puudulikkusest tingitud I tüüpi interferoon alfa subtüüpide vastaste autoantikehade ja süljenäärme põletiku dünaamikat ajas ning nendevahelist seost. Eesmärkide saavutamiseks kasutati mudelloomana Aire-puudulikku rott. Töö teostati Tartu Ülikooli meditsiiniteaduste valdkonnas, biomeditsiini osakonnas, bio- ja siirdemeditsiini instituudis, molekulaarpatoloogia uurimisgrupis. Loomkatsed viidi läbi Tartu Ülikooli molekulaar- ja rakubioloogia instituudi vivaariumis.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

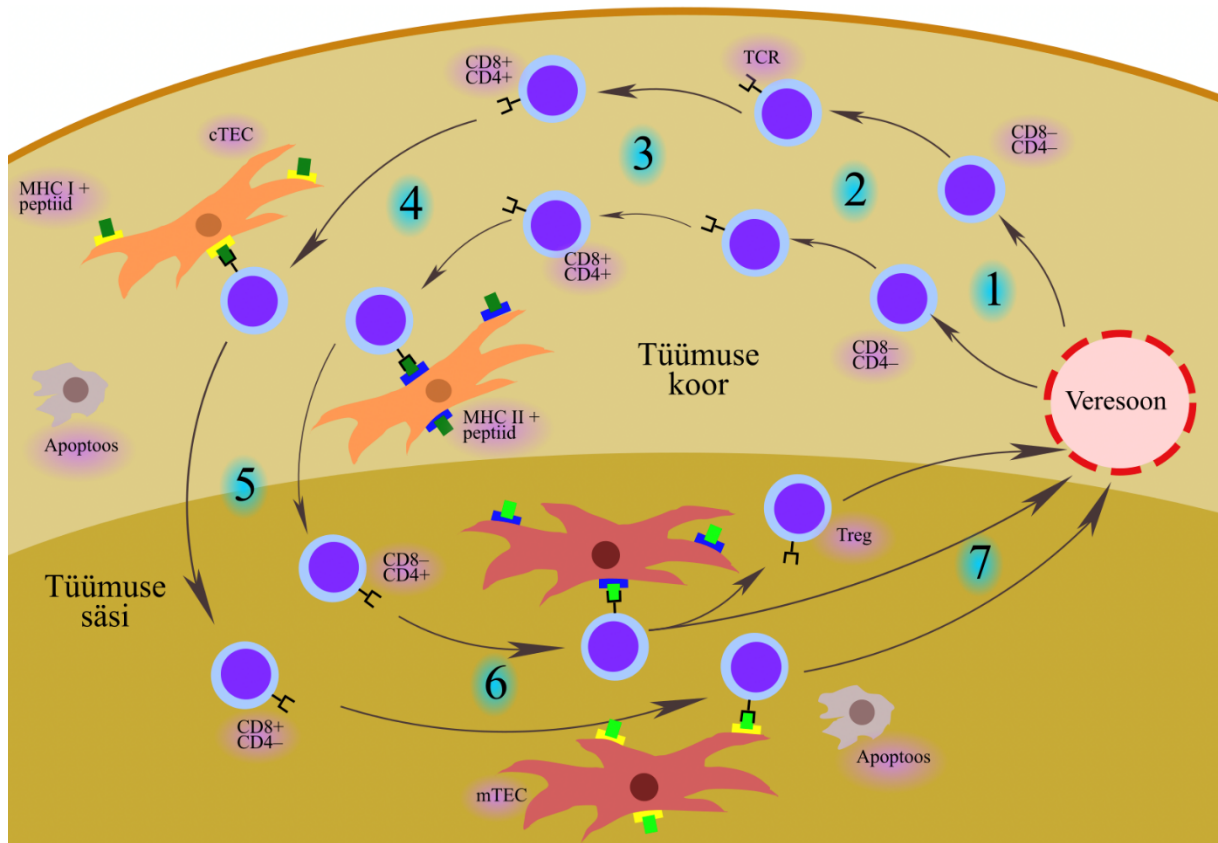
1.1. Omandatud immuunsus

Inimese immuunsüsteemi saab jagada kaheks: kaasasündinud ja omandatud immuunsus. Kaasasündinud immuunsus on esmane, kiire ja mittespetsiifiline organismi kaitse ohu eest. Selle alla kuuluvad füüsilised ja keemilised barjäärid, mis takistavad patogeene tungimist organismi. Tähtsaks osaks on ka leukotsüüdid, nagu makrofaagid, dendriitrakud (DC, ingl *dendritic cell*) ja loomulikud tapjarakud, mis surmavad patogeene mittespetsiifiliselt ehk eristamata näiteks bakterite või viiruste tüvesid (Abbas *et al.*, 2017; Parkin ja Cohen, 2001). Omandatud immuunsus on aga pikaajaline ja spetsiifiline kaitse patogeene eest. Selle peamiseks vahendajateks on B- ja T-lümfotsüüdid ehk B- ja T-rakud. Iga lümfotsüüt omab unikaalset retseptorit, mis on võimeline seonduma kindla antigeeni (enamasti võõrvalk) kindla epitoobiga ehk struktuuriga antigeenil. Seetõttu on omandatud immuunsus võimeline eristama patogeene ning neid efektiivselt kõrvaldama. Omandatud immuunsust saab omakorda jagada kaheks: humoraalne ja rakuline immuunvastus. Humoraalset immuunvastust viivad läbi B-lümfotsüüdid, kus iga B-lümfotsüüt on võimeline tootma unikaalset antikeha, mis seondub kindla antigeeniga. Tekkiv kompleks põhjustab antigeeni neutraliseerimist ja hävitamist fagotsüteerivate rakkude poolt. Seega võimaldab humoraalne immuunvastus hävitada rakuväliseid patogeene. Kui tegemist on aga rakusiseste patogeenidega, siis käivitatakse T-rakkude vahendatud rakuline immuunvastus. Tuntumateks T-rakkudeks on tsütotoksilised, abistaja ja regulatoorsed T-lümfotsüüdid. Esimene nendest toodab ühendeid, mis tapavad rakusiseseid patogeene ja nakatunud rakke. Abistaja T-rakud sünteesivad ühendeid, mis aktiveerivad osasid B-lümfotsüüte, makrofaage ja teisi T-rakke, ning regulatoorsete T-rakkude ülesanne on immuunvastust inhibeerida ja säilitada organismi enda antigeenide suhtes tolerantsus (Abbas *et al.*, 2017; Bonilla ja Oettgen, 2010; Parkin ja Cohen, 2001). Lümfotsüütide funktsioneerimiseks peab neid esmalt aga aktiveerima. Selleks peab toimuma lümfotsüüdi antigeenspetsiifilise retseptori ja sellele retseptorile vastava MHC-antigeen kompleksi (peamine koesobivuskompleks, ingl *major histocompatibility complex*) interaktsioon ning lisaks ka koretseptorite aktivatsioon. MHC molekulid on võimelised esitama lümfotsüütidele nii võõraid kui ka kehaomaseid antigeene ning need jagunevad kahte klassi: MHC I ja MHC II. MHC I-antigeen kompleksi on võimelised ekspresseerima peaaegu kõik organismi tuumaga rakud ning seda vajatakse tsütotoksiliste T-rakkude aktivatsiooniks. Aktivatsioon toimub kui rakk ekspresseerib kehavõõrast valku, viidates sellega raku patoloogilisele seisundile. MHC II-antigeen kompleksi ja vajalikke koretseptoreid ekspresseerivad peamiselt aga professionaalsed antigeeni esitavad rakud (APC, ingl *antigen-presenting cell*), milleks on näiteks DC, makrofaagid ja aktiveeritud B-rakud. MHC II saavad

ekspresseerida ka tüümuse epiteelirakud ning mitteprofessionaalsed antigeeni esitavad rakud. MHC II-antigeen kompleks on vajalik abistaja T-rakkude aktiveerimiseks ning B-lümfotsüütide aktiveerimiseks, millest viimased on võimelised aktiveeruma ka vabalt ringlevate antigeenidega seondumisel (Abbas *et al.*, 2017; Roche ja Furuta, 2015).

1.2. Tsentraalne tolerantsus

Omandatud immuunsuses osalevate T-rakkude eellasrakud saavad alguse luuüdist, kust nad edasiseks küpsemiseks migreeruvad tüümusesse (joonis 1). Tüümusesse migreeruvatel ebaküpsel T-rakkudel ehk tümotsüütidel puuduvad nii CD4 kui ka CD8 koretseptorid, olles seega topeltnegatiivsed (DN, ingl *double negative*). Esmalt liiguvad DN tümotsüüdid tüümuse koore osasse, kus toimub rakkude jagunemine ning T-rakkude antigeeni retseptorite (TCR, ingl *T-cell receptor*) moodustumine. TCR-id moodustuvad TCR-i geenide segmentide juhusliku rekombinatsiooni teel, võimaldades niimoodi luua väga laia retseptorite repertuaari. Seejärel indutseeritakse tümotsüütidel CD4 ja CD8 koretseptorite ekspressioon ehk tekivad topeltpositiivsed (DP, ingl *double positive*) rakud, mis edasiseks arenemiseks ja ellujäämiseks peavad läbima positiivse selektsiooni (Kumar *et al.*, 2018; Rothenberg *et al.*, 2016). Positiivse selektsiooni käigus saavad ellujäämissignaale need DP tümotsüüdid, mille TCR-id reageerivad madala afiinsusega tüümuse koore epiteelirakkude (cTEC, ingl *cortical thymic epithelial cell*) pinnal olevate MHC-peptiid kompleksidega. Vastavalt sellele, kas DP rakkude TCR-i afiinsus on MHC I või MHC II vastu, arenevad neist rakkudest CD4⁻CD8⁺ üksikpositiivsed (SP, ingl *single positive*) T-lümfotsüüdid ehk tsütotoksilised T-rakud või CD4⁺CD8⁻ üksikpositiivsed T-lümfotsüüdid ehk abistaja T-rakud (Alam *et al.*, 1996; Rothenberg *et al.*, 2016; Takaba ja Takayanagi, 2017). Järgmisena liiguvad positiivse selektsiooni läbinud SP rakud mööda kemokiinide kontsentratsiooni gradienti tüümuse säsi osasse, kus toimub negatiivne selektsioon. Selles protsessis osalevad põhiliselt tüümuse säsi epiteelirakud (mTEC, ingl *medullary thymic epithelial cell*), mis on võimelised ekspresseerima koespetsiifilisi antigeene (TRA, ingl *tissue-restricted antigen*). Kui säsisse migreerunud SP tümotsüütide TCR-id reageerivad tugeva afiinsusega mTEC-ide pinnal olevate kehaomaste MHC-peptiid kompleksidega, siis suunatakse sellised tümotsüüdid apoptoosi või diferentseeruma regulatoorseteks T-rakkudeks, tagades niimoodi tsentraalse tolerantsuse (Alam *et al.*, 1996; Derbinski *et al.*, 2001; Kondo *et al.*, 2018; Takaba ja Takayanagi, 2017). Seega on positiivse ja negatiivse selektsiooni eesmärgiks tagada funktsionaalsete ehk peptiid-MHC komplekse ära tundvate T-rakkude sattumine perifeeriasse. Lisaks peavad sellised T-rakud olema võimelised käivitama immuunvastust ja olema kehaomaste antigeenide suhtes tolerantsed (Kondo *et al.*, 2018; Takaba ja Takayanagi, 2017).



Joonis 1. Tütmotsüütide areng tüümuses. (1) Topeltnegatiivsed tütmotsüüdid ($CD8^-CD4^-$) liiguvad veresoonte kaudu luuüdist tüümuse koore osasse. (2) Koore osas hakkavad rekombineeruma T-raku retseptorite geenide segmentid. Eduka rekombinatsiooni tulemusena ekspresseerivad tütmotsüüdid funktsionaalset T-raku retseptorit (TCR). (3) Seejärel hakkavad tütmotsüüdid ekspresseerima nii CD8 kui ka CD4 koretseptoreid ning rakud muutuvad topelt positiivseteks ($CD8^+CD4^+$). (4) Järgmisena toimub positiivne selektsioon, kus ellujäämissignaale saavad tütmotsüüdid, mille TCR-id seonduvad madala afiinsusega tüümuse koore epiteelirakkude (cTEC) MHC-peptiid kompleksidega. Vastasel korral suunatakse tütmotsüüdid apoptoosi. (5) Need tütmotsüüdid, mille TCR interakteerus MHC I-peptiid kompleksiga diferentseeruvad $CD8^+CD4^-$ üksikpositiivseteks T-rakkudeks. Teised tütmotsüüdid, mis interakteerusid MHC II-peptiid kompleksiga diferentseeruvad $CD8^-CD4^+$ üksikpositiivseteks T-rakkudeks. Seejärel migreeruvad üksikpositiivsed tütmotsüüdid säsisse. (6) Säsis toimub negatiivne selektsioon tüümuse säsi epiteelirakkude (mTEC) vahendusel, kus MHC-peptiid kompleksidega tugeva afiinsusega interakteeruvad tütmotsüüdid suunatakse apoptoosi või diferentseeruma regulatoorseteks T-rakkudeks (Treg). (7) Negatiivse selektsiooni läbinud T-rakud väljuvad veresoonte kaudu tüümusest ja liiguvad perifeeriasse. Joonis on tehtud uurimistöö autori poolt Inkscape 1.1 tarkvaraga ning põhineb Stoljar (2020) töö joonisel.

