

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT  
BIOTEHNOLOOGIA ÕPPETOOL

Epp Kaleviste

***STAT1* geeni uudifunktsiooniga mutatsiooni mõju JAK-STAT signaalirajale**

Magistritöö

Juhendajad  
Kai Kisand, PhD  
Lili Milani, PhD

TARTU 2015

# SISUKORD

<b>SISUKORD .....</b>	<b>2</b>
<b>KASUTATUD LÜHENDID .....</b>	<b>4</b>
<b>SISSEJUHATUS.....</b>	<b>6</b>
<b>1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE .....</b>	<b>7</b>
1.1 Krooniline naha- ja limaskestade kandidoos .....	7
1.1.1 T-helper 17 rakud <i>Candida</i> vastases kaitses .....	7
1.1.2 Kroonilise naha ja limaskestade kandidoosiga seotud primaarsed immuundefitsiidid ...	8
1.2 JAK-STAT signaalirada .....	9
1.2.1 STAT-de iseloomustus.....	9
1.2.2 Signaali ülekande JAK-STAT rajad .....	10
1.2.3 STAT1.....	11
1.2.4 STAT3.....	13
1.3 <i>STAT1</i> ja <i>STAT3</i> mutatsioonidega seotud haigused.....	15
1.3.1 <i>STAT1</i> mutatsioonid: <i>gain-of-function</i> ning <i>loss-of-function</i> .....	15
1.3.2 <i>STAT3</i> mutatsioon: HIES .....	16
1.4 Valk-DNA interaktsioonide uurimine.....	17
1.4.1 Kromatiini immunosadestamine (ChIP).....	17
1.4.2 ChIP-i järjestuste sekveneerimine .....	19
<b>2 EKSPERIMENTAALNE OSA .....</b>	<b>20</b>
2.1 Töö eesmärgid.....	20
2.2 Materjal ja meetodika .....	20
2.2.1 Uuritav patsient ja kontrollisikud.....	20
2.2.2 Perifeerse vere mononukleaarsete rakkude eraldamine verest .....	21
2.2.3 T-rakkude eraldamine ning kasvatamine .....	21
2.2.4 Rakkude kasvatamine ja stimuleerimine tsütokiinidega .....	22
2.2.5 <i>STAT1</i> ja <i>STAT3</i> fosforüleeritud vormide intratsellulaarne määramine voolutsütomeetri abil.....	22
2.2.6 Geeniekspressiooni analüüs .....	23
2.2.7 ChIP-i protokoll.....	25
2.2.8 ChIP-i proovide qPCR .....	27
2.2.9 ChIP-i variatsioonikordaja arvutamine .....	28
2.2.10 Raamatukogude valmistamine .....	28
2.2.11 Sekveneerimine .....	29
2.2.12 ChIP-seq andmete analüüs .....	29

2.2.13	Statistiline analüüs.....	30
2.3	Tulemused.....	31
2.3.1	STAT1 ja STAT3 aktivatsiooni dünaamika tsütokiinidega stimuleeritud T-rakkudes .	31
2.3.2	Märklaudgeenide ekspresioonianalüüsi tulemused patsiendi ja kontrollisikute T-rakkudes.....	33
2.3.3	ChIP-i qPCR.....	35
2.3.4	ChIP-seq.....	37
	<b>Arutelu.....</b>	<b>43</b>
	<b>KOKKUVÕTE .....</b>	<b>47</b>
	<b>SUMMARY .....</b>	<b>48</b>
	<b>Tänu sõnad .....</b>	<b>49</b>
	<b>Kasutatud kirjanduse loetelu .....</b>	<b>50</b>
	<b>Kasutatud veebiaadressid .....</b>	<b>56</b>
	<b>LISAD .....</b>	<b>57</b>
	Lisa 1. Patsiendi kirjeldus .....	57
	Lisa 2. Kromatiini fragmentide pikkuse kontrollimine .....	59
	Lisa 3. STAT1 ja STAT3 aktivatsiooni dünaamika IL-21-ga stimuleeritud T-rakkudes.....	59

## KASUTATUD LÜHENDID

AD	autosoom-dominantne ( <i>autosomal dominant</i> )
AMP	antimikrobiaalne peptiid ( <i>antimicrobial peptide</i> )
APS1	autoimmuunne polüendokriinne sündroom 1 ( <i>autoimmune polyendocrine syndrome 1</i> )
CARD9	kaspaasi värbamise domeen 9 ( <i>caspase recruitment domain 9</i> )
CC	teisese heeliksi domeen ( <i>coiled-coil</i> )
ChIP-seq	kromatiini immunosadestamine ja sekveneerimine ( <i>chromatin immunoprecipitation and sequencing</i> )
CMC	krooniline mukokutaanne kandidoos ( <i>chronic mucocutaneous candidiasis</i> )
DBD	DNA-d seostav domeen ( <i>DNA binding domain</i> )
DMEM	rakusööde fibroblastide kultiveerimiseks ( <i>Dulbecco`s modified eagle medium</i> )
FACS	voolutsütomeeter (fluorescence-activated cell sorting)
GAS	gamma-aktiveeritud järjestus ( <i>gamma-activated sequence</i> )
GOF	uudikfunktsioon ( <i>gain-of-function</i> )
gp130	glükoproteiin 130 ( <i>glycoprotein 130</i> )
HIES	hüper IgE sündroom ( <i>hyper-IgE syndrome</i> )
ISG	interferooni stimuleeritud geen ( <i>interferon-stimulated gene, ISG</i> )
ISRE	IFN-stimuleeritud vastuselement ( <i>interferon-stimulated response element</i> )
JAK	Janus kinaas ( <i>Janus kinase</i> )
LOF	funktsioonikadu ( <i>loss-of-function</i> )
MSMD	vastuvõtlikkus mükobakteriaalsetele infektsioonidele ( <i>Mendelian susstibility to mycobacterial diseases</i> )
NH <sub>2</sub>	amino-terminaalne domeen ( <i>amino terminal domain</i> )
NS	stimuleerimata proov ( <i>non stimulated</i> )
PBMC	perifeerse vere mononukleaarne rakk ( <i>peripheral blood mononuclear cell</i> )
PBS	fosfaatpuhverdatud füsioloogiline lahus ( <i>phosphate buffered saline</i> )

qPCR	kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon ( <i>quantitative polymerase chain reaction</i> )
SEM	standardviga ( <i>standard error of the mean</i> )
SH2	Src homoloogi 2 domeen ( <i>Src homology 2 domain</i> )
SOCS	tsütokiini signalisatsiooni supressorvalk ( <i>suppressor of cytokine signaling</i> )
STAT	signaali vahendaja ja transkriptsiooni aktivaator ( <i>signal transducer and activator of transcription</i> )
TAD	transkriptsiooni aktivatsiooni domeen ( <i>transcriptional activation domain</i> )
Th	T-helper ( <i>T helper</i> )

## SISSEJUHATUS

Primaarsete immuunpuudulikkuste korral esinevad mutatsioonid geenides, mis vastutavad immuunkaitse eest ning seetõttu kujuneb suurenenud vastuvõtlikkus nakkushaiguste suhtes enamasti juba lapseas. Primaarse immuunpuudulikkusega patsientidel võib pärmseene sündroom ehk krooniline mukokutaanne kandidoos (*chronic mucocutaneous candidiasis*, CMC) osutuda eluohtlikuks. CMC on iseloomulik neile pärilikele sündroomidele, kus geenimutatsiooni tagajärjeks on STAT3 transkriptsioonifaktorist sõltuva T-helper 17 rakutüübi puudulik diferentseerumine või kahjustunud funktsioon. Th-17 rakk vahendab immuunvastust rakuväliste patogeenide – bakterite ning seeninfektsioonide vastu.

*Gain-of-function* mutatsioonid geenis *STAT1* põhjustavad ühte neist kandidoosiga kulgevatest primaarsetest immuunpuudulikkustest. Antud mutatsiooniga rakkudes on aeglustunud selle transkriptsioonifaktori defosforüleerimine, mis ilmselt häirib rakkudes aktiveeritud STAT1 ja STAT3 fosfovormide tasakaalu ning signaalide edastamist immuunkaitses osalevate tsütokiinide poolt. Antud häire võib segada transkriptsioonifaktorite seondumist vajalike märklaudgeenide promootoritele ning sellele järgnevat geenide transkriptsiooni. Täpseid patogeneesimehhanisme pole siiani veel kindlaks määratud selle haiguse puhul.

Käesoleva magistritöö eesmärgiks on välja selgitada *STAT1* mutatsiooni kandvate rakkude signaaliradade iseärasused vastuseks tsütokiinidele, mis vahendavad signaale STAT1 ja STAT3 transkriptsioonifaktorite kaudu ning uurida nende faktorite seondumist märklaudgeenide promootoritele. Sellel informatsioonil võib olla suur väärtus kroonilise kandidoosi immuunmehhanismide paremaks mõistmiseks. Kavandatava uurimistöö eesmärk on parandada primaarsete immuunsüsteemi häirete diagnostikat, mis on suureks abiks raviarstidele patsientide prima võimaliku ravi ja profülaktikameetmete korraldamisel.

# 1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1 Krooniline naha- ja limaskestade kandidoos

*Candida albicans* on inimese normaalse mikrofloora hulka kuuluv pärmseen (Maródi et al., 2012). Seen võib soodsates tingimustes hakata vohama ning põhjustada kandidoosi ehk põletikku nahal, küüntel ja limaskestadel (Puel et al., 2010). Püsivad ning korduvalt esinevad pärmseene sündroomi tuntakse kroonilise mukokutaanse kandidoosina (*chronic mucocutaneous candidiasis*, CMC). CMC esineb sageli primaarse või sekundaarse immuunpuudulikkuse korral. Primaarse immuunpuudulikkusega patsientidel, kellel võib esineda ka mitmeid muid nakkusi ja autoimmuunhaigusi, suudab kandidoos kroonilise infektsioonina levida üle kogu organismi ning kahjustada elutähtsaid organeid (Puel et al., 2011, 2012). Krooniline kandidoos on tõsine haigus, kuna sündroom vajab korduvat ja pikaajalist teraapiat ning haigust põhjustav seen on võimeline muutuma resistentseks seenevastastele ravimitele (Rautemaa, Richardson, Pfaller, Perheentupa, & Saxen, 2008). Kroonilise suu ja neelu kandidoosiga kaasneb pidev põletik limaskestal, mis võib soodustada vähiteket (Rautemaa, Hietanen, Niissalo, Pirinen, & Perheentupa, 2007). Naha ja limaskestade kandidoosi on seostatud T-helper 17 (*T helper type 17*, Th-17) rakkude defitsiidiga (Puel et al., 2010), viimased vahendavad immuunkaitset seeninfektsioonide vastu (Minegishi et al., 2009).