1.3. AIRE ja APECED

T-lümfotsüütide negatiivse selektsiooni üheks võtmegeeniks on *AIRE* (autoimmuunne regulaator) geen, mis ekspresseerub peamiselt tüümuse säsi epiteelirakkudes ning võimaldab nendel ekspresseerida TRA-sid (Anderson *et al.*, 2002; Heino *et al.*, 1999; Nagamine *et al.*, 1997; Perniola, 2018). *AIRE* valgu puuduliku funktsiooni tulemusena on pärsitud negatiivne selektsioon, mistõttu autoreaktiivsed T-rakud pääsevad apoptoosist ning vabanevad perifeeriasse, kus nad põhjustavad autoimmuunreaktsioone (Besnard *et al.*, 2021; Liston *et al.*, 2003).

Mutatsioonid *AIRE* geenis võivad põhjustada haruldast autosoom-retsessiivset haigust APECED (autoimmuunne polüendokrinopaatia-kandidoos-ektodermaalne düstroofia, ingl *autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy*), mida tuntakse ka 1. tüüpi autoimmuunse polüendokrinopaatia sündroomina (APS-1, ingl *autoimmune polyglandular syndrome type 1*) (Nagamine *et al.*, 1997). APECED sümptomeid on ligikaudu 30 ning nendeks on näiteks esimest tüüpi diabeet, hepatiit, allopeetsia, vitiliigo, hambaemali hüoplaasia, küünte düstroofia, munasarja puudulikkus jpt. Enim levinud sümptomiteks on selle haiguse puhul aga krooniline mukokutaanne kandidoos (CMC, ingl *chronic mucocutaneous candidiasis*), hüoparatüreoidism (HP, ingl *hypoparathyroidism*) ning Addisoni tõbi (neerupealiste puudulikkus) (Ahonen *et al.*, 1990; Besnard *et al.*, 2021). Lisaks on APECED tunnuseks mitmesuguste organspetsiifiliste ja tsütokiinide vastaste autoantikehade (kehaomaseid antigeene äratundvad antikehad) esinemine isegi enne eelnevalt loetletud sümptomite avaldumist, mistõttu saab neid kasutada patsientide diagnoosimisel (Besnard *et al.*, 2021; Meager *et al.*, 2006). Tegemist on haruldase haigusega, mis esineb sagedamini isoleeritud populatsioonides, näiteks soomlaste (1 : 25 000), sardiinlaste (1 : 14 400) ja iraani päritolu juutide (1 : 9000) seas (Ahonen *et al.*, 1990; Besnard *et al.*, 2021; Rosatelli *et al.*, 1998; Zlotogora ja Shapiro, 1992). APECED haigete ravil lähtutakse nende individuaalsetest sümptomitest ning kombineeritakse erinevaid ravimeetodeid, kuid vaatamata sellele on APECED haigetel kõrge varase suremuse risk (Besnard *et al.*, 2021; Borchers *et al.*, 2020).

APECED on hea mudelhaigus uurimaks tsentraalse tolerantsuse kujunemist ning selle häiretest tingitud autoimmuunfenotüüpi. Seni on APECED ning *AIRE* uurimiseks kasutatud enamasti Aire-puudulikke hiiri, kuna inimeste kaasamine uuringutesse on piiratud (Besnard *et al.*, 2021; Ramsey *et al.*, 2002). Samas on teada, et hiire mudelites esinevad teatud puudused APECED uurimisel. Näiteks sõltub haiguse fenotüübi tugevus ja kahjustatud organite valik kasutatavast hiire liinist (Jiang *et al.*, 2005). Lisaks erinevad hiirte liinid üksteisest autoantikehade, infiltraatide (põletikule iseloomulikud tihedate immuunrakutuumade kogumikud) ja viljakuse poolest. Samuti on hiirtel võrreldes inimesega nõrgem APECED-i fenotüüp, haigus ei mõjuta nende eluiga, ei esine CMC, HP ega vitiliigot ning neil puuduvad APECED-ile tüüpilised organspetsiifilised ja tsütokiinide vastased autoantikehad (v.a mõni liin) (Besnard *et al.*, 2021; Hubert *et al.*, 2009; Kuroda *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2008; Pöntynen *et al.*, 2006; Ramsey *et al.*, 2002).

2018. aastal loodi kaks *Aire* geeninokauditud (ingl *gene knock-out*) ehk Aire-puudulikku (Aire-KO) rotiliini (joonis 2), millel esines liinist sõltumatult mitmeid APECED haigetele omaseid sümptomeid. Nendel rottidel on tuvastatud paljudes kudedes (sh. süljenäärmetes,

pankreas ja maksas) infiltraadid, tsütokiinide vastased autoantikehad ning alates kuuendast elukuust aloopeetsia, vitiliigo ja küünte düstroofia. Siiani pole aga Aire-KO rottidel tuvastatud APECED kolme peamist sümptomit: CMC, HP ja Addisoni tõbi, kuid sellele vaatamata on nad väga heaks mudeliks haiguse teiste aspektide uurimiseks (Ossart *et al.*, 2018; Peltser, 2020; Stoljar, 2020).



Joonis 2. Aire-puudulik rott (vasakul) ja heterosügootne rott (paremal). Aire-puudulikul rottil esineb aloopeetsia, küünte düstroofia (pildil pole selgelt näha) ja vitiliigo. Pildid on tehtud antud töö autori poolt.

1.4. Põletik ja autoimmuunhaiguste patogenees

Põletik on organismi reaktsioon infektsioonile ja koekahjustusele. Põletik kujutab endast leukotsüütide, plasmaproteiinide (nt komplemendi valgud, antikehad, akuutse faasi valgud) ja plasma kogunemist infektsiooni või koekahjustuse koldesse. Põletikulise reaktsiooni esimeseks etapiks on infektsiooni või kahjustuse tuvastamine koos resideerivate immuunrakkude poolt, nagu nuumrakud, makrofaagid ja dendriitrakud. Tajudes oma spetsiaalsete retseptoritega patogeene või koekahjustust, hakkavad need rakud tootma põletikumediaatoreid, mis põhjustavad veresoonte laienemist kahjustatud koe juures. Selle eesmärk on suurendada verevoolu ja seega leukotsüütide ning plasmaproteiinide kogunemist põletikukoldesse. Mediaatorite toimel suureneb ka veresoonte seinte läbilaskvus ning adhesioonimolekulide ekspressioon, mis võimaldab leukotsüütide kinnitumist ja liikumist läbi veresoonte kudedesse. Kemokiinide kontsentratsiooni gradiendi järgi liiguvad leukotsüüdid edasi põletikukoldesse, kus nad hakkavad fagotsüteerima mikroobe ja surnud rakke (Abbas *et al.*, 2017; Medzhitov, 2008; Strbo *et al.*, 2014).

Põletikuline reaktsioon on üheks oluliseks sümptomiks autoimmuunhaigustes, mille puhul organism tunneb ära kehaomaseid antigeene ning hakkab neid hävitama. Koekahjustust võib

põhjustada autoantikehade seondumine koeantigeenidega. Sellisel juhul opsoniseeritakse ehk märgistatakse rakud autoantikehade poolt või autoantikehade aktiveeritud komplemendisüsteemi valkude poolt. Opsoniseeritud rakud tuntakse ära ja hävitatakse fagotsüütide poolt. Komplemendisüsteemi aktiveerides tekivad ka valgud, mis on põletikku soodustavad ning meelitavad kohale neutrofiile ja makrofaage, mis seonduvad antikehade või komplemendi valkudega, hakkavad keskkonda eritama rakke kahjustavaid ensüüme ja teisi reaktiivseid ühendeid. Koekahjustuse võivad esile kutsuda ka immuunkompleksid, mis koosnevad autoantikehast ja kehaomasest antigeenist. Kuigi tavaliselt eemaldatakse organismist kõik immuunkompleksid, siis nende ületootmisel võivad nad hakata kuhjuma veresoontesse ja kudedesse, kus nad aktiveerivad leukotsüüte ja nuumrakke käivitama põletikku. Lisaks võivad organismi kudesid kahjustada autoimmuunhaigustele iseloomulikud autoreaktiivsed T-rakud, kas kutsudes esile põletikku või hävitades rakke tsütotoksiliste T-rakkudega (Abbas *et al.*, 2017). Isegi kui algset autoimmuunvastust põhjustanud antigeeni ekspresseerivad rakud on hävitatud, ei pruugi põletik ja immuunvastus sellega lõppeda. Sellisel juhul on tegu epitoobi levikuga (ingl *epitope spreading*), kus immuunrakkude poolt fagotsüteeritud rakkude ja valkude erineval protsessingul võidakse lümfotsüütidele esitada uusi epitoope, mis olid varasemalt näiteks konformatsiooni tõttu peidus. Niimoodi aktiveeritakse uue epitoobi spetsiifilised lümfotsüüdid ning alustatakse sekundaarset immuunvastust, mis järgneb ajaliselt primaarsele immuunvastusele (Powell ja Black, 2001).

Autoimmuunhaiguste põletikulistes reaktsioonides võivad lisaks professionaalsetele APC-dele osaleda ka kehaomaseid antigeene esitavad mitteprofessionaalsed APC-d (Abbas *et al.*, 2017). Näiteks Sjögreni sündroomi üheks tunnuseks on lümfoidsete infiltraatide olemasolu eksokriinsetes näärmetes, nagu sülje- ja pisaranäärmetes, mis viivad nende organite funktsioneerimishäireteni (Bowman, 2018; Jirsova *et al.*, 2020). Põletikutingimustes hakkavad ka epiteelirakud ekspresseerima MHC II, aktiveerides seeläbi veelgi rohkem lümfotsüüte, võimaldades nii omaenese hävingut (Tsunawaki *et al.*, 2002).

1.5. Autoantikehad

Autoantikehad võivad esineda nii tervetel kui ka autoimmuunhaigustega indiviididel. Autoimmuunhaigused võivad olla organspetsiifilised, nagu I tüüpi diabeet ja türeoidiit, mille puhul esinevad mingi konkreetse organi, koe või rakutüübi spetsiifilised autoantikehad. Sellised autoantikehad kahjustavad ainult märklaudorganeid. Süsteemsetes autoimmuunhaigustes, nagu süsteemne erütematoosne luupus, Sjögreni sündroom ja APECED, on aga autoantikehade antigeenideks nii vabad molekulid kui ka raku pinna- ja tuumavalgud (Elkon ja Casali, 2008).

1.5.1. Tsütokiinide vastased autoantikehad

Teatud autoimmuunhaiguste puhul, nagu APECED, reumatoidartriit ja süsteemne erütematoosne luupus, esinevad patsientidel ka tsütokiinide vastased autoantikehad (aCA, ingl *anti-cytokine autoantibodies*) (Cappellano *et al.*, 2012). Tsütokiinid on valgulised signaalmolekulid, mis membraansete retseptorite kaudu mõjutavad rakkude proliferatsiooni, diferentseerumise ja immuunregulatoorset aktiivsust (Meager ja Wadhwa, 2014). Uuringud erinevate aCA-de kohta näitavad, et põletikke soodustavate tsütokiinide vastu esineb palju sagedamini autoantikehasid kui põletikuvastaste tsütokiinide vastu (Cappellano *et al.*, 2012). Lisaks on näidatud, et madalates tiitrites aCA-d esinevad ka tervetel indiviididel, kuid kuna nad on peamiselt tsütokiinidega seotud, siis nende tuvastamine on keeruline (Watanabe *et al.*, 2007). aCA-d võivad omada erinevaid bioloogilisi aktiivsusi, näiteks tsütokiinide bioaktiivsuse mahasurumine ehk tsütokiinide neutraliseerimine, mis võib mõjuda organismile kas kahjulikult või hoopis patoloogiat pärssivalt (Kitamura *et al.*, 1999; Meyer *et al.*, 2016; Uchida *et al.*, 2004). Seerumis moodustunud tsütokiin-autoantikeha kompleksid võivad pikendada tsütokiinide poolestusaega, käitudes justkui tsütokiinide reservuaarina. Kusjuures need tekkinud kompleksid ei pruugi tsütokiine neutraliseerida ning võivad isegi tõsta nende bioaktiivsust (Boyman *et al.*, 2006; Courtney *et al.*, 1994).

1.6. APECED autoantikehad

APECED haigetel esinevad nii organspetsiifilised kui tsütokiinide vastased autoantikehad. Viimastest on APECED-ile iseloomulikud I tüüpi interferoonide (IFN) vastased autoantikehad (Meager *et al.*, 2006; Meloni *et al.*, 2008). Need tsütokiinid on olulised viirusvastases immuunreaktsioonis. Kuigi APECED kliiniline pilt võib olla väga varieeruv nii sümptomite, nende tõsiduse kui avaldumise aja poolest, leidub peaaegu 100% patsientidel kõrgetes tiitrites IFN- α subtüüpide ning eriti IFN- ω vastaseid autoantikehasid. Lisaks on täheldatud nende autoantikehade teket APECED varajases arenguetappides, kus kandidoos ja endokriinsete kudede kahjustus puudub, ning nende tiitrite tõusmist vanusega. I tüüpi IFN-ide vastaste autoantikehade tiitrid püsivad kõrged isegi kuni 30 aastat. Need autoantikehad on suuresti spetsiifilised APECED-ile, esinedes küll ka tümoomi ja müasteeniat põdevatel inimestel, kuid APECED haigetel on nende tiitrid 3 kuni 6 korda kõrgemad (Meager *et al.*, 2003, 2006; Meloni *et al.*, 2008).

Lähemalt on uuritud just IFN- α neutraliseerivaid autoantikehasid ning on leitud, et nad vähendavad IFN-stimuleeritud geenide (ISG, ingl *interferon stimulated genes*) ekspressiooni perifeersetes vere mononukleaarsetes rakkudes (PBMC, ingl *peripheral blood mononuclear cell*) (Kisand *et al.*, 2008). Lisaks on kirjeldatud, et IFN- α neutraliseerivad autoantikehad võivad omada patoloogiat pärssivat efekti, takistades APECED haigetel I tüüpi diabeedi

kujunemist isegi kui neil esinevad I tüüpi diabeediga seotud autoantikehad (Meyer *et al.*, 2016). Kuigi I tüüpi IFN-id omavad olulist rolli viirusvastastes immuunreaktsioonides ning nende vastu on APECED patsientidel neutraliseerivad autoantikehad, esineb APECED haigetel viirushaiguseid harva. Selle põhjuseks arvatakse olevat kompensatsioon IFN- β või IFN- λ poolt, mille vastu esineb palju harvem ja väiksemates tiitrites neutraliseerivaid autoantikehasid. Samuti võib seda põhjustada neutraliseerivate autoantikehade vähesus kudedes ja limakestades (Kisand *et al.*, 2008; Meager *et al.*, 2006).

Aire-KO rottidel on tuvastatud APECED haigetega võrreldavates tiitrites anti-IFN- α autoantikehasid. Uuritud on ka IFN- ω vastaste autoantikehade esinemist Aire-KO rottidel, kuid nende kogused ei erine oluliselt heterosügootsete rottide omast (Ossart *et al.*, 2018). I tüüpi IFN- α , täpsemalt IFN- $\alpha 11$, neutraliseerivate autoantikehade olemasolu on tuvastatud keskmiselt 4 kuu vanustel Aire-KO rottidel ning on näidatud, et nende tiiter tõuseb loomade vanuse kasvades. Nagu APECED haigete puhul, ilmnevad Aire-KO rottidel I tüüpi IFN-e neutraliseerivad autoantikehad enne sümptomite avaldumist ning nad pärsvad ISG-de ekspressiooni PBMC-des (Peltser, 2020). Siiani pole aga erineva vanusega rottidel autoantikehade teket süstemaatiliselt uuritud ning ei teata, kuidas autoantikehade kontsentratsiooni dünaamika mõjutab autoimmuunfenotüübi kujunemist.

1.7. Interferoonid

Interferoonide peamine eesmärk on kaitsta teisi rakke infektsiooni eest, käivitades läbi rakupinna retseptorite signaalirajad, mis põhjustavad ISG transkriptsiooni. Need geenid omavad viiruse vastast, kasvaja vastast, proliferatsiooni inhibeerivat ja immuunvastust reguleerivat toimet (Gibbert *et al.*, 2013; Walter, 2020). Interferoonid jaotatakse nende pH tundlikuse, kristallstruktuuri ning aminohappelise järjestuse alusel kolme klassi: 16 erinevat I tüüpi IFN-i, 1 II tüüpi IFN ja 4 erinevat III tüüpi IFN-i. I ja III tüüpi interferoone on võimelised tootma kõik viiruse või muu patogeeni nakatunud rakud, kuid kõige olulisemaks I tüüpi IFN-ide tootjateks on plasmatsütoidsed dendriitrakud ja makrofaagid (Abbas *et al.*, 2017; Siegal *et al.*, 1999; Walter, 2020).

I tüüpi interferoonide sünteesi peamiseks indutseerijaks on viiruse nukleiinhapped ning sünteesitud IFN-ide toime on enamasti parakriinne, eesmärgiga kaitsta naaberrakke nakatumise eest. I tüüpi IFN-id põhjustavad selliste ensüümide tootmist, mis takistavad viiruse genoomi transkriptsiooni ja translatsiooni ning soodustavad viiruse RNA degradeerimist. Lisaks suurendavad I tüüpi IFN-id loomulike tapjarakkude ning CD8⁺ T rakkude tsütotoksilisust, soodustavad naiivsete T rakkude diferentseerumist T-abistaja rakkudeks ning suurendavad MHC I ekspressiooni rakupindadel (Gibbert *et al.*, 2013). Kuna I tüüpi IFN-id omavad immuunvastust reguleerivat toimet, siis on neil oluline roll

autoimmuunhaiguste, näiteks Sjögreni sündroomi ja I tüüpi diabeedi, patogeneesis (Chasset et al., 2021; Hall et al., 2015; Li et al., 2008; Meyer et al., 2016).

Hiiremudelil on uuritud IFN- α subtüüpide IFN- α 4 ja IFN- α 11 bioloogilist aktiivsust ja täheldati, et mõlemad subtüübid omavad kõrget viiruse vastast ja proliferatsiooni inhibeerivat toimet võrreldes mitmete teiste hiire IFN- α subtüüpidega. IFN- α 4 on hiire üks varasemaid IFN- α subtüüpe, mida toodetakse viirusinfektsiooni korral (Marié *et al.*, 1998; van Pesch *et al.*, 2004). Hiirte IFN- α 11 subtüüp on aga võimeline suurendama loomulike tapjarakkude viirusevastast aktiivsust (Gibbert *et al.*, 2012). Rotimudelil nende subtüüpide bioloogilise aktiivsuse kohta andmed puuduvad. Erinevalt hiirtest ja rottidest puudub inimesel IFN- α 11 subtüüp ning IFN- α 4 puhul on näidatud, et tegemist on IFN- α subtüübiga, mis kuulub mõõduka ISG regulatsiooni ja mõõduka viiruse vastase mõjuga IFN- α gruppi (Moll *et al.*, 2011).

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

Antud uurimistöö üheks eesmärgiks oli süstemaatiliselt uurida Aire-puudulikkusest tingitud I tüüpi IFN- α subtüüpide vastaste autoantikehade esinemise dünaamikat ajas ning selle eesmärgi saavutamiseks uuriti IFN- α 4 ja IFN- α 11 vastaste autoantikehade taset eri vanusega Aire-KO ja heterosügootsete rottide seerumis.

Uurimistöö teiseks eesmärgiks oli välja selgitada, milline on Aire-puudulikkusest tingitud süljenäärme põletiku dünaamika ajas. Selle eesmärgi saavutamiseks analüüsiti eri vanuses rottide süljenäärmete immuunrakke ning loodi põletiku raskusastmete hindamiseks skaala.

Uurimistöö kolmandaks eesmärgiks oli vaadata, kas ja kuidas on I tüüpi IFN- α subtüüpide vastaste autoantikehade dünaamika seotud süljenäärme põletiku kujunemise dünaamikaga. Selle eesmärgi saavutamiseks tehti korrelatsioonianalüüs mõlema tunnuse trendidele.

2.2. Materjal ja meetodika

2.2.1. Katseloomad

Käesolevas töös kasutati uuritava rühmana Sprague-Dawley taustaga 62 Aire-KO ja kontrollrühmana 30 heterosügootset rott. Rotid pärinesid Nantese Ülikoolist Prantsusmaalt ning kasvatati Tartu Ülikooli molekulaar- ja rakubioloogia instituudi vivaariumis. Aire-KO rottide genereerimine on kirjeldatud Ossart *et al.* töös (2018). Katsetes kasutatud rotid uinutati isofluraaniga Vetflurane (Virbac) ja surmati südame punktsioonil teostatud veretustamise teel. Esmalt koguti südamest verd hepariini (LEO Pharma A/S) sisaldava süstlaga seerumi jaoks ning seejärel koguti edasisteks analüüsideks vajalikud koed. Loomkatsete tegemiseks andis loa Maaeluministeriumi loomkatsete läbiviimise loakomisjon (luba nr 139).

2.2.2. Immunofluorestsentsmikroskoopia

Immunofluorestsentsmikroskoopia (IF) meetodil uuriti infiltraatide olemasolu 1–18 kuu vanuste rottide lõuaalustes süljenäärmetes. Valimiks oli 27 Aire-KO ja 21 kontrollrühma rott. IF-analüüsiks võeti igalt rotilt umbes veerand süljenääret ning pandi NEG-50 *Frozen Section Medium* lahusega (Richard-Allan Scientific) täidetud fooliumist vormi, mis asetati kiireks külmutamiseks kuivale jääle ning hiljem hoiustati -20 °C juures. Mikroskoobi preparaate jaoks lõigati 7 μ m paksused koelõigud Leica CM1950 krüostaadiga (Leica Biosystems).

Efektivsemaks analüüsiks tehti kahte tüüpi preparaate: ainult DAPI-ga (4',6-diamidino-2-fenüülindool) värvitud preparaadid ning DAPI ja antikehadega värvitud preparaadid. Esmalt tehti koelõigud DAPI-ga värvimiseks, et hinnata infiltraatide olemasolu. Kui kahtlustati infiltraatide esinemist, siis tehti DAPI ja antikehadega värvimiseks uued preparaadid pooleli

jäänud lõikekohast. Infiltraatide puudumisel lõigati aga pooleli jäänud lõikekohast u 200 µm edasi ning tehti uued preparaadid DAPI-ga värvimiseks ja niimoodi jätkati kuni koeproovi lõpuni.

Preparaatide töötlemise esimeseks etapiks oli nende inkubeerimine toatemperatuuril 15 min, mille järel fikseeriti koelõigud 120 µl 4% formaldehüüdi (Sigma-Aldrich®, Merck KGaA) PBS (fosfaadiga puhverdatud soolalahus, ingl *phosphate-buffered saline*, Bioatlas) lahuses 15 minutit toatemperatuuril. Seejärel pesti koelõike PBS-puhvril 3 × 5 minutit loksutil (*Rocking and Waving Shaker*, Ohaus Corporation).

Teiseks etapiks oli koelõikude permeabiliseerimine 120 µl 0,3% Triton X-100 (PanReac AppliChem ITW Reagents), 1% BSA (veise seerumi albumiin, ingl *bovine serum albumin*, GE Healthcare) PBS-puhvril 15 minutit toatemperatuuril. Enne permeabiliseerimist tõmmati *PAP Pen Liquid Blocker* (Newcomer Supply) markeriga hüdrofoobne ring ümber koelõikude, mis takistas vedeliku maha valgumist preparaadilt. Permeabiliseerimisele järgnes uus pesu PBS-puhvriga 3 × 5 minutit toatemperatuuril loksutil.

Kolmandas etapis blokeeriti antikehade ebaspetsiifilised seondumiskohad. Selleks inkubeeriti koelõike 120 µl 1% NGS-i (tavaline kitse seerum, ingl *normal goat serum*, Dako Cytomation) PBS-lahuses 10 minutit toatemperatuuril. Seejärel kanti preparaatidele 100 µl PBS-puhvrilahust primaarsete antikehadega (Tabel 1), 1% NGS ja 0,1% Triton X-100. Preparaate inkubeeriti antikehade lahusega üleöö +4 °C juures, pärast mida pesti preparaate 3 × 10 minutit toatemperatuuril PBS-puhvril. Seejärel kanti preparaatidele 120 µl PBS-puhvrilahust sekundaarsete antikehadega (Tabel 1) ja 0,1% Triton X-100. Preparaate inkubeeriti seejärel 1 tund toatemperatuuril pimedas, pärast mida pesti preparaate 3 × 10 minutit toatemperatuuril PBS-puhvril. Viimasena inkubeeriti preparaate 120 µl 2 µg/ml DAPI (Roche Diagnostics Corporation) lahuses 10 minutit toatemperatuuril, pesti PBS-puhvriga 10 minutit ning loputati destilleeritud veega. Koelõikude fikseerimiseks ja nende dehüdreerumise takistamiseks kanti kuivale alusklaasile *Fluorescence Mounting Medium* (Dako North America) lahust ning asetati peale katteklaas. Immunovärvitud koelõikude vaatlemiseks ja pildistamiseks kasutati fluorestsentsmikroskoopi Leica DFC310 FX (Leica Microsystems). Kolmandik IF-analüüsis kasutatud andmetest kogusid teised uurimisgrupi liikmed.

Nende preparaatidega, mis olid mõeldud DAPI-ga värvimiseks, viidi läbi ainult fikseerimine ja DAPI peale kandmine.

Lisaks IF-preparaatidele vaadati ka sama vanusega rottide hematoksüliini ja eosiiniga (H&E) töödeldud süljenäärme preparaate, et saada parem arusaam süljenäärme ehitusest. Koed

analüüsiti Eclipse Ci valgusmikroskoobiga (Nikon) ja töödeldi ImageJ tarkvaraga. Töö autor ei osalenud nende preparaaside valmistamisel ning neid ei kaasatud statistilisse analüüsi.

Tabel 1. Immunofluorestsentsmikroskoopias kasutatud primaarsed ja sekundaarsed antikehad.