### 1.1.1 T-helper 17 rakud *Candida* vastases kaitses

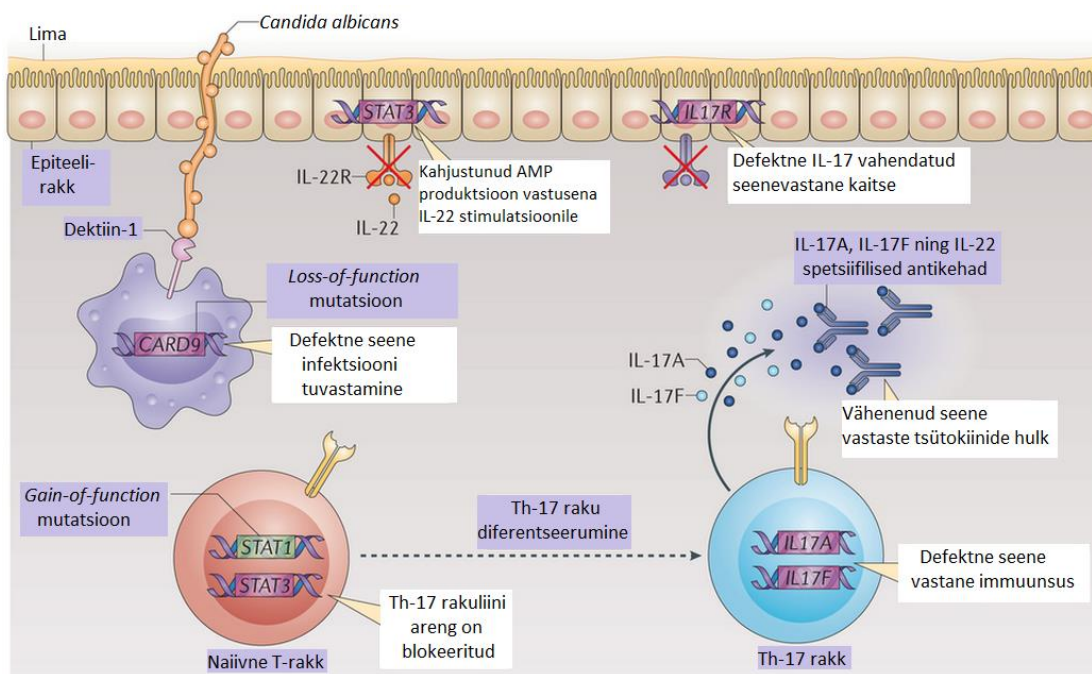
T-helper (*T helper*, Th-) rakud ehk abistajarakud omavad olulist rolli omandatud immuunmehhanismide seas. Abistajarakud jagatakse iseloomulike tsütokiinide toodangu ning transkriptsioonifaktorite alusel kolmeks alampopulatsiooniks: Th-1, Th-2 ning Th-17 (Dong, 2006). Th-17 rakk vahendab immuunvastust rakuväliste patogeenide – bakterite ning seeninfektsioonide vastu (Minegishi et al., 2009). Antud rakud sünteesivad interleukiine IL-17A, IL-17F, IL-21 ja IL-22. Interleukiinid IL-17A ning IL-17F indutseerivad epiteeli ning fibroblasti rakkudes põletiku mediaatoreid, sealhulgas kemokiine, tsütokiine ja granulotsüüdi kolooniaid stimuleerivat faktorit. Kemokiinid tõmbavad ligi neutrofiile ning granulotsüüdi kolooniaid stimuleeriv faktor indutseerib granulotsüütide produktsiooni (Hernández-Santos & Gaffen, 2012). IL-22 on oluline barjäärifunktsioonis. Antud interleukiin indutseerib epiteelirakke produtseerima antibakteriaalseid valke ja mutsiini ning stimuleerib epiteelirakkude proliferatsiooni (Rutz, Eidenschenk, & Ouyang, 2013). IL-21 soodustab

autokriinsel viisil naiivseid T-rakke diferentseeruma Th-17 rakkudeks (Korn et al., 2007). Inimese organismis on IL-6, IL-23 ning IL-21 ühed põhilised tsütokiinid, mis indutseerivad naiivseid CD4<sup>+</sup> T-rakke diferentseeruma Th-17 rakkudeks läbi transkriptsioonifaktori STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*). STAT3 on absoluutselt asendamatu Th-17 raku arengus (Yang et al., 2007). IL-23 on vajalik antud rakkude säilitamiseks ning ellujäämiseks (Liu et al., 2011; Minegishi et al., 2009). IL-6 ning IL-21 osalevad Th-17 raku diferentseerumisrajas (Korn et al., 2007). Tsütokiinid IFN- $\alpha/\beta$ , IFN- $\gamma$  ning IL-27 on Th-17 rakkude diferentseerumise inhibiitorid, toimides läbi transkriptsioonifaktori STAT1 (Villarino, Gallo, & Abbas, 2010). Uuringute põhjal on patsientide vastuvõtlikkus kandidoosile suuresti põhjustatud Th-17 raku funktsionaalsetest häiretest (Puel et al., 2011).

### 1.1.2 Kroonilise naha ja limaskestade kandidoosiga seotud primaarsed immuundefitsiidid

Primaarsete immuundefitsiitide korral võib CMC esineda isoleeritult või kaasneda laiemahaardelise geneetilise sündroomiga. Ühendavaks jooneks kõigi CMC-ga kulgevate geenidefektide korral on Th-17 rakkude puudulik diferentseerumine või funktsioon. Th-17 raku puudulikkust ning vastuvõtlikkust kandidoosile on kirjeldatud *STAT1*, *STAT3*, *AIRE*, *IL17RA*, *IL17RC*, *IL17F* ja *CARD9* geenides esinevate mutatsioonide korral (Kisand & Peterson, 2013; Ling et al., 2015) (joonis 1). Autoimmuunse polüendokriinse sündroomi 1 (*autoimmune polyendocrine syndrome 1*, APS1) patsientidel esineb CMC kuni 95% juhtudest (Husebye, Perheentupa, Rautemaa, & Kämpe, 2009). Sündroomi põhjustab autosoom-retsessiivne mutatsioon geenis *AIRE* (*autoimmune regulator*) (Mathis & Benoist, 2009). APS1 haigetel on veres kõrgel tasemel IL-17F ja IL-22 ning mõõdukal määral ka IL-17A tsütokiinide vastaseid antikehasid (Kisand et al., 2011). Uuringud näitavad, et kandidoos tekib ka mutatsioonide tagajärjel geenides *IL-17RA*, *IL-17RC* ning *IL-17F*. Mutatsioonid geenides *IL-17RA* ja *IL-17RC* põhjustavad täielikku valgu ekspressiooni kadu, kahjustades rakulist vastust IL-17A ning IL-17F dimeeridele (Ling et al., 2015; Puel et al., 2011). *IL-17F* geeni mutatsioon kahjustab osaliselt interleukiinide dimeeride funktsioneerimist (Puel et al., 2011). Mutatsioon geenis *CARD9* (*caspase recruitment domain 9*) soodustab kandidoosi infektsiooni teket. *CARD9* kodeerib adaptervalgu, mis stimuleerib seeninfektsiooni tuvastamist ning selle vastast kaitset vastusena dektiin-1 retseptoritele. *CARD9* defektsetel patsientidel on Th-17 rakkude tase märkimisväärselt madal (Glocker et al., 2009). *STAT3* mutatsiooniga patsientidel on antimikrobiaalsete peptiidide (*antimicrobial peptide*, AMP) tootmine kahjustunud, mis suurendab vastuvõtlikkust kandidoosile. Mutatsiooni *STAT3* geenis on põhjalikumalt

kirjeldatud alapeatükis 1.3.2. Uudikfunksiooniga (*gain-of-function*, GOF) mutatsioonid *STAT1* geenis põhjustavad autosomaalset-dominantset kandidoosi (Liu et al., 2011; Smeekens et al., 2011; Takezaki et al., 2012). Põhjalikumalt on kirjeldatud *STAT1* geeni mutatsioone alapeatükis 1.3.1. Antud uurimistöös keskendutakse spetsiifilisemalt *STAT1* ning *STAT3* geenis esinevate mutatsioonide seosele kandidoosiga.



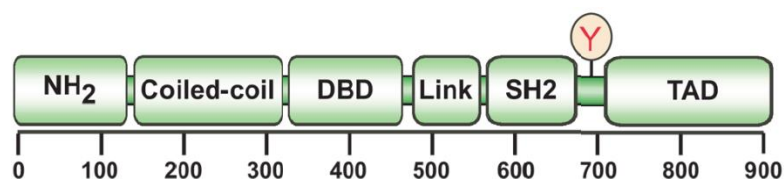
**Joonis 1. Kandidoosiga seotud defektid immuunsüsteemis.** *CARD9* kodeerib adapterit, mis on oluline seene infektsiooni tuvastamiseks ning IL-17 tootmiseks. *STAT1* mutatsiooniga on Th-17 rakuliini areng häiritud. Vastusena IL-22 stimuleerimisele esineb *STAT3* mutatsiooniga patsientidel AMP-de kahjustunud tootmine. Mutatsioon geenil *IL-17R* põhjustab defektset seenevastast kaitset. CMC patsientidel on tuvastatud IL-17 vastaseid autoantikehasid (muudetud Milner & Holland, 2013).