Antigeen	Kloon	Konjugaat	Lahjendus	Tootja
CD3	SP7	-	1 : 300	Abcam
MHC Class II RT1B	OX-6	PE	1 : 500	Novus Biologicals
Goat anti-Rabbit IgG	-	AF488	1 : 2000	Jackson ImmunoResearch Laboratories

2.2.3. Voolutsütomeetria

Voolutsütomeetria jaoks koguti kolmelt Aire-KO ja kolmelt kontrollrühma rotilt üks kolmandik lõuaalusest süljenäärrest, mis loputati 70% etanoolis ja hoiti 4% FBS (veise loote seerum, ingl *fetal bovine serum*, Gibco™) sisaldusega RPMI 1640 söötmes (ingl *Roswell Park Memorial Institute*, Thermo Fisher Scientific). Seejärel hakiti süljenäärmed Petri tassil skalpelliga väikesteks tükkideks ning jaotati kaheks replikaadiks. Edasi pandi proovidele 10 ml ensüümilahust, mis sisaldas 15 U/mg DNAas I (PanReac AppliChem ITW Reagents), 125U/ml kollagenaas IV (Gibco™), 0,5 U/ml dispaasi (Gibco™) ja HBSS (Hanki balansseeritud soolalahus, *Hank's balance salt solution*) puhvrit. Seejärel inkubeeriti segu loksutil 40–60 min +37 °C juures, suspenderides proove seroloogilise pipetiga enne inkubeerimist ja siis iga 10 minuti järel 20 korda. Pärast koe lagundamist sõeluti segu läbi 40 µm suuruste avadega sõela RB-puhvriga (jooksutamispuhver, ingl *running buffer*) täidetud reaktsioonituubi. Proovid tsentrifuugiti 350 g 7 minutit +4 °C juures. Saadud sade võeti üles 2 ml RB puhvril, mille järel loendati rakud fluorestsentsrakuloenduriga LUNA-FL™ *Dual Fluorescence Cell Counter* (Logos Biosystems), järgides Logos Biosystems'i protokoll. Antikehadega inkubeerimiseks võeti igast proovist 2,5–3 miljonit rakku, mida hoiti antikehade RB lahuses (Tabel 2) 30 min +4 °C juures. Peale inkubeerimist lisati katsutitesse RB puhvrit ja tsentrifuugiti 350 g 7 minutit +4 °C juures, mille järel eemaldati supernatant ja lisati RB puhvrit.

Vahetult enne voolutsütomeetriga töö alustamist lisati rakususpensioonile 1 : 100 7-AAD (7-aminoaktinomütsiin D, BioLegend) lahust ning proovid sõeluti läbi 70 µm suuruste avadega sõela. Rakud analüüsiti voolutsütomeetriga BD LSRFortessa™ *Cell Analyzer* (BD Biosciences), kasutades tarkvara FACSDiva (BD Biosciences) ning tulemused analüüsiti programmiga FCS Express 5 (De Novo Software). Analüüsis tegemisel leiti rakutüübi osakaal süljenäärmepröövist ning graafikute tegemisel kasutati kahe replikaadi keskmist.

Tabel 2. Voolutsütomeetria analüüsis kasutatud antikehad.

Antigeen	Kloon	Konjugaat	Lahjendus	Tootja
CD3	REA223	FITC	1 : 100	Miltenyi Biotec
CD4	W3/25	PE/Cyanine 7	1 : 1000	BioLegend
CD8a	G28	APC	1 : 400	BioLegend
CD25	OX-39	PE	1 : 100	BioLegend
CD45	OX-1	PerCP/Cyanine 5.5	1 : 80	BioLegend
CD45R	HIS24	BV650	1 : 100	BD Biosciences
ICOS	C398.4A	PE/Dazzle	1 : 400	BioLegend

2.2.4. Lutsiferaasi immunopretsipitatsiooni süsteem

LIPS-meetodiga (lutsiferaasi immunopretsipitatsiooni süsteem, ingl *luciferase immunoprecipitation system*) uuriti I tüüpi interferoonide IFN- α 4 ja IFN- α 11 vastaste autoantikehade esinemist roti vereseerumis, mida koguti rotilt üks kord kuus. Selle meetodiga analüüsiti 62 Aire-KO ja 30 kontrollrühma roti vereseerumit. LIPS-i tegemiseks kanti U-kujulise põhjaga 96 kannuga mikroplaadile (Greiner Bio-One) 10 μ l seerumi lahust, mis koosnes 9 osast puhver A-st (10 ml 1M Tris pH 7,5 (Invitrogen™), 4 ml 5M NaCl (Sigma-Aldrich®), 1 ml 1 M MgCl₂ (Sigma-Aldrich®), 2 ml 100% Triton X-100) ja 1 osast seerumist. Seerumi lahjendused segati kokku 50 μ l $3,63 \times 10^6$ LU/ μ l antigeeni lahusega ning inkubeeriti 2 tundi toatemperatuuril loksutil. Pärast seda inkubeeriti plaati üleöö +4°C juures loksutil. Järgmisel päeval kanti proovid 96 kannuga filterplaadile (*Millipore® HTS HA Filter Plate*, Merck KGaA) 25 μ l kaupa kahes paralleelis. Eelnevalt oli aga filterplaadi kannudesse lisatud 10 μ l puhver A-d, et vältida antikeha-antigeeni lahuse kohest imendumist filtrisse. Järgmise sammuna valmistati ette proteiin G agaroskerakeste (*Protein G Agarose High Flow Resin*, Creative BioMart) suspensioon vastavalt tootja protokollile. Igale proovile lisati 25 μ l proteiin G agaroskerakeste suspensiooni ja segu inkubeeriti 2 tundi toatemperatuuril loksutil. Selle aja jooksul seondusid nii antikeha-antigeen kompleksid kui ka seondumata antikehad agaroskerakestele. Pärast inkubeerimist pesti plaati vaakumsüsteemi abil 4 korda puhver A-ga ja 4 korda PBS-puhvriga. Vahetult enne luminesentsi mõõtmist Victor X5 plaadilugejaga (*VICTOR X Multilabel Plate Reader*, PerkinElmer) lisati proovidele 20 μ l lutsiferaasi nanosubtraati (*Nano-Glo® Luciferase Assay Substrate*, Promega) lahjendusega 1 : 1000-le PBS-puhvril. LIPS-meetodiga saadud väärtused on antud töös väljendatud suhtelise muutusena, mis kujutab endast kahe paralleeli keskmise suhet kontrollrühma keskväärtusesse. Osa seerumiproove oli mitu korda mõõdetud ja nende puhul kasutati andmeanalüüsis

mõõtmiste aritmeetilist keskmist. Lisaks töö autori poolt saadud LIPS-andmetele on statistilises analüüsis kasutatud ka uurimisgrupi teiste liikmete kogutud andmeid.

Antud töö autor ei osalenud ise LIPS-meetodis kasutatud IFN- α subtüüpide tootmisel, kogumisel ja neid tootvate rakuliinide kloneerimisel. IFN- α 4 ja IFN- α 11 kodeeriva järjestuse kloneerimisel kasutati pPK-CMV-F4 plasmidi (PromoCell GmbH). Plasmidiis oli Firefly lutsiferaas asendatud NanoLuc® lutsiferaasi kodeeriva järjestusega (Promega) ning plasmidi oli lisatud vastavalt IFN- α 4 või IFN- α 11 järjestus. Nimetatud subtüüpide lutsiferaasi-liitvalkude ekspresseerimiseks kasutati inimese embrüonaalse neeru rakuliini HEK293. Rakke kultiveeriti 10 cm läbimõõduga Petri tassidel, 5% CO₂ sisaldusega keskkonnas koekultuuri inkubaatoris 37 °C juures. Rakke kasvatati DMEM (Dulbecco modifitseeritud Eagle'i sööde, ingl *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Lonza Group) söötmes, kuhu oli lisatud veel 10% FBS, 100 U/ml penitsilliini ja 100 µg/ml streptomütsiini.

2.2.5. Statistika

Tulemuste analüüsimiseks ja visualiseerimiseks kasutati GraphPad Prism 9 (GraphPad Software), Microsoft Excel (Microsoft), RStudio, Inkscape 1.1 ja ImageJ programme. Statistilisel analüüsil võrreldi omavahel tunnuste keskmisi väärtusi. LIPS-tulemuste võrdlemisel kasutati Graphpadi Pearsoni korrelatsioonianalüüsi ja MS Exceli kahepoolset paaritud t-testi – vastavalt valimite varieeruvusele kasutati kas 2. tüüpi või 3. tüüpi t-testi. Hindamaks, kas valimite gruppide varieeruvus oli sama või erinev kasutati MS Exceli F-testi funktsiooni. IF-tulemuste analüüsil kasutati kahepoolset Mann-Whitney U-testi RStudios ja Spearmani korrelatsiooni analüüsi GraphPadis. Statistiliselt oluliseks loeti erinevused, mille p-väärtus oli <0,05. Graafikutel on kujutatud valimite keskmised väärtused ja nende standardvead (SEM).

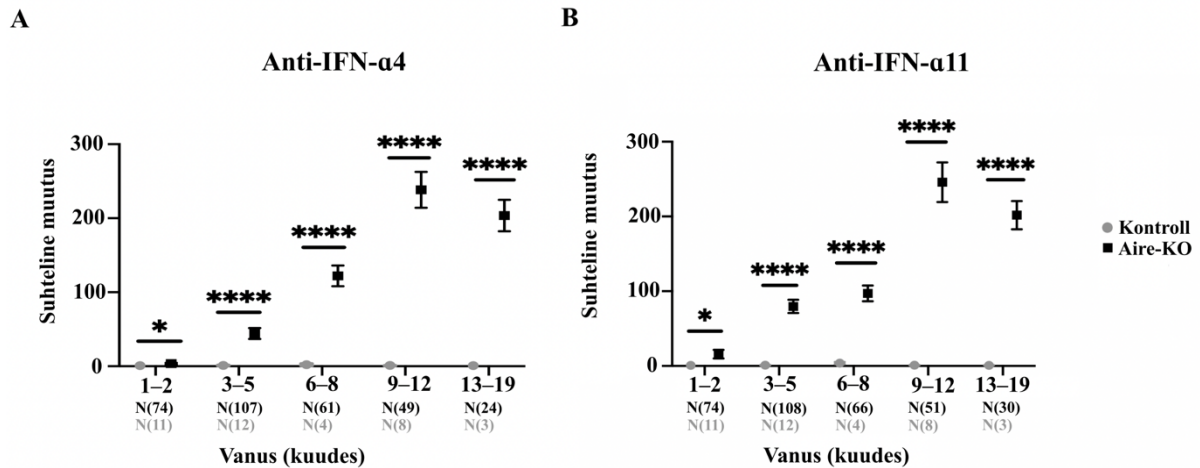
2.3. Tulemused ja arutelu

2.3.1. Anti-IFN- α 4 ja anti-IFN- α 11 vastased autoantikehad tekivad Aire-KO rottidel 3–5 kuu vanuselt ja jõuavad maksimaalsele tasemele 9–12 kuu vanuselt

Antud uurimistöö üheks eesmärgiks oli süstemaatiliselt uurida I tüüpi IFN-ide vastaste autoantikehade dünaamikat ajas. Selleks uuriti LIPS-meetodil 1–19 kuuste Aire-KO (62) ja kontrollrühma rottide (30) vereseerumeid. Tulemuste analüüsimiseks jagati vanusegruppidesse: 1–2, 3–5, 6–8, 9–12 ja 13–19 kuu vanused. Gruppide koostamisel lähtuti IF-meetodi tulemustest, IFN vastaste autoantikehade tasemest ning valimi suurusest. Kuna seerumeid koguti rottidelt üks kord kuus, siis võis üks rott olla esindatud mitu korda samas vanusegrupis ja ka mitmes vanusegrupis.

Võrreldes Aire-KO ja kontrollrühma rottide autoantikehade tiitreid (joonis 3), leiti, et nii anti-IFN- α 4 kui ka anti-IFN- α 11 autoantikehade tiitrid olid kõikidel Aire-KO rottide

vanusegruppidel oluliselt kõrgemad kui kontrollrühma rottidel. Kuigi autoantikehade tiitrid esinesid juba üksikutel 1–2 kuustel rottidel, siis nii anti-IFN- α 4 kui ka anti-IFN- α 11 autoantikehad ilmnesid enamasti ikkagi 3–5 kuustel rottidel. Vaadates Aire-KO rottide autoantikehade tiitrite dünaamikat ajas, oli näha mõlema subtüübi autoantikehade tiitrite olulist tõusu kuni 9–12 kuu vanuseni. Selles vanuses Aire-KO rottidel olid mõlema IFN subtüübi autoantikehade tiitrid kõige kõrgemad ning nendest vanematel rottidel (13–19 kuud) ei märgatud enam olulist tiitrite muutust ($p>0,05$).



Joonis 3. Anti-IFN- α 4 ja anti-IFN- α 11 tasemed Aire-puudulikel (Aire-KO) ja kontrollrühma rottide vereseerumis. LIPS-meetodiga mõõdeti anti-IFN- α 4 tasemeid (A) ja anti-IFN- α 11 tasemeid (B) Aire-KO ja kontrollrühma rottidel. Graafikute y-teljel on autoantikehade tiitrite suhteline muutus ja x-teljel on rottide vanusegrupid. Graafikutel on kujutatud mõlema genotüübi iga vanusegrupi autoantikehade tiitrite keskmist väärtust $\pm$ standardviga. Vanusegruppide all on väljatoodud Aire-KO rottide arv (mustas) ja kontrollrühma rottide arv (hallis). Statistiliselt oluline erinevus on arvatud paaritu t-testiga (**** $p<0,0001$ ja * $p<0,05$).