## 1.2 JAK-STAT signaalirada

### 1.2.1 STAT-de iseloomustus

Signaali vahendaja ja transkriptsiooni aktivaatorite (*signal transducer and activator of transcription*, STAT) perekonda kuuluvad seitse transkriptsioonifaktorit: STAT-1, -2, -3, -4, -5A, -5B ning -6. Faktorid aktiveeritakse ekstratsellulaarse signaalvalgu, enamasti kasvufaktori või tsütokiini seondumisel vastavale rakupinna retseptorile, mille tulemusena translokeerub transkriptsioonifaktor tuuma (Darnell Jr., 1997).

STAT valk koosneb seitsmest domeenist (joonis 2). Amino-terminaalne domeen (*amino terminal domain*, NH<sub>2</sub>) vastutab STAT valkude inaktiivse seisundi säilitamise eest (Mertens et al., 2006). Teisese heeliksi domeen (*coiled-coil domain*) vastutab valk-valk interaktsiooni eest. Regioonile seonduvad regulatoorsed valgud ning domeen aitab seonduda retseptoriga (Levy & Darnell, 2002). DNA-d seostav domeen (*DNA binding domain*, DBD) vahendab STAT valgu seondumist märklaudgeeni promootorala kindlale järjestusele. Domeen on oluline ka tuuma translokatsioonil, säilitades vajalikku konformatsiooni importiiniga seondumiseks (Darnell Jr., 1997). Linker domeen (*linker domain*) osaleb transkriptsiooni aktivatsioonil ning valk-valk interaktsioonil. *Src* homoloogi 2 domeen (*Src homology 2 domain*, SH2) vahendab spetsiifilist seondumist retseptorahela fosfotürosiinile ning aktiivse STAT dimeeri formeerumist (Mertens et al., 2006). Türosiini aktivatsiooni domeen (Y) sisaldab konserveerunud türosiini, mille fosforüleerimine on STAT-ide aktivatsiooni ja dimeriseerumise eelduseks (Mertens et al., 2006). Transkriptsiooni aktivatsiooni domeen (*transcriptional activation domain*, TAD) asub C-terminaalses otsas ning sisaldab konserveerunud seriini fosforülatsiooni saite, mis vahendavad transkriptsiooniks vajalike koaktivaatorite seondumist (Levy & Darnell, 2002).

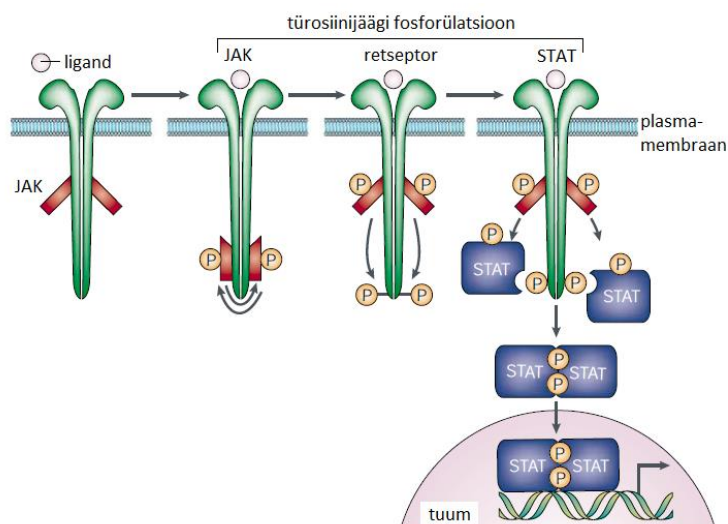


**Joonis 2. STAT valgu struktuur.** STAT valk koosneb seitsmest domeenist: amino-terminaalne domeen (NH<sub>2</sub>), teisese heeliksi domeen (*coiled-coil*), DNA-d seostav domeen (DBD), linker domeen (Link), SH2 domeen (SH2), türosiini aktivatsiooni domeen (Y) ning transkriptsiooni aktivatsiooni domeen (TAD) (muudetud Schindler & Plumlee, 2008).

### 1.2.2 Signaali ülekanne JAK-STAT rajas

STAT valk osaleb JAK-STAT signaalirajas (joonis 3). Rajas leiab aset ligandi, näiteks tsütokiini seondumine vastava retseptoriga, mille tulemusena viimane dimeriseerub. See põhjustab retseptoriga seoses oleva Janus kinaasi (*Janus kinase*, JAK) autofosforüleerumise. Seejärel fosforüleerib JAK omakorda retseptori tsütoplasmaatilise saba türosiini saidi, mille tulemusena kinnitub sellele STAT monomeer (Darnell Jr., 1997; Levy & Darnell, 2002). STAT-i ning retseptori ühendus põhjustab STAT molekuli türosiini fosforüleerimise JAK-i poolt. Fosforüleeritud STAT-d moodustavad dimeeri SH2 fosfotürosiini interaktsiooni kaudu. STAT dimeer vabaneb retseptor-kinaasi küljest ning translokeerub tuuma. Tuumas STAT

dimeer seondub DNA promootoralal asuvale spetsiifilisele elemendile ning indutseerib geni transkriptsiooni (Levy & Darnell, 2002). STAT dimeeride seandumine DNA-le stimuleerib mitmete geenide ekspressiooni, mis panustavad raku eluliselt olulistesse protsessidesse – ellujäämine, diferentseerumine, proliferatsioon, migreerumine. Need geenid vastutavad ka efektiivse immuunvastuse kujundamise eest (Casanova, Holland, & Notarangelo, 2012).



**Joonis 3. JAK-STAT signaalirada.** Ligandi seandumine retseptorile põhjustab viimase dimeriseerumise, mille tulemusena autofosforüleeritakse JAK-d. Järgnevalt fosforüleerib JAK retseptori saba ning sellele kinnitub STAT valk. STAT-i türosiin fosforüleeritakse JAK-i poolt ning fosforüleeritud STAT valkudest moodustub dimeer. Dimeer liigub tuuma ning kinnitub DNA promootoralal asuvale kindlale järjestusele (muudetud Levy and Darnell, 2002).

### 1.2.3 STAT1

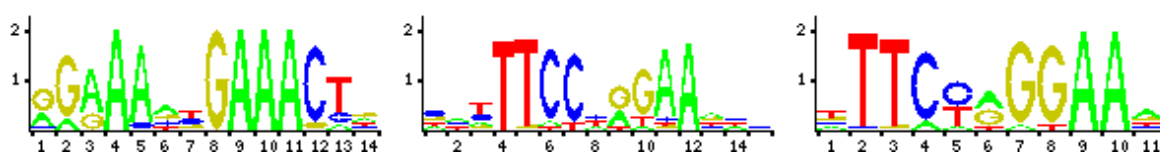
STAT1 on vastandlik transkriptsioonifaktor, osaledes mitmete geenide aktivatsioonis ning samas supresseerides teisi. Faktori geen lokaliseerub kromosoomis 2 (Darnell Jr., 1997). STAT1-l on kaks isovormi: täispikk STAT1 $\alpha$  ning lühem STAT1 $\beta$ . Isovormi STAT1 $\beta$  ekspresseeritakse madalamal tasemel ning viimasel puudub TAD domeen. Pärast stimulatsiooni IFN- $\gamma$ -ga suudab ainult STAT1 $\alpha$  isovorm stimuleerida transkriptsiooni tänu TAD domeenile (Zakharova et al., 2003). STAT1 valgu aktiveerimise eest vastutab eelkõige tsütokiinide IFN- $\gamma$ , IFN- $\alpha/\beta$  ja IL-27 seandumine vastavate retseptoritega (Casanova et al., 2012). STAT1 vahendab signaale peamiselt interferoonide retseptoritelt, kuid võib moodustada heterodimeere ka STAT3-ga, kui signaal saabub IL-6, IL-27 või IL-21 kaudu (Haan, Keller, Behrmann, Heinrich, & Haan, 2005a; Habib, Nelson, & Kaushansky, 2003).

STAT1-e aktivatsioon inhibeerib Th-17 raku diferentseerumist (Casanova et al., 2012). STAT1 märklaudgeenide konserveerunud seondumissaidid on välja toodud joonisel 4.

Tüüp II IFN ehk IFN- $\gamma$  on tsentraalne immuunvastuse ja signaliseerimise regulaator STAT1 signaalirajas. IFN- $\gamma$  seondub unikaalsele dimeersele retseptorile: IFNGR1 ning IFNGR2. Stimuleerides rakku IFN- $\gamma$ -ga, moodustavad STAT1 valgud homodimeeri (Bach, Aguet, & Schreiber, 1997). STAT-JAK signaalirajas translokeerub STAT1 dimeer tuuma ning kinnitub promotorelemendi DNA gamma-aktiveeritud järjestusele (*gamma-activated sequence*, GAS). Seandumine aktiveerib primaarseid märklaudgeene, näiteks *IRF1*. Sekundaarsed märklaudgeenid indutseeritakse omakorda IRF1-e poolt, mis seonduvad promotoralas asuvale IFN-stimuleeritud vastuselemendile (*interferon-stimulated response element*, ISRE) (Saha, Jyothi Prasanna, Chandrasekar, & Nandi, 2010). STAT1-e aktivatsioon IFN- $\gamma$  poolt ei ole pidev ning inhibeeritakse teatud aja pärast supressorite poolt. Enim uuritud on tsütokiini signalisatsiooni supressorvalk 1 (*suppressor of cytokine signaling 1*, SOCS1), mis retseptoriga seondudes takistab edasist STAT1 valgu aktivatsiooni (Hilton et al., 1998). IFN- $\gamma$  on STAT1 signaaliraja kaudu üks potentsiaalseid Th-17 rakuraja inhibiitoreid. IFN- $\gamma$  või selle retseptori deletsioon põhjustab IL-17 produktsiooni tõusu (Luger et al., 2008). STAT1-e puudumisel aga on IFN- $\gamma$  võimeline aktiveerima faktorit STAT3 ning STAT3 omakorda on suuteline indutseerima mõningate geenide ekspressiooni, mis harilikult käivitatakse STAT1 raja kaudu (Qing & Stark, 2004).

Tüüp I interferoonid - IFN- $\alpha$  ja IFN- $\beta$  indutseerivad viirusvastast kaitset nakatunud rakkudes ning naaberrakkudes. Tüüp I IFN seondub dimeersele retseptorile: IFNAR1 ning IFNAR2 (Oritani, Kincade, Zhang, Tomiyama, & Matsuzawa, 2001). IFN- $\alpha/\beta$  stimulatsiooni tulemusena tekib STAT1 ja STAT2 heterodimeer, mis translokeerub tuuma (Li, Leung, Qureshi, Darnell, & Stark, 1996). Tuumas seostub dimeer IRF-9 faktoriga ning moodustub kompleks ISGF-3, mis kinnitub märklaudgeeni promotoralal ISRE-le. Promootoralale seandumine põhjustab interferooni stimuleeritud geenide (*interferon-stimulated gene*, ISG) ekspressiooni tõusu (Stark & Darnell, 2012). ISG kodeeritud valgud kaitsevad patogeene eest läbi erinevate mehhanismide – viraalse transkriptsiooni, translatsiooni ning replikatsiooni inhibitsioon, viraalsete nukleiinhapete degradatsioon ning lipiidide metabolismi muutmine (MacMicking, 2012). Tüüp I interferooni kaudu on võimalik moodustada ka heterodimeer STAT1:STAT3, seda juhul kui STAT3 on üleekspressioonitud. IFN- $\alpha$  kaudu aktiveeritud STAT3 on võimeline inhibeerima STAT1-st sõltuvat geeni aktivatsiooni, supresseerides STAT1 homodimeeri moodustumist (Ho & Ivashkiv, 2006).

IL-27 indutseerib põhiliselt faktorit STAT1, kuid ka STAT3-e. IL-27 on põletikuvastane tsütokiin, mis mõjub inhibeerivalt Th-17 raku diferentseerumisele. STAT1 väljalülitamisel ei ole IL-27 võimeline inhibeerima Th-17 rakuliini diferentseerumist. Sellest tulenevalt on STAT1 Th-17 rakuliini arengus inhibitoorne transkriptsioonifaktor (Stumhofer et al., 2007). IL-27 seondub retseptorile IL27R, mis koosneb unikaalsest alfa subühikust ning levinud glükoproteiini 130 (*glycoprotein 130*, gp130) ahelast (Guzzo, Che Mat, & Gee, 2010). IL-27 kasutab gp130 subühikut interakteerumiseks faktoriga STAT1, subühiku fosfotürosiin on seandumiskohaks STAT valgule (Ohtani et al., 2000).



**Joonis 4. STAT1 seandumissaitide konsensusjärjestused.** Antud järjestused on leitud Jaspardandmebaasist kasutades otsinguvõtuna STAT1<sup>1</sup>. X-teljel on motiivi nukleotiidide järjekord ning y-teljel vastab tähe suurus viimase esinemissagedusele antud positsioonil (0 tähendab, et ühtegi nukleotiidi ei esine, 2 tähendab, et ainult üks nukleotiid esineb).

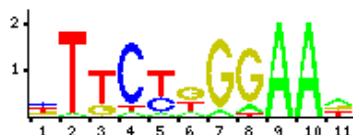
#### 1.2.4 STAT3

STAT3 on transkriptsioonifaktor, mis reguleerib raku kasvu, ellujäämist ning diferentseerumist. *STAT3* geen lokaliseerub inimese kromosoomis 17. STAT3-l on kaks isovormi: täispikk STAT3 $\alpha$  ning alternatiivse splaissinguga tekkinud lühem STAT3 $\beta$ . Raku normaalses tingimustes esineb faktor STAT3 $\alpha$  isovormina (Zammarchi et al., 2011). STAT3 on oluline tuumoriraku regulaator, faktorit aktiveerivad mitmed erinevad kartsinogeensed agendid. STAT3 liigset aktivatsiooni on seostatud erinevate kasvujate pahaloomulise transformeerumise ning patogeneesiga (Bromberg & Wang, 2009). STAT3 signaaliraja aktivaator-tsütokiinid on IL-6, IL-10, IL-21, IL-22 ja IL-23, mis indutseerivad T-rakke diferentseeruma IL-17 T-rakkudeks (Casanova et al., 2012). Kromatiini immunosadestamise ja sekveneerimise (*chromatin immunoprecipitation and sequencing*, ChIP-seq) meetodikaga on tuvastatud STAT3-e seos Th-17 raku diferentseerumise, aktivatsiooni, proliferatsiooni ning ellujäämisega (Durant et al., 2010). STAT3 puudumisel on Th-17 raku areng häiritud (Yang et al., 2007). *STAT3* mutatsiooniga patsientidel ei ole naiivsed rakud võimelised diferentseeruma IL-17 mälu-rakkudeks (Minegishi, 2009). Tsütokiini signaliseerimise supressor 3 (*suppressor of cytokine signaling 3*, SOCS3) inhibeerib STAT3 eneseaktivatsiooni, reguleerides negatiivselt STAT3 ekspressiooni. Interferoonid indutseerivad SOCS3

ekspressiooni, see on üks mehhanismidest, kuidas STAT1 faktori ülekaal inhibeerib STAT3 rada (Qin et al., 2012). STAT3-e märklaudgeenide konserveerunud seandumissait on välja toodud joonisel 5.

STAT3 on pidevalt ekspresseeritud teatud tasemel, kuid spetsiifiliste tsütokiinidega aktiveerides leiab aset järsk ekspressioonitaseme tõus. IL-6 on põhiline STAT3 signaaliraja aktivaator-tsütokiin. IL-6-e signaliseerimine toimub läbi pinnaretseptori kompleksi: IL-6 retseptor (IL-6R) ning signaali vahendav glükoproteiin 130 (*glycoprotein 130*, gp130). IL-6-e seandumisel retseptoriga leiab aset gp130 subühiku fosforüleerimine, mille vahendusel liigub signaal raku. Gp130 fosfotürosiin on seandumiskohaks STAT valguga SH2 domeenile (Ohtani et al., 2000). STAT3 faktori puudumisel on IL-6 suuteline aktiveerima STAT1-e. Kuid mõlema faktori olemasolul eelistab IL-6 aktiveerida STAT3-e (Costa-Pereira et al., 2002). IL-6 stimulatsioonil võib moodustuda STAT1:STAT3 heterodimeer. Kuid on võimalik, et STAT1:STAT3 heterodimeer ei translokeeru tuuma nii efektiivselt kui homodimeerid, kuna heterodimeeri spetsiifiline tuuma lokaliseerimise signaal on madalama efektiivsusega (Haan, Keller, Behrmann, Heinrich, & Haan, 2005b).

IL-10-e seandumine IL10 retseptor kompleksile aktiveerib eelkõige STAT3 signaalirada. Makrofaagides käivitab IL-10 põletikku inhibeeriva vastuse STAT3 signaali kaudu. STAT3 käivitab spetsiifiliste geenide transkriptsiooni, mis supresseerivad omakorda põletiku mediaatorite geene (Riley, Takeda, Akira, & Schreiber, 1999). IL-21 suudab aktiveerida nii STAT1-e kui ka STAT3-e, kuid eelistab stimuleerida STAT3 signaalirada (Liao, Lin, & Leonard, 2011). IL-22 kuulub sarnase ehituse tõttu IL-10-ga samasse perekonda. IL-22 indutseerib STAT3-e ning vähesel määral ka STAT1-e fosforülatsiooni (Xie et al., 2000). IL-23 osaleb samuti STAT3-e aktiveerimisel ning on oluline Th-17 rakuliini arengus. IL-6-e ning IL-23-e stimuleerimisel leiab STAT3 signaaliraja vahendusel aset Th-17 rakkude arvu tõus (Yang et al., 2007).

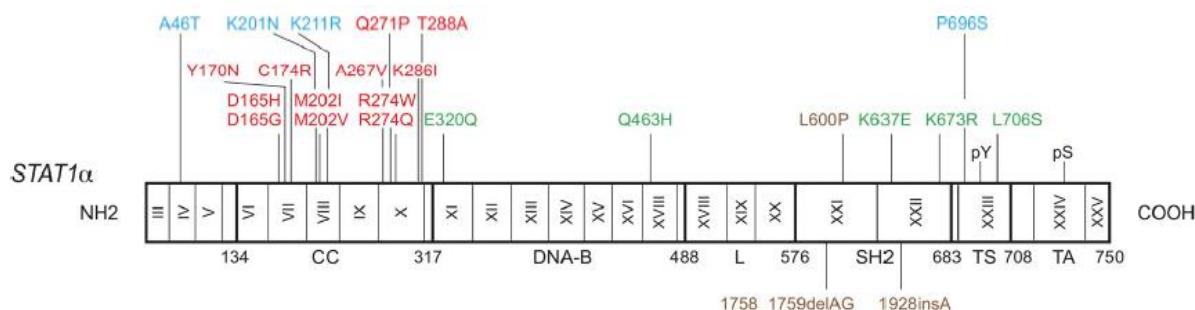


**Joonis 5. STAT3 seandumissaidi konsensusjärjestus.** Antud järjestus on leitud Jasper andmebaasist kasutades otsinguviietena STAT3-e <sup>2</sup>. X-teljel on motiivi nukleotiidide järjekord ning y-teljel vastab tähe suurus viimase esinemissagedusele antud positsioonil (0 tähendab, et ühtegi nukleotiidi ei esine, 2 tähendab, et ainult üks nukleotiid esineb).

## 1.3 STAT1 ja STAT3 mutatsioonidega seotud haigused

### 1.3.1 STAT1 mutatsioonid: gain-of-function ning loss-of-function

Tänu genoomi uuringutele ja sekveneerimisele on avastatud CMC patsientidel *STAT1* geenis mitmeid uudikfunktsiooniga (*gain-of-function*, GOF) mutatsioone (Liu et al., 2011). Aastatel 2011 ning 2012 avastasid mitu uurimiserühma GOF mutatsioonid *STAT1* geenis, mis põhjustavad autosoom-dominantset CMC-d. Antud mutatsioonid asuvad geeni teisese heeliksi domeenis (*coiled-coil*, CC) ning DNA-d seostavas domeenis (*DNA-binding domain*, DBD) (Liu et al., 2011; Smeekens et al., 2011; Takezaki et al., 2012). *STAT1* geenist avastatud mutatsioonide positsioonide mõned näited on toodud joonisel 6.