Sarnaselt varasemate uuringute tulemustega, leiti ka selles töös, et Aire-KO rottidel on autoantikehade tiitrid võrreldes kontrollrühma rottidega oluliselt kõrgemad ning autoantikehad ilmuvad enamasti 3–5 kuustel rottidel (Ossart *et al.*, 2018; Peltser, 2020). Sümptomeid, nagu allopeetsia, vitiliigo ja küünte düstroofia, täheldati nii käesolevas töös kui ka Stoljar (2020) ja Ossart *et al.* (2018) töös alles >6 kuu vanustel rottidel. Seega nagu näitas ka Peltser (2020) enda töös, tekivad Aire-KO rottidel I tüüpi IFN vastased autoantikehad, nagu ka APECED patsientidel, enne väliste sümptomite ilmumist. Osal Aire-KO rottidel võivad aga IFN vastased autoantikehad tekkida juba 1- või 2-kuuselt ning sellepärast esineb statistiliselt oluline erinevus 1–2 kuu vanuste Aire-KO ja kontrollrühma rottide autoantikehade tiitrite vahel. Siiski täheldati üldist järsku autoantikehade tiitrite tõusu 3–5 kuustel, jättes mulje nagu noortel isenditel (1–2 kuustel) autoantikehad puuduvad ning saades 3–5 kuuseks, ilmuvad need järsku kõrgetes tiitrites. Sellise järsu tõusu nägemine võib olla tingitud LIPS-meetodi ühest puudusest. Nimelt ei ole võimalik LIPS-meetodiga tuvastada seerumis juba eksisteerivaid antigeen-antikeha komplekse, vaid ainult vabu antikehasid.

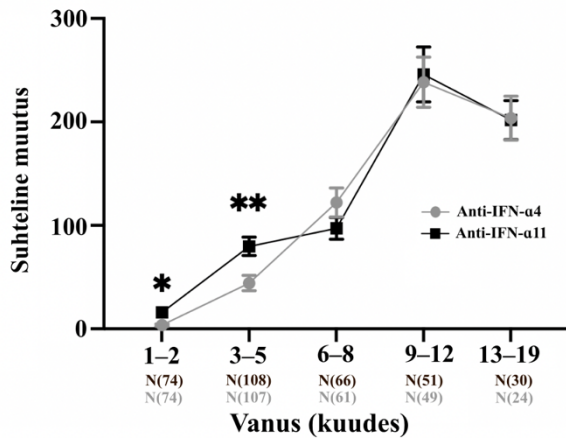
Seega võib juba 1–2 kuu vanustel Aire-KO rottidel olla IFN-ide vastaste autoantikehade tiiter kõrgem ja esineda sujuvam üleminek, kuid kuna enamus autoantikehasid seonduvad veres ringlevate vabade IFN-idega, pole võimalik neid LIPS-meetodiga detekteerida (Watanabe *et al.*, 2007).

Käesolevas töös leiti, et Aire-KO rottidel tekivad I tüüpi IFN-ide vastased autoantikehad enamasti 3–5 kuuselt ning nad saavutavad oma maksimaalsed tiitrid 9–12 kuu vanuselt, pärast mida jäävad tiitrid püsima. Selline autoantikehade dünaamika ajas on sarnane APECED patsientidega, kellel I tüüpi IFN-ide vastaste autoantikehade tiitrid tõusevad vanusega ning püsivad pikka aega stabiilselt kõrged (Meager *et al.*, 2006; Meloni *et al.*, 2008). Antud töös oli aga näha mõlema IFN-i subtüübi autoantikehade puhul tiitrite statistiliselt mitteolulist langust 13–19 kuustel Aire-KO rottidel. Eelkirjeldatud languse põhjuseks võib olla antud juhul väiksem valim, mistõttu kõrvalekalded võisid tiitrite keskväärtust tugevasti mõjutada. Edaspidi tuleks selle vanusegrupi valimit suurendada, mis võimaldaks kinnitada antud töös saadud tulemust, et tiitrite langust ei esine, või hoopis tõestada tiitrite langust 13–19 kuu vanustel Aire-KO rottidel. Sellegipoolest omavad Aire-KO rotid APECED haigetega sarnast I tüüpi IFN-ide vastaste autoantikehade dünaamikat ning see muudab nad heaks mudelorganismiks, et uurida haiguse autoantikehadega seotud aspekte.

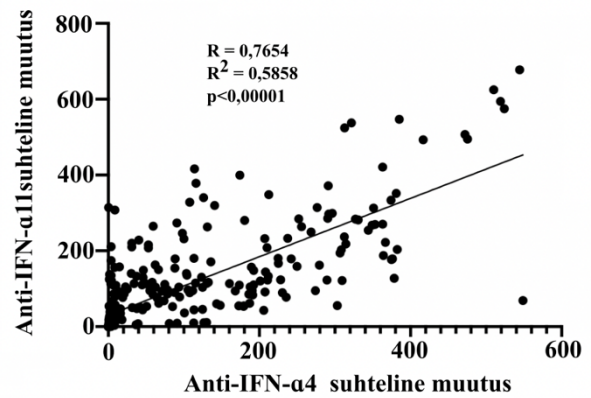
2.3.2. Anti-IFN- α 4 ja anti-IFN- α 11 vastaste autoantikehade tootmine on omavahel korrelatsioonis

Järgnevalt võrreldi IFN- α 4 ja IFN- α 11 vastaste autoantikehade tiitrite dünaamikat ajas. Leiti, et anti-IFN- α 11 autoantikehade tiitrid olid 1–2 ja 3–5 kuu vanustel Aire-KO rottidel oluliselt kõrgemad kui anti-IFN- α 4 autoantikehade tiitrid (joonis 4A). Kuid alates 6–8 kuust ei esine nende vahel enam statistiliselt olulist erinevust. Kasutades Pearsoni analüüsi leiti, et anti-IFN- α 4 ja anti-IFN- α 11 autoantikehade tiitrid on omavahel positiivses korrelatsioonis, Pearsoni koefitsient 0,7654 ($p < 0,00001$) (joonis 4B). Seega Aire-KO rottidel, kellel on kõrged anti-IFN- α 4 autoantikeha tiitrid, on sageli ka kõrged IFN- α 11 vastased autoantikeha tiitrid ning vastupidi.

A



B



Joonis 4. Anti-IFN- α 4 ja anti-IFN- α 11 autoantikehade tiitrite omavaheline seos. LIPS-meetodiga mõõdeti anti-IFN- α 4 tasemeid ja anti-IFN- α 11 tasemeid Aire-puudulikel (Aire-KO) rottidel. Graafiku A y-teljel on autoantikehade tiitrite suhteline muutus ja x-teljel on rottide vanusegrupid. Graafikul on kujutatud iga vanusegrupi autoantikehade tiitrite keskmist väärtust $\pm$ standardviga. X-telje vanusegruppide all on väljatoodud anti-IFN- α 4 autoantikehade tiitrite mõõtmisel (mustas) ja anti-IFN- α 11 autoantikehade tiitrite mõõtmisel (hallis) kasutatud rottide arv. Statistiliselt oluline erinevus on arvatud paaritu t-testiga (** $p < 0,01$ ja * $p < 0,05$). Graafiku B y-teljel on anti-IFN- α 11 autoantikehade tiitrite suhteline muutus ja x-teljel anti-IFN- α 4 autoantikehade tiitrite suhteline muutus. Graafikul B on kujutatud 314 seerumi proovi autoantikehade tiitrite väärtusi ning välja on toodud Pearsoni korrelatsiooni koefitsient.

Üheks võimalikuks põhjuseks, miks anti-IFN- α 11 autoantikehade tiitrid on noortel Aire-KO rottidel kõrgemad kui anti-IFN- α 4 autoantikehade tiitrid, võib olla IFN- α 11 varasem sünteesimine. Kui rottidel hakatakse tootma IFN- α 11 enne kui IFN- α 4, siis võib seda olla alguses rohkem kui IFN- α 4 ning seega toodetakse ka rohkem anti-IFN- α 11 autoantikehasid. Sellisel juhul erineksid rotid hiirtest, kellel on IFN- α 4 üks esimesi toodetavaid IFN- α subtüüpe (Marié *et al.*, 1998). Rottidel pole aga eraldi IFN- α subtüüpide funktsioone ja dünaamikat uuritud. Seetõttu tuleks töös leitud fenomeni, mille kohaselt IFN- α 11 võidakse toota varem kui IFN- α 4, edasi uurida. Võttes arvesse mõlema subtüübi vastaste autoantikehade samaaegset ilmumist ja nendevahelist korrelatsiooni, siis võib oletada, et ka teiste IFN- α subtüüpide vastu tekivad autoantikehad samaaegselt ning neil on sarnane esinemise dünaamika ajas. Sellest tulenevalt võib järeldada, et erinevate subtüüpide vastaste antikehade teke pole seotud epitoobi levikuga.

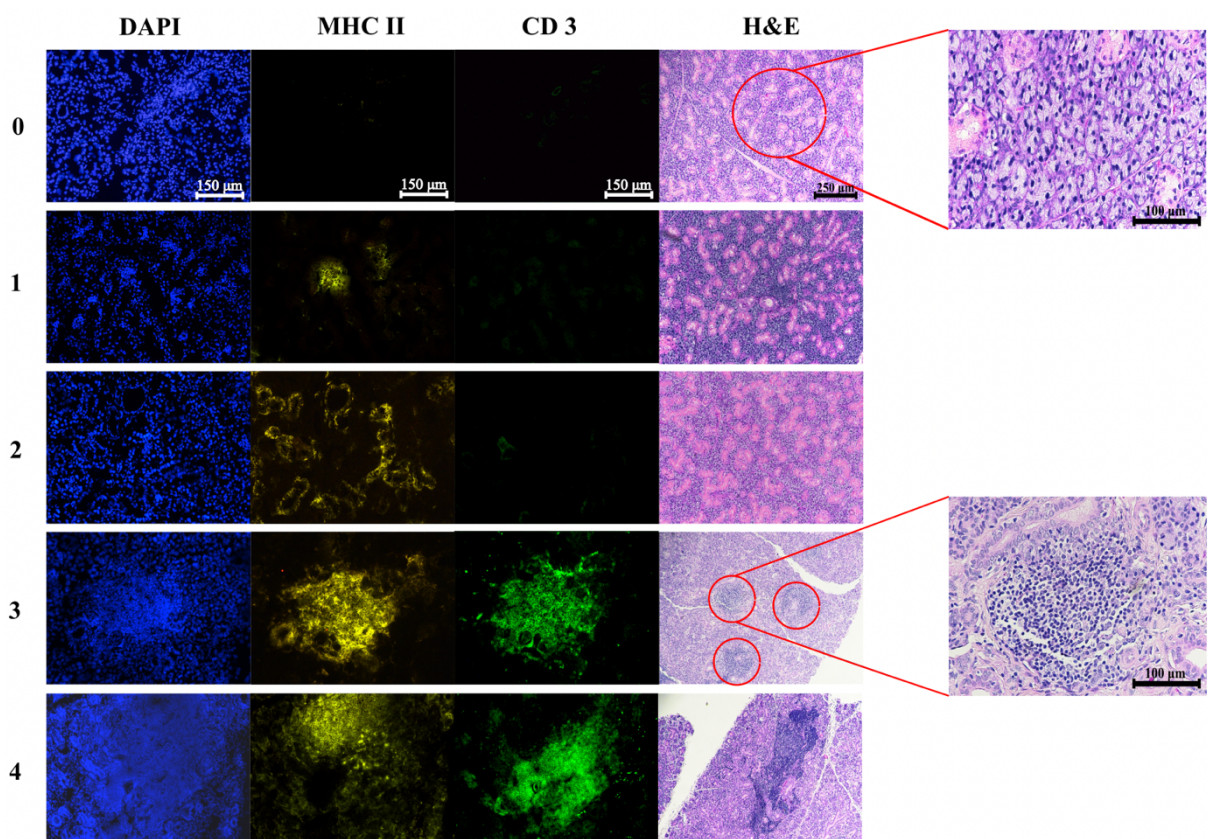
2.3.3. 3–5 kuu vanustel rottidel infiltreeruvad immuunrakud süljenäärmesse ja hiljem infiltraadid taanduvad

Antud uurimistöö teine eesmärk oli kirjeldada Aire-puudulikkusest tingitud põletiku muutumist ajas. Mudelkoena kasutati süljenääret, sest eelnevalt on kirjeldatud põletiku olemasolu umbes 4-kuustel Aire-KO rottidel, kuid vanemate loomade kohta info puudub (Ossart *et al.*, 2018; Stoljar, 2020). Süljenäärme uurimiseks vaadati immunofluorestsents-

mikroskoopia abil CD3⁺ rakke, milleks on enamasti T-rakud, ning MHC II⁺ rakke, milleks on enamasti B-rakud, dendriitrakud ja makrofaagid. Põletiku olukorras hakkab ka süljenäärme näärmeline osa ekspresseerima MHC II. Põletiku dünaamika paremaks analüüsimiseks loodi 0–4 punktiline fenotüübil põhinev põletiku raskusastme skaala (joonis 5):

- Skoor 0 – ei täheldatud ei CD3 ega MHC II ekspressiooni.
- Skoor 1 – üksikud väiksed MHC II⁺CD3⁻ rakkude infiltraadid juhade ümber.
- Skoor 2 – puudusid infiltraadid aga terve koe näärmeline osa ekspresseeris MHC II.
- Skoor 3 – esinesid keskmise suurusega infiltraadid, kus olid selgelt eristatavad MHC II⁺ ja CD3⁺ rakkude alad ning näärmeline osa ekspresseeris MHC II.
- Skoor 4 – esinesid väga suured infiltraadid, kus olid selgelt eristatavad MHC II⁺ ja CD3⁺ rakkude alad ning näärmeline osa ekspresseeris MHC II.