**Joonis 6. Haigusi põhjustavad mutatsioonid STAT1 alfa isovormis.** Roheliselt on märgitud dominantsed mutatsioonid, mis on seotud osalise STAT1-e defitsiidiga ning MSMD-ga (*Mendelian susceptibility to mycobacterial diseases*). Pruuniga on märgitud retsessiivsed mutatsioonid, mis on seotud täieliku STAT1-e defitsiidiga ja rakusiseste bakteriaalsete ning viraalsete haigustega. Sinisega on märgitud retsessiivsed mutatsioonid, mis on seotud osalise STAT1-e defitsiidiga ning rakusiseste bakteriaalsete ning/või viraalsete haigustega. Punasega on märgitud dominantsed GOF *STAT1* mutatsioonid, mis on seotud CMC-ga. NH<sub>2</sub> - amino-terminaalne domeen, CC - teisese heeliksi domeen, DNA-B - DNA-d seostav domeen, L - linker domeen, SH2 - SH2 domeen, TS - saba segmenti domeen, TA - transaktivatsiooni domeen, pY - Tyr701, pS - Ser727. Rooma numbrid tähistavad kodeerivaid eksoneid (muudetud Liu et al., 2011).

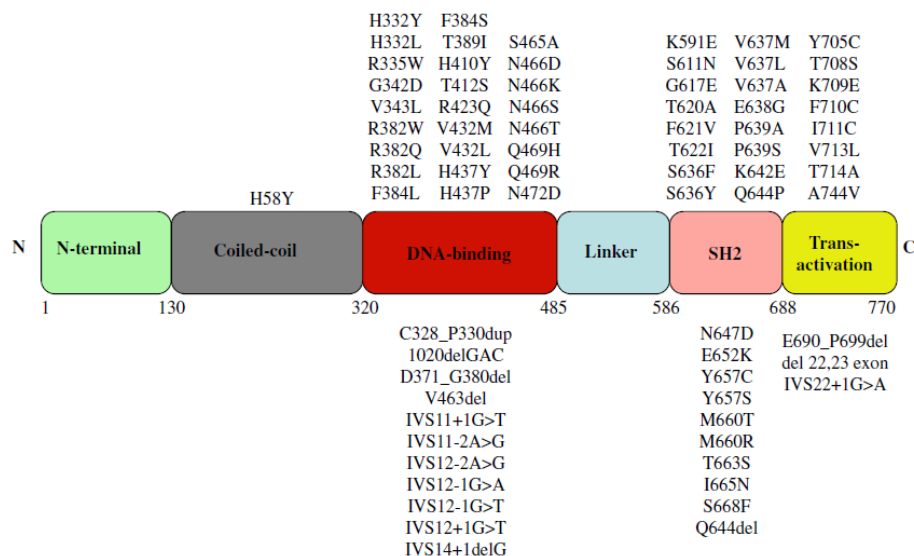
GOF mutatsioon põhjustab STAT valguga vigast defosforüleerimist, mille tulemusena leiab aset valguga hüperfosforüleerumine ning akumulatsioon tuuma (Liu et al., 2011; Mertens et al., 2006; Zhong et al., 2005). IFN- $\alpha/\beta$ , IFN- $\gamma$  ning IL-27 on Th-17 rakkude arengu potentsiaalsed inhibiitorid STAT1 signaaliraja kaudu (Villarino et al., 2010). Stimuleerides GOF mutatsiooniga rakke STAT1-e kaudu mõjuvate tsütokiinidega, tõuseb p-STAT1-e tase märkimisväärselt võrreldes terve kontrolli rakkudega. Lisaks põhjustavad GOF mutatsioonid STAT1-st sõltuvat rakulist vastust tsütokiinidele IL-6, IL-23 ning IL-21, mis normaaljuhul aktiveerivad STAT3-e. Tulemusena eelistavad antud tsütokiinid GOF STAT1 signaalirada STAT3-le, mis kahjustab Th-17 raku arengut (Liu et al., 2011). Tõepoolest, GOF

mutatsioonide tulemusena tekkinud CMC kliiniline pilt näitab häiritud Th-17 rakkude arengut. Patsientidel on dramaatiliselt vähenenud Th-17 rakkude hulk (Liu et al., 2011; Takezaki et al., 2012). Antud interleukiinide taseme languse tulemusena toodetakse vähem seenevastast beeta-defensiini ning halveneb neutrofiilide sissevool (Kao et al., 2004). Smeekens oma uurimisgrupiga on näidanud, et muteerunud STAT1 inhibeerib IL-12R/IL-23R signaliseerimist, mille molekulaarseks mehhanismiks on STAT1 valgu hüperfosforüleerimine. Signaali inhibitsioon IL-12 ja IL-23 retseptorite kaudu viib tugevalt vähenenud Th-17 raku vastusele (Smeekens et al., 2011). Kokkuvõtvalt defektne IL-12R signaliseerimine ning defektne Th-17 vastus on võimalikud põhjused seeninfektsiooni vastuvõtlikkusele AD-CMC patsientidel (Liu et al., 2011; Smeekens et al., 2011; Takezaki et al., 2012).

Funktsioonikaoga (*loss-of-function*, LOF) autosoom-dominantne mutatsioon *STAT1* geenis põhjustab vastuvõtlikkust mükobakteriaalsetele infektsioonidele (*Mendelian susceptibility to mycobacterial diseases*, MSMD). *STAT1* LOF mutatsioonidel on dominantne negatiivne mõju IFN- $\gamma$  poolt aktiveeritud signaalirajale (Tsumura et al., 2012). Joonisel 6 näidatud LOF mutatsioonid häirivad kas türosiini domeeni fosforüleerimist või *STAT1* seondumist DNAGA (Liu et al., 2011).

### 1.3.2 *STAT3* mutatsioon: HIES

Autosoom-dominantne hüper IgE sündroom (*autosomal dominant hyper-IgE syndrome*, AD-HIES) või *Job*'si sündroom on primaarne immunodefitsiit, mille põhjustajaks on dominantne negatiivne mutatsioon *STAT3* geenis (Minegishi et al., 2007). HIES sündroomil on palju iseloomulikke kliinilisi tunnuseid – kõrge IgE sisaldus seerumis, *Staphylococcus aureus*'e infektsioon, raske dermatiit, luude haprus (Casanova et al., 2012). *STAT3* mutatsiooniga haigetel ei ole naiivsed rakud võimelised diferentseeruma IL-17 rakkudeks, sellest tulenevalt põevad HIES patsiendid kandidoosi (Minegishi, 2009; Yang et al., 2007). Enamik *STAT3* geeni mutatsioonidest on *missense* mutatsioonid DBD, SH või transaktivatsiooni domeenis (Minegishi et al., 2007; Renner et al., 2008) (joonis 7). DBD mutatsioonidel ning transaktivatsiooni domeeni mutatsioonidel on dominantne negatiivne efekt *STAT3* dimeeri seondumisele DNA promootoralaga (Minegishi et al., 2007).



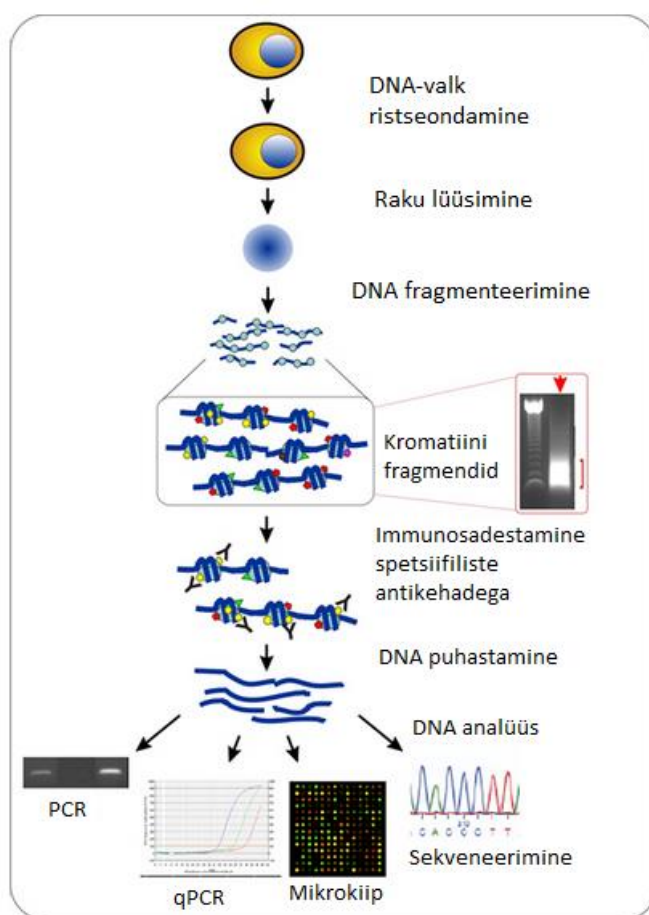
**Joonis 7. Haigusi põhjustavad mutatsioonid STAT3 valgus.** Raporteeritud on 75 erinevat patoloogilist mutatsiooni. Rooma numbrid tähistavad kodeerivaid eksoneid, \* tähistab retsessiivseid mutatsioone, mis on seotud osalise STAT3-e defektsusega (muudetud Maródi et al., 2012).