Põletiku raskusastme skaala iga skoori kõrvale valiti sarnane hematoksüliini ja eosiiniga töödeldud süljenääre rottidest, kes olid sarnase vanuse ja genotüübiga nagu IF-analüüsis kasutatavad rotid.

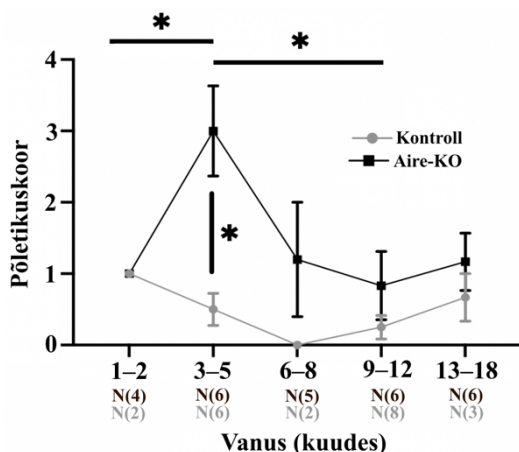


Joonis 5. Süljenäärme põletiku raskusastme skaala referents. Vasakul pool on välja toodud iga skoori kohta (0–4) käivad näidis immunofluorestsentspildid 200× suurendusega nii DAPI, CD3 kui ka MHC II värvingust. Paremal pool on igale skoorile iseloomulik hematoksüliini ja eosiini (H&E) värvinguga pilt 100× ja 400× suurendusega.

Kokku uuriti IF-iga 27 Aire-KO roti ja 21 kontrollrühma roti süljenäärret. Rottide vanuseks oli 1–18 kuud. Statistiliseks analüüsiks jaotati rotid vanusegruppidesse: 1–2, 3–5, 6–8, 9–12 ja 13–18 kuud. Põletiku raskusastme hindamisel ei arvestatud fluorestsentsi signaalitugevust, kuna see varieerus katsest katsesse, vaid hinnati signaali esinemise ulatust preparaatides visuaalselt. Vanusegruppide võrdlemiseks kasutati kahepoolset Mann-Whitney U-testi.

Kuna katses kasutatud kontrollrühma rottide põletikuskoorid olid 0 või 1, siis loeti need normaalseteks füsioloogilisteks seisunditeks ehk põletiku puudumiseks (joonis 6). Kuna skoor 1 puhul puudusid T-rakud ning kogumike moodustavad rakud olid ebaregulaarse kujuga, võis tegemist olla B-rakkude asemel hoopis dendriitrakkude või makrofaagide kogumikega, mis ekspresseerivad MHC II ning esinevad ka normaalolukorras süljenäärmetes.

Esmalt võrreldi omavahel Aire-KO ja kontrollrühma rotte. Leiti, et 1–2 kuuste Aire-KO rottide süljenäärmed sarnanesid samaealiste kontrollrühma rottide süljenäärmetega, omades mõlemal juhul skoori 1. Süljenääre muutus põletikuliseks alles 3–5 kuustel rottidel, kelle esindajaid hinnati teiste vanusegruppidega võrreldes enamasti kõige kõrgema skooriga (skoor 4). 3–5 kuuste Aire-KO rottide vanusegrupp oli ka ainus, mis erines oluliselt sama vanusegrupi kontrollrühma rottidest ($p < 0,05$). Nendest vanematel rottidel, 6–18 kuu vanustel, oli aga näha põletiku olulist taandumist. Kui võrreldi Aire-KO rottidel põletiku raskusastmeid vanusegruppide vahel, siis esinesid statistiliselt olulised erinevused ainult 1–2 ja 3–5 ning 3–5 ja 9–12 kuuste Aire-KO rottide vahel. Teiste vanusegruppide omavahelisel võrdlemisel olulisi erinevusi ei leitud.



Joonis 6. Süljenäärme põletiku raskusastme muutus sõltuvalt vanusest. Immuno-fluorestsentsmikroskoobiga hinnati nii Aire-puudulike (Aire-KO) kui ka kontrollrühma rottide süljenäärme põletiku raskusastet skaalal 0–4. Graafiku y-teljel on põletiku raskusastme skoor ning x-teljel on rottide vanusegrupid. Graafikul on kujutatud iga vanusegrupi põletikuskoori keskmist väärtust $\pm$ standardviga. Vanusegruppide all on väljatoodud analüüsis kasutatud Aire-KO rottide arv (mustas) ja kontrollrühma rottide arv (hallis). Statistiliselt oluline erinevus on arvutatud algandmete põhjal kahepoolse Mann-Whitney U-testiga, kus $*p < 0,05$.

Saadud tulemustest võib oletada, et 1–2 kuu vanustel Aire-KO rottidel ei esine süljenäärme põletikku, sest nii noortel pole veel jõudnud tekkida autoimmuunvastust süljenäärme vastu. 3–5 kuu vanustel Aire-KO rottidel on aga süljenäärme põletik kõige intensiivsem, omades suuri immuuninfiltraate. Nendes esinevad nii B-rakud, mis tõenäoliselt toodavad süljenäärme vastaseid autoantikehasid, kui ka autoreaktiivsed T-rakud. T-rakkudest esinevad seal arvatavasti tsütotoksilised T-rakud, mis hävitavad süljenäärme rakke, ning abistaja T-rakud, mis osalevad immuunvastuse kujundamises. Vanematel rottidel (6–18 kuud) hakkab aga põletik taanduma: B- ja T-rakud lahkuvad süljenäärdest ning immunofluorestsentsanalüüsi pilt hakkab sarnanema kontrollrühma rottide süljenäärmetega.

Põletiku taandumise põhjuseks vanematel rottidel võib olla funktsionaalsete rakkude hävimine, mille tulemusena lümfotsüütidele spetsiifilist antigeeni süljenäärdest enam ei ekspresseerita ja seega pole immuunrakkudel millegi vastu enam võidelda. Selle hüpoteesi kontrollimiseks tuleks teha süljenäärmetele ka RT-qPCR analüüs, et välja selgitada süljenäärmele iseloomulike funktsionaalsete geenide ekspressioon pärast viiendat elukuud. Samas ei erinenud vanemate Aire-KO rottide IF ja H&E süljenäärme preparaadid visuaalselt kontrollrühma rottide süljenäärmetest ehk puudusid viited ulatuslikust koehävingust. Seega võivad mängus olla mingid teised faktorid, nt neutraliseerivad autoantikehad, mis pärssivad autoimmuunvastust.

Saadud tulemuste üheks puuduseks on väike valim. Kinnitamaks töös väljapakutud süljenäärme põletiku dünaamikat ajas, tuleks vanusegruppide valimit suurendada. Väikese valimi tõttu mõjutavad kõrvalekalded (ingl *outliers*) oluliselt tulemusi. Näiteks 6–8 kuuste Aire-KO rottide seas on üks rott skooriga 4, mis muudab selle grupi standardvea väga suureks ning seetõttu puudub statistiliselt oluline erinevus 3–5 kuustest rottidest. Sellegipoolest saab kindlalt öelda, et pärast 5. kuud põletiku intensiivsus langeb oluliselt, mida kinnitab statistiliselt oluline erinevus ($p=0,014$) 3–5 ja 6–18 kuu vanuste Aire-KO rottide gruppide vahel.

2.3.4. 11 kuu vanuste Aire-KO rottide süljenäärmete lümfotsüütiline koostis

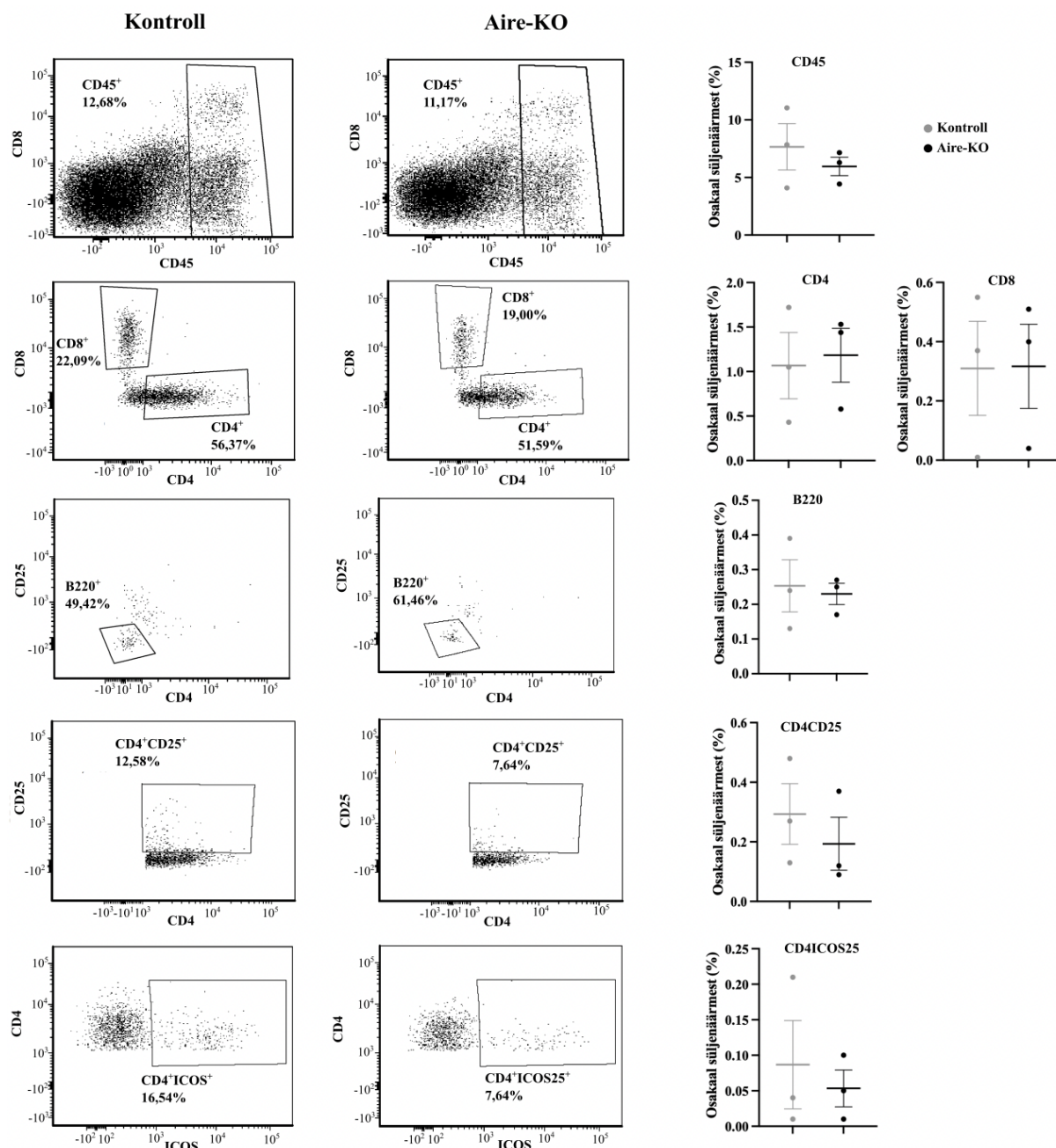
Kuna IF-analüüsis ei leitud vanematel rottidel nähtavaid infiltraate, otsustati uurida lähemalt voolutsütomeetriaga u 11 kuu vanuse kolme Aire-KO ja kolme kontrollrühma roti süljenäärme lümfotsüütilist koostist. Analüüsis vaadati kuue rakupopulatsiooni (tabel 3) osakaalu süljenäärmetes, et leida võimalikke muutusi autoimmuunvastuses osalevate rakkude populatsioonide vahel.

Tabel 3. Töös kasutatud rakumarkerid ja neile vastavad rakutüübid.

Rakuprofiil*	Rakutüüp
CD45 ⁺	Lümfotsüüt
CD45 ⁺ B220 ⁻ CD3 ⁺ CD4 ⁺	Abistaja T-lümfotsüüt
CD45 ⁺ B220 ⁻ CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺	Regulatoorne T-lümfotsüüt
CD45 ⁺ B220 ⁻ CD3 ⁺ CD4 ⁺ ICOS ⁺	Aktiveeritud abistaja T-lümfotsüüt
CD45 ⁺ B220 ⁻ CD3 ⁺ CD8 ⁺	Tsütotoksiline T-lümfotsüüt
CD45 ⁺ B220 ⁺	B-lümfotsüüt

*Elusatest ja mitteaggregeerunud rakkudest

Tulemuste analüüsil kahepoolse paaritu t-testiga ei leitud ühegi rakutüübi puhul statistiliselt olulist erinevust genotüüpide vahel (joonis 7). Seega saadi kinnitust IF-tulemustele, mille kohaselt ei esine 11 kuu vanustel Aire-KO rottidel süljenäärmete põletikku. Kusjuures voolutsütomeetrias kasutatud kahel kontrollrühma rotil olid põletikuskooriks 0 ja kolmandal kontrollrühma rotil skooriks 1. Aire-KO rottidel oli põletikuskooriks aga vastavalt 0, 1 ja 3. Huvitaval kombel ei erinenud kõrgema skooriga Aire-KO rotil uuritavate immuunrakkude arv madalama skooriga Aire-KO rottide omast. Selle üks põhjus võib tuleneda meetodikast, kus peaaegu kogu süljenääre homogeniseeritakse ja kolletena lokaliseeritud immuunrakud hajuvad ning seetõttu erinevus kontrollide ja KO-de vahel suuresti kaob. Samuti võisid infiltraadid olla ainult selles süljenäärme osas, mida analüüsiti IF-iga. Edaspidi võiks suurendada valimit, sest praegu on varieeruvus rottide vahel päris suur. Kuna infiltraadid asuvad süljenäärmes kolletena, siis peaks edaspidi kasutama voolutsütomeetrias roti terviklikku süljenääret, et vältida infiltreerunud osa juhuslikku väljajäämist analüüsist.