## 1.4 Valk-DNA interaktsioonide uurimine

### 1.4.1 Kromatiini immunosadestamine (ChIP)

Kromatiini immunosadestamine (*chromatin immunoprecipitation*, ChIP) on laialdaselt kasutusel olev meetod valk-DNA interaktsioonide uurimiseks. Antud meetodiga on võimalik lokaliseerida genoomil histoonide modifikatsioone ning transkriptsioonifaktoreid (Kuo & Allis, 1999). Söötmes olevaid rakke töödeldakse lahusega, näiteks formaldehüüdiga, mis põhjustab valkude kovalentse ristseondumise DNA seondusmiskohtadega. Formaldehüüdi töötlus on pööratav protsess ehk kuumusega töötlemisel on võimalik ristsidemed lagundada. Formaldehüüd siseneb rakkudesse läbi rakumembraani ning seejärel moodustuvad 2 Å pikkused DNA-valk, RNA-valk ning valk-valk ristsidemed. Antud meetodiga on kõige kasulikum uurida valke, mis seonduvad otseselt DNA-ga (Zeng, Vakoc, Chen, Blobel, & Berger, 2006). Ristsidemed tagavad valk-DNA komplekside säilimise kogu ChIP-i protseduuri vältel. Pärast formaldehüüdiga töötlemist lüüsitakse rakud ning eraldatud kromatiin fragmenteeritakse ensümaatilise töötlemise kaudu nukleasidega või rakkude/rakutuumade sonikeerimise teel. Kromatiini fragmentide pikkuseks on 200 – 1000 aluspaari, optimaalne pikkus on keskmiselt 500 bp. Kromatiin puhastatakse üleliigsest materjalist ning valk-DNA kompleksid immunosadestatakse valguspetsiifilise antikehaga. Sadestamine

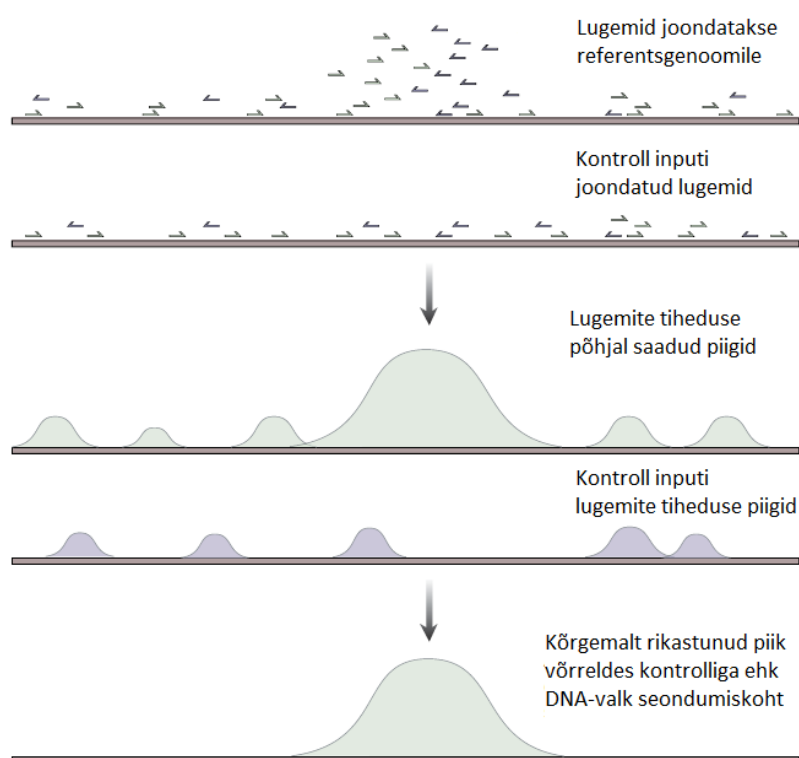
toimub antikehi siduvate keradega, kuhu külge püütakse antikeha-valgu-DNA kompleksid. Sadestatud kompleksid pestakse hoolikalt, et eemaldada ebaspetsiifiline seondumine. Seejärel lõhutakse ristsidemed, valgud lagundatakse proteinaasidega ning sadestatud DNA puhastatakse. ChIP-i proovid kõrvutatakse immunosadestamata DNA-dega samast proovist (*input*), et eemaldada taustamüra. DNA järjestused identifitseeritakse üksikute geenide uurimiseks polümeraasi ahelreaktsiooniga (*polymerase chain reaction, PCR*) või kvantitatiivse PCR-ga (*quantitative PCR, qPCR*), ning ülegenoomseks analüüsiks DNA mikrokiipidega või sekveneerimisega (Collas & Dahl, 2008; Zeng et al., 2006) (joonis 8).



**Joonis 8. Kromatiini immunosadestamine ning analüüs.** Rakke töödeldakse lahusega, mis põhjustab valkude ristseondumise DNA-ga. Seejärel lüüsitakse rakud ning eraldatud kromatiin fragmenteeritakse lühikesteks osadeks. Valk-DNA kompleksid immunosadestatakse spetsiifiliste antikehadega ning sadestatud DNA puhastatakse. Analüüsimiseks on võimalik kasutada erinevaid meetodeid: PCR, qPCR, DNA mikrokiibid või sekveneerimine (muudetud Collas & Dahl, 2008).

## 1.4.2 ChIP-i järjestuste sekveneerimine

ChIP-seq on üks põhilisi immunosadestatud materjali ülegenoomseid analüüsi meetodeid (Collas & Dahl, 2008). Puhastatud DNA fragmentidele ligeeritakse universaalsed adapterid ning proovid sekveneeritakse teise põlvkonna sekvenaatoriga (nt HiSeq2500 või Ion Proton). Sekveneeritud järjestused ehk lugemid joondatakse referentsgenoomile. DNA-alk seondumiskohtade aladele joonduvad unikaalsed lugemid tihedamalt võrreldes kontroll *input*-iga ehk alad on rikastunud unikaalsete lugemitega. Rikastunud lugemitest moodustatakse piigid ehk valgu seondumiskohad ChIP-seq analüüsiprogrammiga. Kontroll *input* on sama algmaterjal, mida küll sonikeeritakse, kuid ei sadestata antikehaga ehk *input* kujutab endast kogu sonikeeritud DNA-d. Kontroll *input*-iga võrdlemisel on võimalik eristada rikastunud piike taustamürast (Hoffman & Jones, 2009) (joonis 9). Üks suurimaid eeliseid antud meetodi puhul on sekveneerimiseks vajaliku materjali väike kogus, juba 10 ng on piisav materjal tulemuse saavutamiseks (Hoffman & Jones, 2009).



**Joonis 9. Sekveneeritud lugemite joondamine ning piikide leidmine.** Sekveneeritud lugemid joondatakse referentsgenoomile. Lugemite tiheduse põhjal saadakse piigid, mida võrreldakse kontroll *input*-i proovi piikidega. Kontroll *input*-ga kõrvutamisel on võimalik eristada kõrgemalt rikastunud piike taustamürast ehk DNA-alk seondumiskohti (muudetud Hoffman & Jones, 2009).

## 2 EKSPERIMENTAALNE OSA

### 2.1 Töö eesmärgid

*Hüpootees:* Kuna *STAT1* GOF mutatsiooniga rakkudes on aeglustunud *STAT1*-e defosforüleerimine, siis ilmselt on immuunkaitses vajalike tsütokiinide signaaliradades häiritud *STAT1* ja *STAT3* fosforüleeritud vormide omavaheline tasakaal. See segab nende transkriptsioonifaktorite seondumist vajalike märklaudgeenide promootoritele ning sellele järgnevat geenide transkriptsiooni.

Eksperimentaalse töö eesmärgid:

1. Stimuleerida patsiendi GOF *STAT1* mutatsiooniga rakke ja kontrollisikute rakke *STAT1* ja *STAT3* signaalirada kasutavate tsütokiinidega ning hinnata võrdlevalt p-*STAT1* ja p-*STAT3* dünaamikat.
2. Võrrelda samade tsütokiinide märklaudgeenide ekspressiooni patsiendi ja kontrollisikute rakkudes.
3. Uurida kvantitatiivse PCR-i abil *STAT1*-e seondumist geenidele *STAT1* ning *IFIH1* ja *STAT3*-e seondumist geenidele *BCL3* ning *TWIST1* patsiendi rakkudes võrreldes tervete rakkudega.
4. Analüüsida *STAT1* seondumist ülegenoomselt sekveneeritud ChIP andmete tulemuste põhjal *STAT1* GOF mutatsiooni kandvates rakkudes võrreldes tervete rakkudega.

### 2.2 Materjal ja meetodika

#### 2.2.1 Uuritav patsient ja kontrollisikud

Antud töös uuriti patsienti, kellel on *STAT1* geenis *gain-of-function* dominantne negatiivne *de novo* mutatsioon. Mutatsioon asub DNA-d seostavas domeenis, kus positsioonis 390 on metioniin asendunud treoniiniga (Met390Thr, A/G). Patsiendi kirjeldus on lisades (lisa 1). Võrdluseks oli 1 - 3 tervet kontrollisikut. Kõik teadustöös olevad uuritavad allkirjastasid informeeritud nõusoleku. Tartu Ülikooli inimuuringute eetika komitee poolt väljastati uuringuteks luba (Primaarsete immuunsüsteemi häirete immunogeneetiline uuring, protokoll number: 235/M-23). Patsiendilt ja kontrollisikutelt võeti 10 ml veeniverd ning Tartu Ülikooli

kliinikumi ühendlabori geneetikakeskuses väike epidermise tükike, millest algatati fibroblastide kultuur.

### 2.2.2 Perifeerse vere mononukleaarsete rakkude eraldamine verest

Perifeerse vere mononukleaarset rakud (*peripheral blood mononuclear cell*, PBMC) eraldati patsiendi ning kontrollisikute vere leukotsüütide kihist. Rakkude eraldamiseks kasutati Ficoll-i gradiendis tsentrifuugimist. 30 ml verd segati võrdse mahu PBS-ga (*phosphate buffered saline*) (Lonza, BioWhittaker). Kahte 50 ml tuubi põhja pipeteeriti 10 ml Ficoll-Paque PLUS lahust (GE Healthcare Bio-Sciences AB) ning mõlemasse tuubi kanti ettevaatlikult Ficoll-lahusele peale 30 ml vere-PBS-i segu. Proovid tsentrifuugiti (5810 R, Eppendorf) pidurduseta 30 minutit 400 x g toatemperatuuril. Moodustunud vereplasma ning Ficoll kihtide vahelt eraldati ettevaatlikult pipetiga mononukleaarsete rakkude fraktsioon ning tõsteti uude 50 ml tuubi. Rakkude pesemiseks lisati 25 ml PBS-i ning tsentrifuugiti 10 min 300 x g, pesu sooritati kaks korda. Seejärel eemaldati pealt PBS ning lisati külmutussööde (10% DMSO FBSis). Krüoviaale rakkudega säilitati vedelas lammastikus.

### 2.2.3 T-rakkude eraldamine ning kasvatamine

T-rakkude eraldamine PBMC-dest ning kasvatamine viidi läbi spetsiifiliste magnetkeradega *Dynabeads Human T-Expander CD3/CD28* (Gibco, Life Technologies) vastavalt tootja protokollile. Esimese etapina pesti Dynabeads Human T-expander CD3/CD8 magnetkerasid puhvriga 1 (Sigma 1% BSA PBSs). Seejärel asetati tuubid magnetlusele MACSiMAG Separator (Miltenyi Biotech), oodati magnetkerade kinnitumist tuubide seintele ning eemaldati supernatant. Tuubid tõsteti aluselt maha ning resuspendeeriti puhvril 1. Külmutatud PBMC-d (10 miljonit) sulatati ettevaatlikult, pesti puhvril 1 ning segati pestud magnetkeradega (1,5 magnetkera ühe raku kohta). Proovid asetati roteeruvale alusele (Biosan) 30 min 4 °C juures. Seejärel pandi tuubid magnetlusele ning eemaldati supernatant, mis sisaldas CD3 negatiivseid rakke (monotsüüdid, B-rakud, NK-rakud). Ettevaatlikult resuspendeeriti kerade-rakkude komplekse 1 ml OpTmizer CTS söötmes (Gibco, Life Technologies), kuhu oli lisatud IL-2 (200 IU/ml Peprotech). Rakud asetati ühte welli (6-wellisel alusel, Thermo Scientific), lisades 5 ml söödet ning hoiti 3 päeva koekultuuri inkubaatoris 37 °C juures, 5 % CO<sub>2</sub> kontsentratsioonil. Pärast 3 päeva segati kultuuri ettevaatlikult, et rakud ja kerad lahti tuleksid aluse põhjast. Eemaldati 50 µl proovi ning rakud

loendati trüpaansinisega. Kui T-rakkude arv oli suurem kui  $10^6$ /ml, siis lahjendati rakke tiheduseni  $0,5 \times 10^6$ /ml. Rakkude paljundamine kestis kokku 14 päeva ning iga kahe päeva tagant lisati söödet koos IL-2-ga (200 IU/ml). Lõpuks eemaldati magnetkerad magnetlusega ning lasti paljundatud rakkudel 2 päeva värskes söötmes puhata. T-raku kasvatamise lõpuks saadi kuni 300 miljonit T-raku, mis külmutati külmutussöötmes 30 miljoni raku kaupa ühes krüoviaalis.

#### 2.2.4 Rakkude kasvatamine ja stimuleerimine tsütokiinidega

Naha fibroblastid kasvasid DMEM (*Dulbecco`s modified eagle medium*) (Gibco, Life Technologies) söötmel. Söötmesse lisati 10 % 56 °C juures inaktiveeritud vasikaloote seerumit, 2 mM glutamiini, 100 U/ml penitsilliini ja 100 µg/ml streptomütsiini. T-rakud kasvasid *OpTmizer CTS T-Cell Expansion SFM* (Gibco, Life Technologies) söötmel. Söötmesse lisati 2 mM glutamiini, 100 U/ml penitsilliini ja 100 µg/ml streptomütsiini. Kõiki rakke kasvatati koekultuuri inkubaatoris 37 °C juures, 5 % CO<sub>2</sub> kontsentratsioonil. Rakke stimuleeriti erinevate tsütokiinidega:

- IFN- $\gamma$  ( $10^4$  U/ml) (Miltenyi Biotec)
- IFN- $\alpha$  ( $10^4$  U/ml) (Miltenyi Biotec)
- IL-6 (25 ng/ml) (PeproTech)
- IL-6R (25 ng/ml) (PeproTech)
- IL-21 (25 ng/ml) (PeproTech)

#### 2.2.5 STAT1 ja STAT3 fosforüleeritud vormide intratsellulaarne määramine voolutsütomeetri abil

Voolutsütomeetriga (*fluorescence-activated cell sorter*, FACS) analüüsiti erinevate tsütokiinide toimet STAT1 ja STAT3 transkriptsioonifaktoritele. BD Cytotfix fikseerimispuhver (BD Biosciences) eelsoojendati 37 °C juures vesivannis (Grant Instruments) 10 minutit. Rakud jagati 100 000 kaupa tuubidesse ning stimuleeriti tsütokiinidega 37 °C juures vesivannis erinevate intervallidega (15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h). Rakud fikseeriti viivitamatult pärast stimulatsiooni lõppu, lisades samas mahus fikseerimispuhvrit (BD Cytotfix fikseerimispuhver (BD Biosciences), et säilitada fosforülatsioonistaadium. Fikseerimine toimus 10 min 37 °C juures. Seejärel lisati 1 ml RB

puhvrit (950 ml 1 x PBS, 50 ml 10% BSA ning 4 ml 0,5M EDTA) ning tsentrifugeeriti (5810 R, Eppendorf) 10 min 300 x g. Supernatant valati ära ning proove raputati lühidalt vorteksiga (Heidolph). Proovidele lisati BD PhosFlow Perm Buffer III permeabiliseerimispuhvrit (BD Biosciences) ning inkubeeriti 30 min jääl. Seejärel pesti proove kaks korda 2 ml RB puhvriga ning tsentrifugeeriti 10 min 300 x g. Proovidelt eemaldati supernatant ja rakud resuspendeeriti 20 µl RB puhvri ning 5 µl antikeha segus. Antikehadena kasutati fosfo-STAT1 (p-STAT1) vastast antikeha (*BD PhosFlow Alexa Fluor 647 Mouse anti-STAT1 (pY701)*, BD Biosciences) ning fosfo-STAT3 (p-STAT3) vastast antikeha (*BD PhosFlow PE Mouse Anti-STAT3 (pY705)*, BD Biosciences). Antikeha ning rakkudega proove inkubeeriti 30 min toatemperatuuril pimedas. Seejärel pesti proove 2 ml RB puhvriga, tsentrifugeeriti 10 min 300 x g ning eemaldati supernatant. Rakke resuspendeeriti 300 µl RB puhvris ning analüüsiti BD LRFortessa FACS-i masinaga (BD Biosciences) kasutades tarkvara FACSDiva.

## 2.2.6 Geeniekspressiooni analüüs

### 2.2.6.1 RNA isoleerimine

RNA eraldati patsiendi ning kontrollisikute stimuleeritud rakkudest (kasutatud tsütokiinide stimulatsioonid on kirjeldatud tulemuste osas), kasutades Rneasy Mikro Kit komplekti (Qiagen) vastavalt tootja protokollile. Pärast RNA eraldamist mõõdeti kontsentratsioone NanoDrop ND-1000 spektrofotomeetriga (NanoDrop Technologies). RNA säilitati -80 °C juures.

cDNA sünteesimisel kasutati *SuperScript* III pöördtranskriptaasi (Invitrogen). Ühe reaktsiooni kohta võeti 1 µl 10mM dNTP segu (Fermentas), 1 µl 500µg/ml oligo(dT)<sub>20</sub> praimerit (Invitrogen) ning 11 µl totaalset RNA-d (0,5 – 1,4 µg). Proove inkubeeriti 5 min 65 °C juures, et praimerid seonduksid RNA-le (RNA lineariseerimiseks) ning seejärel tõsteti proovid 1 min jääle, et peatada sekundaarstruktuuride taasteke. cDNA sünteesimiseks segati kokku ensüümi segu: ühe proovi kohta 4 µl 5 x First Strand puhvrit, 1 µl 0,1 M DTT, 1 µl ribonukleaasi inhibiitorit *RiboLock* (40 U/µl) (Fermentas) ja 1 µl *SuperScript* III pöördtranskriptaasi (200 U/µl). Ensüümi segu resuspendeeriti proovile juurde ning proove inkubeeriti 1 h 50 °C juures. Seejärel inkubeeriti proove 15 min 70 °C juures, et peatada reaktsioon. Saadud cDNA säilitati -20 °C juures.

### 2.2.6.2 RT-PCR

Praimerid disainiti programmidega Primer-BLAST ning telliti firmast Metabion International AG. Ekspressioonianalüüsi praimerid disainiti NCBI andmebaasis vastavalt (Primer-BLAST) uuritavate geenide kodeerivatesse aladesse, et praimerite järjestuste vaheline ala jääks kahe eksoni piiri peale. Disainitud ekspressioonipraimerite järjestused on toodud tabelis 1.