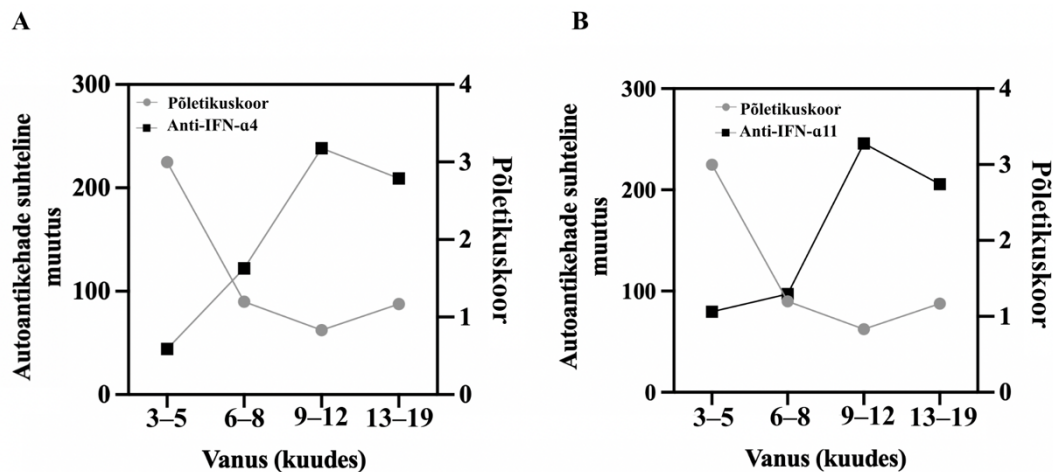


Joonis 7. Süljenäärmete lümfotsüütiline koostis. Voolutsütomeetriga loendati erinevaid lümfotsüüte Aire-puudulike (Aire-KO) ja kontrollrühma rottide süljenäärme proovides. Vasakul pool on uuritavaid rakke kujutavad punktdiagrammid (ingl *dot plots*), kus on toodud välja rakutüübi protsent vanempopulatsioonist. Paremal pool on uuritavate rakupopulatsioonide analüüsimisel saadud graafikud rakkude osakaalu kohta igas roti süljenäärmes. Lisaks on välja toodud tulemuste keskmine väärtus $\pm$ standarddviiga. Graafikutel on väljatoodud uuritavad rakumarkerid, y-teljel on uuritavate rakkude osakaal süljenäärmes ja x-teljel on võrdlus Aire-KO ja kontrollrühma rottide vahel.

2.3.5. Süljenäärme põletiku ja autoantikehade tiitrite dünaamika on negatiivses korrelatsioonis

Kuna antud töös leiti, et süljenäärme põletiku raskusaste väheneb Aire-KO rottidel vanusega, ent kude näeb struktuurselt terve välja, siis analüüsiti põletiku ja autoantikehade tiitrite dünaamikate omavahelist seost. Analüüsist jäeti välja 1–2 kuu vanused Aire-KO rotid, sest

neil ei ole enamasti autoantikehi ega põletikku tekkinud. Kasutades Spearmani korrelatsioonianalüüsi leiti, et põletiku raskusastme ja anti-IFN- α 4 ning anti-IFN- α 11 autoantikehade tiitrite muutus ajas on negatiivses korrelatsioonis, mõlemal juhul on Spearmani koefitsient -1 ja $p=0,083$ (Joonis 8). Seega samal ajal kui Aire-KO rottidel hakkavad autoantikehade tiitrid vanusega tõusma, siis põletiku raskusaste hakkab langema. Saadud korrelatsiooni usaldusväärsuse seab aga mõneti kahtluse alla statistiliselt olulise erinevuse puudumine, sest Spearmani korrelatsioonikordaja p -väärtuseks saadi 0,083. See tuleneb asjaolust, et analüüsis kasutati nii LIPS-meetodi valimi autoantikehade tiitrite kui ka IF-meetodi valimi põletiku raskusastmete keskmisi väärtusi.



Joonis 8. I tüüpi IFN vastaste autoantikehade tiitrite dünaamika ja süljenäärme põletiku dünaamika vaheline seos. LIPS- ja IF-meetoditega määrati vastavalt anti-IFN- α 4 (A) ja anti-IFN- α 11 (B) autoantikehade tiitrite ning süljenäärme põletiku dünaamika Aire-puudulikel rottidel. Graafikute vasakul y-teljel on vastavate autoantikehade suhteline muutus, paremal y-teljel on põletikuskoor ja x-teljel on rottide vanusegrupid. Graafikul on kujutatud iga vanusegrupi autoantikehade tiitrite ja põletikuskoores keskmisi väärtusi.

Sellegipoolest on joonisel 8 näha selgeid negatiivseid trende, mis võivad viidata süljenäärme põletiku ja potentsiaalselt ka teiste organite autoimmuunpõletike mahasurumisele anti-IFN- α neutraliseerivate autoantikehade poolt Aire-KO rottides. Saadud tulemust toetab asjaolu, et mitmetel autoimmuunhaigustel, sh Sjögreni sündroomil, on näidatud I tüüpi IFN-ide osalemist patogeneesis ning sellepärast on peetud nende haiguste sümptomite pärssimise üheks potentsiaalseks viisiks I tüüpi IFN-ide neutraliseerimist (Chasset *et al.*, 2021; Hall *et al.*, 2015). Sellist mehhanismi on juba näidatud Meyer *et al.* (2016) poolt avaldatud töös, milles leiti, et anti-IFN- α neutraliseerivad autoantikehad võivad kaitsta APECED haigeid I tüüpi diabeedi kujunemise eest. Käesolevas töös läbiviidud katsed ja analüüsid samas ei tõesta kindlalt, et üks nähtus on teisest tingitud. Seega, selgitamaks välja autoantikehade bioloogilist toimet autoimmuunsuse mahasurumisele Aire-KO rottides, tuleks läbi viia edasisi uuringuid.

KOKKUVÕTE

Immuunsüsteem peab organismi efektiivseks kaitseks olema võimeline eristama kehaomaseid ja -võõraid antigeene, vastasel korral hakatakse ründama ka organismi enda rakke, põhjustades seeläbi autoimmuunhaigusi. Tolerantsuse tagamise üheks võtmevalguks on autoimmuunne regulaator (AIRE), mis takistab autoreaktiivsete T-lümfotsüütide sattumist perifeeriasse. Aire-puudulikkuse korral kujuneb inimestel haruldane autosoom-retsessiivne haigus APECED (autoimmuunne polüendokrinopaatia-kandidoos-ektodermaalne düstroofia), millele on omane erinevate kudede ja organite kahjustus, põletik ning I tüüpi interferoonide vastased autoantikehad. APECED on hea mudelhaigus uurimaks tsentraalse tolerantsuse kujunemist ning selle häiretest tingitud autoimmuunfenotüüpi. Antud haiguse uurimiseks on loodud mitmeid loomudeleid. Neist kõige informatiivsem aga samas vähe uuritud on Aire-puudulik (Aire-KO) rotimudel.

Käesoleva töö eesmärkideks oli uurida Aire-puudulikel rottidel I tüüpi IFN- α subtüüpide vastaste autoantikehade dünaamikat ajas IFN- α 4 ja IFN- α 11 näitel, kirjeldada süljenäärme põletiku dünaamikat ajas ning leida võimalik seos nende kahe näitaja vahel. Töö tulemused kinnitasid, et erinevate I tüüpi IFN- α subtüüpide vastased autoantikehad tekivad enamasti 3–5 kuu vanustel Aire-KO rottidel ehk ajaliselt enne teiste Aire-puudulikkusest tingitud silmnähtavate sümptomite avaldumist. Selgus, et anti-IFN- α autoantikehade tiitrid tõusevad ajas pidevalt ning 9–12 kuu vanustel rottidel jõuavad tiitrid maksimumini ja jäävad püsima saavutatud tasemel. Läbiviidud analüüsides tulemusena selgus, et kõige raskekujulisem süljenäärme põletik esineb 3–5 kuustel rottidel. Vanematel rottidel aga põletik taandub, kuna neil ei leitud suuri infiltraate ning süljenäärme lümfotsüütiline koostis sarnanes kontrollrühma rottidel leitudga. Tulemustest ilmnes, et anti-IFN- α autoantikehade tiitrite dünaamika võib olla negatiivses korrelatsioonis süljenäärme põletiku dünaamikaga. Saadud tulemuste põhjal võib oletada, et anti-IFN- α autoantikehad pärivad Aire-KO rottide autoimmuunpõletike kujunemist.

The dynamics of type I interferon autoantibodies and salivary gland inflammation in Aire-deficient rats

Elise Helena Armulik

SUMMARY

Autoimmune diseases can occur when autoreactive T-lymphocytes, which are lymphocytes that recognize self-antigens, escape from the thymus and start attacking the body's own tissues and organs. APECED (autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy) is a rare recessive autoimmune disease caused by loss of function mutations in the autoimmune regulator (*AIRE*) gene. Normally this gene is responsible for the development of central tolerance through the recognition of autoreactive thymocytes and their subsequent elimination. Thus, numerous tissues and organs are under attack in APECED patients, resulting in inflammation. Despite the highly variable phenotype of APECED in different patients, all cases are characterized by the development of type I interferon (IFN) autoantibodies before the onset of other symptoms. To further study the disease mouse and rat models have been constructed with the latter being the more promising and yet least studied of the two.

The aim of this study was to systematically analyze the dynamics of type I IFN- α autoantibodies and salivary gland inflammation over time in Aire-deficient rats. We corroborate previous findings which have indicated the development of type I IFN autoantibodies mostly in three to five-month-old Aire-KO rats prior to the onset of other symptoms induced by Aire-deficiency. We found that the production of IFN- α increases continuously and reaches its peak in nine to twelve-month-old rats, after which it remains stable. It was observed that the most severe inflammation occurred in three to five-month-old Aire-KO rats. Inflammation decreased after the peak and salivary glands began to resemble those of healthy heterozygous rats. The resemblance was confirmed with immunofluorescence microscopy and flowcytometry. A possible negative correlation between the salivary gland inflammation dynamics and anti-IFN- α autoantibody dynamics was found, thus suggesting that anti-IFN autoantibodies may protect Aire-KO rats against the development of autoimmune inflammations.

TÄNUSÕNAD

Soovin tänada kõiki enda juhendajaid Artur Stoljarit, Martti Laant ja Sulev Kuuset, kes alati olid valmis mind aitama, kui ma seda vajasin. Eriti suured tänusõnad Arturile, kes juhendas mind kõigi erinevate katsete tegemisel. Tänan veelkord Marttit, kes oli koos Arturiga mulle töö koostamisel suureks toeks ja Sulevit, kes oli suureks abiks loomkatsete läbiviimisel.

Samuti soovin tänada meie uurimisgrupi juhti Pärt Petersoni, kes andis mulle võimaluse teha huvitavat tööd nii toredas laboris. Tänusõnad ka kõikidele teistele molekulaarpatoloogia töögrupi liikmetele, kes olid alati väga abivalmid ja toetavad.

KASUTATUD ALLIKAD

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. 2017. Cellular and Molecular Immunology, 9th edition, p. 3–6, 10, 21–23, 82, 119–127, 419–425. Elsevier, Philadelphia.
- Ahonen, P., Myllärniemi, S., Sipilä, I., & Perheentupa, J. (1990). Clinical variation of autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED) in a series of 68 patients. *The New England Journal of Medicine*, 322(26), 1829–1836. <https://doi.org/10.1056/NEJM199006283222601>
- Alam, S. M., Travers, P. J., Wung, J. L., Nasholds, W., Redpath, S., Jameson, S. C., & Gascoigne, N. R. (1996). T-cell-receptor affinity and thymocyte positive selection. *Nature*, 381(6583), 616–620. <https://doi.org/10.1038/381616a0>
- Anderson, M. S., Venanzi, E. S., Klein, ... Mathis, D. (2002). Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science (New York, N.Y.)*, 298(5597), 1395–1401. <https://doi.org/10.1126/science.1075958>
- Besnard, M., Padonou, F., Provin, N., Giraud, M., & Guillonneau, C. (2021). AIRE deficiency, from preclinical models to human APECED disease. *Disease Models & Mechanisms*, 14(2), dmm046359. <https://doi.org/10.1242/dmm.046359>
- Bonilla, F. A., & Oettgen, H. C. (2010). Adaptive immunity. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2 Suppl 2), S33-40. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.017>
- Borchers, J., Pukkala, E., Mäkitie, O., & Laakso, S. (2020). Patients With APECED Have Increased Early Mortality Due to Endocrine Causes, Malignancies and infections. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 105(6), e2207–e2213. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgaa140>
- Bowman, S. J. (2018). Primary Sjögren's syndrome. *Lupus*, 27(1_suppl), 32–35. <https://doi.org/10.1177/0961203318801673>

- Boyman, O., Kovar, M., Rubinstein, M. P., Surh, C. D., & Sprent, J. (2006). Selective stimulation of T cell subsets with antibody-cytokine immune complexes. *Science (New York, N.Y.)*, 311(5769), 1924–1927. <https://doi.org/10.1126/science.1122927>
- Cappellano, G., Orilieri, E., Woldetsadik, A. D., Boggio, E., Soluri, M. F., Comi, C., Sblattero, D., Chiocchetti, A., & Dianzani, U. (2012). Anti-cytokine autoantibodies in autoimmune diseases. *American Journal of Clinical and Experimental Immunology*, 1(2), 136–146.
- Chasset, F., Dayer, J.-M., & Chizzolini, C. (2021). Type I Interferons in Systemic Autoimmune Diseases: Distinguishing Between Afferent and Efferent Functions for Precision Medicine and Individualized Treatment. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 633821. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.633821>
- Courtney, L. P., Phelps, J. L., & Karavodin, L. M. (1994). An anti-IL-2 antibody increases serum half-life and improves anti-tumor efficacy of human recombinant interleukin-2. *Immunopharmacology*, 28(3), 223–232. [https://doi.org/10.1016/0162-3109\(94\)90058-2](https://doi.org/10.1016/0162-3109(94)90058-2)
- Derbinski, J., Schulte, A., Kyewski, B., & Klein, L. (2001). Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nature Immunology*, 2(11), 1032–1039. <https://doi.org/10.1038/ni723>
- Elkon, K., & Casali, P. (2008). Nature and functions of autoantibodies. *Nature Clinical Practice. Rheumatology*, 4(9), 491–498. <https://doi.org/10.1038/ncprheum0895>
- Gibbert, K., Joedicke, J. J., Meryk, A., Trilling, M., Francois, S., Duppach, J., Kraft, A., Lang, K. S., & Dittmer, U. (2012). Interferon-alpha Subtype 11 Activates NK Cells and Enables Control of Retroviral Infection. *PLoS Pathogens*, 8(8), e1002868. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002868>

- Gibbert, K., Schlaak, J., Yang, D., & Dittmer, U. (2013). IFN- α subtypes: Distinct biological activities in anti-viral therapy. *British Journal of Pharmacology*, 168(5), 1048–1058. <https://doi.org/10.1111/bph.12010>
- Hall, J. C., Baer, A. N., Shah, A. A., Criswell, L. A., Shiboski, C. H., Rosen, A., & Casciola-Rosen, L. (2015). Molecular Subsetting of Interferon Pathways in Sjogren's syndrome. *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.)*, 67(9), 2437–2446. <https://doi.org/10.1002/art.39204>
- Heino, M., Peterson, P., Kudoh, J., ... Krohn, K. (1999). Autoimmune regulator is expressed in the cells regulating immune tolerance in thymus medulla. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 257(3), 821–825. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.0308>
- Hubert, F.-X., Kinkel, S. A., Crewther, P. E., ... Scott, H. S. (2009). Aire-Deficient C57BL/6 Mice Mimicking the Common Human 13-Base Pair Deletion Mutation Present with Only a Mild Autoimmune Phenotype. *The Journal of Immunology*, 182(6), 3902–3918. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0802124>
- Jiang, W., Anderson, M. S., Bronson, R., Mathis, D., & Benoist, C. (2005). Modifier loci condition autoimmunity provoked by Aire deficiency. *The Journal of Experimental Medicine*, 202(6), 805–815. <https://doi.org/10.1084/jem.20050693>
- Jirsova, K., Seidler Stangova, P., Palos, M., Mahelkova, G., Kalasova, S., Rybickova, I., Utheim, T. P., & Vesela, V. (2020). Aberrant HLA-DR expression in the conjunctival epithelium after autologous serum treatment in patients with graft-versus-host disease or Sjögren's syndrome. *PloS One*, 15(4), e0231473. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231473>
- Kisand, K., Link, M., Wolff, A. S. B., ... Peterson, P. (2008). Interferon autoantibodies associated with AIRE deficiency decrease the expression of IFN-stimulated genes. *Blood*, 112(7), 2657–2666. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-03-144634>

- Kitamura, T., Tanaka, N., Watanabe, J., Uchida, Kanegasaki, S., Yamada, Y., & Nakata, K. (1999). Idiopathic Pulmonary Alveolar Proteinosis as an Autoimmune Disease with Neutralizing Antibody against Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor. *The Journal of Experimental Medicine*, 190(6), 875–880.
- Kondo, K., Ohigashi, I., & Takahama, Y. (2018). Thymus machinery for T-cell selection. *International Immunology*, 31(3), 119–125. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxy081>
- Kumar, B. V., Connors, T., & Farber, D. L. (2018). Human T cell development, localization, and function throughout life. *Immunity*, 48(2), 202–213. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.01.007>
- Kuroda, N., Mitani, T., Takeda, N., ... Matsumoto, M. (2005). Development of Autoimmunity against Transcriptionally Unrepressed Target Antigen in the Thymus of Aire-Deficient Mice. *The Journal of Immunology*, 174(4), 1862–1870. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.4.1862>
- Li, Q., Xu, B., Michie, S. A., Rubins, K. H., Schreiber, R. D., & McDevitt, H. O. (2008). Interferon- α initiates type 1 diabetes in nonobese diabetic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(34), 12439–12444. <https://doi.org/10.1073/pnas.0806439105>
- Liston, A., Lesage, S., Wilson, J., Peltonen, L., & Goodnow, C. C. (2003). Aire regulates negative selection of organ-specific T cells. *Nature Immunology*, 4(4), 350–354. <https://doi.org/10.1038/ni906>
- Marié, I., Durbin, J. E., & Levy, D. E. (1998). Differential viral induction of distinct interferon-alpha genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7. *The EMBO Journal*, 17(22), 6660–6669. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.22.6660>
- Meager, A., Visvalingam, K., Peterson, P., ... Willcox, N. (2006). Anti-Interferon Autoantibodies in Autoimmune Polyendocrinopathy Syndrome Type 1. *PLoS Medicine*, 3(7), e289. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030289>

- Meager, A., & Wadhwa, M. (2014). Detection of anti-cytokine antibodies and their clinical relevance. *Expert Review of Clinical Immunology*, 10(8), 1029–1047. <https://doi.org/10.1586/1744666X.2014.918848>
- Meager, A., Wadhwa, M., Dilger, P., Bird, C., Thorpe, R., Newsom-Davis, J., & Willcox, N. (2003). Anti-cytokine autoantibodies in autoimmunity: Preponderance of neutralizing autoantibodies against interferon-alpha, interferon-omega and interleukin-12 in patients with thymoma and/or myasthenia gravis. *Clinical and Experimental Immunology*, 132(1), 128–136. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2003.02113.x>
- Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454(7203), 428–435. <https://doi.org/10.1038/nature07201>
- Meloni, A., Furcas, M., Cetani, F., ... Meager, A. (2008). Autoantibodies against type I interferons as an additional diagnostic criterion for autoimmune polyendocrine syndrome type I. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 93(11), 4389–4397. <https://doi.org/10.1210/jc.2008-0935>
- Meyer, S., Woodward, M., Hertel, C., Vlaicu, P., Haque, Y., Kärner, J., Macagno, A., Onuoha, S. C., Fishman, D., Peterson, H., Metsküla, K., Uibo, R., Jäntti, K., Hokynar, K., Wolff, A. S. B., Krohn, K., Ranki, A., Peterson, P., Kisand, K., & Hayday, A. (2016). AIRE-Deficient Patients Harbor Unique High-Affinity Disease-Ameliorating Autoantibodies. *Cell*, 166(3), 582–595. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.024>
- Moll, H. P., Maier, T., Zommer, A., Lavoie, T., & Brostjan, C. (2011). The differential activity of interferon- α subtypes is consistent among distinct target genes and cell types. *Cytokine*, 53(1), 52–59. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2010.09.006>
- Nagamine, K., Peterson, P., Scott, H. S., ... Shimizu, N. (1997). Positional cloning of the APECED gene. *Nature Genetics*, 17(4), 393–398. <https://doi.org/10.1038/ng1297-393>
- Ossart, J., Moreau, A., Autrusseau, E., ... Guillonneau, C. (2018). Breakdown of immune tolerance in AIRE-deficient rats induces a severe autoimmune polyendocrinopathy–

- candidiasis–ectodermal dystrophy–like autoimmune disease. *The Journal of Immunology*, 201(3), 874–887. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701318>
- Parkin, J., & Cohen, B. (2001). An overview of the immune system. *Lancet (London, England)*, 357(9270), 1777–1789. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04904-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04904-7)
- Peltser, M. (2020). *Autoantikehade teke Aire-puudulikul rotil*. Tartu Ülikool.
- Perniola, R. (2018). Twenty years of AIRE. *Frontiers in Immunology*, 9, 98. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00098>
- Pöntynen, N., Miettinen, A., Arstila, T. P., Kämpe, O., Alimohammadi, M., Vaarala, O., Peltonen, L., & Ulmanen, I. (2006). Aire deficient mice do not develop the same profile of tissue-specific autoantibodies as APECED patients. *Journal of Autoimmunity*, 27(2), 96–104. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2006.06.001>
- Powell, A. M., & Black, M. M. (2001). Epitope spreading: Protection from pathogens, but propagation of autoimmunity? *Clinical and Experimental Dermatology*, 26(5), 427–433. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2230.2001.00852.x>
- Ramsey, C., Winqvist, O., Puhakka, L., Halonen, M., Moro, A., Kämpe, O., Eskelin, P., Pelto-Huikko, M., & Peltonen, L. (2002). Aire deficient mice develop multiple features of APECED phenotype and show altered immune response. *Human Molecular Genetics*, 11(4), 397–409. <https://doi.org/10.1093/hmg/11.4.397>
- Roche, P. A., & Furuta, K. (2015). The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation. *Nature Reviews. Immunology*, 15(4), 203–216. <https://doi.org/10.1038/nri3818>
- Rosatelli, M. C., Meloni, A., Meloni, A., Devoto, M., Cao, A., Scott, H. S., Peterson, P., Heino, M., Krohn, K. J., Nagamine, K., Kudoh, J., Shimizu, N., & Antonarakis, S. E. (1998). A common mutation in Sardinian autoimmune polyendocrinopathy-

- candidiasis-ectodermal dystrophy patients. *Human Genetics*, 103(4), 428–434.
<https://doi.org/10.1007/s004390050846>
- Rothenberg, E. V., Ungerback, J., & Champhekar, A. (2016). Forging T-Lymphocyte Identity: Intersecting Networks of Transcriptional Control. *Advances in Immunology*, 129, 109–174. <https://doi.org/10.1016/bs.ai.2015.09.002>
- Siegal, F. P., Kadowaki, N., Shodell, M., Fitzgerald-Bocarsly, P. A., Shah, K., Ho, S., Antonenko, S., & Liu, Y. J. (1999). The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science (New York, N.Y.)*, 284(5421), 1835–1837.
<https://doi.org/10.1126/science.284.5421.1835>
- Stoljar, A. (2020). *Tsentraalse tolerantuse mehhanismid APECED-i rotimudelis*. Tartu Ülikool.
- Strbo, N., Yin, N., & Stojadinovic, O. (2014). Innate and Adaptive Immune Responses in Wound Epithelialization. *Advances in Wound Care*, 3(7), 492–501.
<https://doi.org/10.1089/wound.2012.0435>
- Takaba, H., & Takayanagi, H. (2017). The mechanisms of T cell selection in the thymus. *Trends in Immunology*, 38(11), 805–816. <https://doi.org/10.1016/j.it.2017.07.010>
- Tsunawaki, S., Nakamura, S., Ohyama, Y., ... Shirasuna, K. (2002). Possible function of salivary gland epithelial cells as nonprofessional antigen-presenting cells in the development of Sjögren's syndrome. *The Journal of Rheumatology*, 29(9), 1884–1896.
- Uchida, K., Nakata, K., Trapnell, B. C., ... Keicho, N. (2004). High-affinity autoantibodies specifically eliminate granulocyte-macrophage colony-stimulating factor activity in the lungs of patients with idiopathic pulmonary alveolar proteinosis. *Blood*, 103(3), 1089–1098. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-05-1565>

- van Pesch, V., Lanaya, H., Renauld, J.-C., & Michiels, T. (2004). Characterization of the Murine Alpha Interferon Gene Family. *Journal of Virology*, 78(15), 8219–8228. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.15.8219-8228.2004>
- Walter, M. R. (2020). The Role of Structure in the Biology of Interferon Signaling. *Frontiers in Immunology*, 11, 606489. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.606489>
- Watanabe, M., Uchida, K., Nakagaki, K., ... Nakata, K. (2007). Anti-cytokine autoantibodies are ubiquitous in healthy individuals. *FEBS Letters*, 581(10), 2017–2021. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.04.029>
- Zlotogora, J., & Shapiro, M. S. (1992). Polyglandular autoimmune syndrome type I among Iranian Jews. *Journal of Medical Genetics*, 29(11), 824–826.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Elise Helena Armulik,

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

I tüüpi interferoonide vastaste autoantikehade ja süljenäärme põletiku dünaamika kirjeldamine AIRE-puudulikel rottidel,

mille juhendajateks on Artur Stoljar, Martti Laan ja Sulev Kuuse,

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.

Elise Helena Armulik

26.05.2022