**Tabel 1. Ekspressioonipraimerite järjestused.**

<b>Geen</b>	<b>Forward praimer</b>	<b>Reverse praimer</b>
STAT1	GTTATGGGACCGCACCTTCA	CAGTGAAGTGGACCCCTGTC
IFIH1	ATGGAGCAATATACTAGGACTG	TTGTTTCATTCTGTGTCATGG
BCL3	ACATCGACGCAGTGGACATT	GGAGCTGCCGGAGTACATTT
TWIST1	ACGGAGACCTACCAGGGATG	CTGTCCTCGCTCCGCTTTAT
$\beta$ -ACT	CTGGAACGGTGAAGGTGACA	CGGCCACATTGTGAACTTTG

Pöördtranskriptsiooni polümeraasi ahelreaktsiooni (*reverse transcription polymerase chain reaction*, RT-PCR) eesmärk oli detekteerida tugevamalt ekspresseerunud alasid stimuleeritud patsiendi ning kontrollrakkudes. Proovid analüüsiti RT qPCR meetodiga 384-augulisel mikrotiiterplaadil ViiA 7 masinaga (Applied Biosystems). Iga proovi reaktsioonisegu sisaldas 16,3  $\mu$ l 2x *Maxima<sup>TM</sup> SYBR Green/ROX qPCR Master Mix* (Fermentas), 14,6  $\mu$ l MQH<sub>2</sub>O, 1,5  $\mu$ l 5 mM *forward* ning *reverse* praimerisegu. Reaktsioonisegust 30  $\mu$ l segati 1  $\mu$ l DNA-ga ning jagati 10  $\mu$ l kaupa kolmes korduses plaadile. Kontaminatsiooni kontrollina kasutati MQH<sub>2</sub>O. qPCR-i programmietapid olid polümeraasi aktivatsioon 1 tsüklil 10 min 95 °C juures, 45 tsüklit denaturatsiooni 15 sek 95 °C juures, praimerite seondumist ning produkti paljundamist 1 min 60 °C juures, 1 tsüklil dissotsiatsiooni etappi 95°C juures 15 sek, 1 min 60 °C juures, millele järgnes 1 tsüklil sulamiskõvera analüüsi. Ekspressioonianalüüsi andmeid analüüsiti võrdleva Ct meetodiga, mis puhul kasutati valemit  $2^{-\Delta Ct}$  (Livak & Schmittgen, 2001). Normaliseerimiseks kasutati esmalt koduhoidjat  $\beta$ -ACT ja seejärel normaliseeriti vastavalt madalaima  $\Delta Ct$  väärtusega stimuleerimata rakupopulatsiooni väärtuse suhtes.

## 2.2.7 ChIP-i protokoll

### 2.2.7.1 Rakkude fikseerimine

ChIP-i protokoll modifitseeriti Soome Turku Biotehnoloogia keskuse, Molekulaarse Immunoloogia Grupis kasutusel oleva protokoll järgi (R. Lahesmaa, personaalne kommunikatsioon). Koekultuuri tassidel olevatele rakkudele lisati 1/10 söötme mahust 11 % formaldehüüdi lahust (50 mM Hepes-KOH, pH 7.3, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 11 % Formaldehyde, MQH<sub>2</sub>O), et moodustada ristsidemed DNA ning valkude vahel. Tasse liigutati lühidalt ning lasti seista toatemperatuuril 10 min. Seejärel lisati rakkudele 1/10 söötme mahust 1,25 M glütsiini (AppliChem), et peatada edasine ristsidemete moodustumine. Tasse liigutati taaskord lühidalt ning inkubeeriti 10 min toatemperatuuril. Fibroblastide puhul, mis kinnituvad tassidele, loputati rakke kaks korda 5 ml PBS-ga (Lonza, BioWhittaker) ning kraapimisega koguti rakud kokku 50 ml tuubi. Seejärel tsentrifugeeriti (5810 R, Eppendorf) rakke 10 min 300 x g, eemaldati supernatant ning rakud kiirkülmutati vedelas lammastikus. T-rakkude puhul koguti glütsiinis rakud kokku 50 ml tuubi, põhjast kraabiti kinnitunud rakud lahti. Proove tsentrifugeeriti 10 min 300 x g ning pesti kaks korda 25 ml PBS-ga, pärast mõlemat pesu tsentrifugeeriti uuesti. Supernatant eemaldati ning rakud kiirkülmutati vedelas lammastikus. Kõik proovid hoiustati -80 °C juures.

### 2.2.7.2 Magnetkerade ning antikeha ettevalmistus

Antud etapp oli vajalik, et antikehad kinnituksid magnetkeradele enne kromatiiniga sidumist. Dynabeads M-280 magnetkerad (Sheep anti-Mouse IgG ning Sheep anti-Rabbit IgG, Life Technologies) asetati 30 µl kaupa 1,5 ml tuubidesse. T-rakkude arvu arvestati järgnevalt: 30 µl magnetkerasid / 30 milj rakku, fibroblastide arvu arvestati järgnevalt: 10 µl magnetkerasid / 10 milj rakku. Tuubid asetati jääs seisele magnetlusele ning kerade vedelik eemaldati. Seejärel lisati tuubidele 0,5 ml BSA blokeerimislahust (0,25 g Probumin (Bovine Serum Albumin, BSA) (Millipore) ning 50 ml PBS) ning segati ettevaatlikult tuube üles-alla. Järgnevalt asetati tuubid magnetlusele, et magnetkerad kinnituksid tuubi seinale. Supernatant eemaldati ettevaatlikult ning lisati uuesti 0,5 ml BSA blokeerimislahust. Antud pesemisetappi blokeerimislahusega korrati 3 korda. Viimaks lisati keradele 0,5 ml blokeerimislahust ning 4 µl vastavat antikeha – küüliku STAT1 (#06-501, Millipore), hiire STAT3 (#9139, Cell Signaling) ning negatiivse kontrollina kasutati antikeha küüliku IgG (Millipore). Segu resuspendeeriti ning magnetkerade-antikeha komplekside tekkeks inkubeeriti proove üleöö roteerival alusel (Biosan) 4 °C juures.

### 2.2.7.3 Rakkude lüüsimine ning kromatiini fragmenteerimine

Kromatiin valmistati ette immunosadestamiseks rakkude lüüsimise ning kromatiini fragmenteerimisega. -80 °C juures hoitud proovid sulatati jääl 15 min. Seejärel resuspendeeriti aeglaselt 10 ml jääkülmas lüüsi puhvris I (50 mM Hepes KOH, pH 7.3, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 % Glycerol, 0.5 % NP-40, 0.25 % Triton X-100, MQH<sub>2</sub>O + proteaasi inhibiitori kokteil (50 x tablett / 50 ml kohta) (*Protease Inhibitor Coctain Tablets*, cOmplete, Roche)) ning asetati aeglaselt liikuvale alusele (Heidolph) 10 min 4 °C juures. Proove tsentrifuugiti (5810 R, Eppendorf) 10 min 500 x g 4 °C juures ning eemaldati supernatant. Järgnevalt resuspendeeriti aeglaselt 5 ml toatemperatuuril seisnud puhvris II (200 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 8, 0.5 mM EGTA, 10 mM Tris, pH 8, MQH<sub>2</sub>O + proteaasi inhibiitori kokteil) ning asetati liikuvale alusele 10 min toatemperatuuril. Proove tsentrifuugiti 10 min 500 x g 4 °C juures ja eemaldati supernatant. Seejärel resuspendeeriti proove 1 ml jääkülmas puhvris III (1 mM EDTA pH 8, 0.5 mM EGTA pH 8, 10 mM Tris pH 8, 200 mM NaCl, 0.1 % Na-Deoxycholate, 0.5 % N-lauroylsarcosine, MQH<sub>2</sub>O + proteaasi inhibiitori kokteil) ning materjal tõsteti ümber 15 ml tuubidesse. Sonikeerimine leidis aset eelnevalt jääga külmutatud veevannis ning viidi läbi 10 min (30 sekundiliste *On* ja *Off*) tsüklitena kõrgeima võimsuse juures (*High*, 200 W) Bioruptor UCD-200 sonikaatoriga (Diagenode). Iga 10 minuti tagant lisati jääd jahutamiseks veele ning proove tsentrifuugiti lühidalt 1 min 300 x g. Seejärel eemaldati jää, proovid asetati vette ning alustati uue tsükliga. Kokku sonikeeriti proove 40 min. Kromatiini fragmentide pikkuste optimiseerimine on lisades (lisa 2).

### 2.2.7.4 Kromatiini-magnetkerade-antikeha komplekside teke ja immunopretsipitatsioon

Pärast sonikeerimist tõsteti materjal ümber 1,5 ml tuubidesse ning tsentrifuugiti (5810 R, Eppendorf) 10 min maksimaalsel kiirusel 4 °C juures. Supernatandist tõsteti 15 µl *input*-i jaoks eraldi tuubi ning hoiustati -20 °C juures. Kromatiin jagati 300 µl kaupa eraldi kolme tuubi (kolme antikeha jaoks: STAT1, STAT3 ning IgG). Iga proovile lisati 180 µl TE-puhvrit (10 mM Tris-Cl pH-8.0, 1 mM EDTA pH-8.0) ning 150 µl Triton X-100 puhvrit (1 % Triton-X-100, 0.1 % DOC (värskelt valmistatud), 1 x proteaasi inhibitor, 1 x TE). Seejärel pesti ööläbi roteerunud magnetkerasid uuesti 3 x BSA blokeerimislahusega (kirjeldatud punktis 2.2.7.2) ning viimaks resuspendeeriti kerasid 50 µl blokeerimislahuses. Magnetkeradele lisati kromatiini segu ning proove inkubeeriti üleöö roteeruva alusel (Biosan) 4 °C juures.

Pärast üleöö roteerumist pesti keramid 0,5 ml RIPA puhvriga (50 mM Hepes-KOH, pH 7.6, 500 mM LiCl, 1 mM EDTA, 1 % NP-40, 0.7 % DOC (värskelt valmistada), MQH<sub>2</sub>O + proteaasi inhibiitori kokteil), kogu pesuetapp toimus jääl. Igal pesu korral lisati 1 ml RIPA puhvrit keradele ning proove segati ettevaatlikult tuube üles-alla. Tuubid asetati magnetlusele (Ambion, Applied Biosystems), kerad kinnitusid tuubi seinale ning ettevaatlikult eemaldati supernatant. Seejärel alustati uue pesuga, igat pesuetappi korrati 10 korda. Järgnevalt pesti keramid 0,5 ml TE-puhvriga ning segati. Tuube tseentrifuugiti 10 min 300 x g 4 °C juures ning asetades magnetlusele eemaldati supernatant. Edasine elueerimisetapp toimus toatemperatuuril – elueerimisel eemaldati kromatiin-antikeha kompleksid magnetkeradelt. Proovidele lisati 100 µl elueerimispuhvrit (10 mM Tris, pH 8.0, 1 mM EDTA, 1 % SDS, MQ) ning inkubeeriti termomikseril (Thermomixer comfort, Eppendorf) 30 min 65 °C ja 700 rpm juures. Seejärel tseentrifuugiti proove 1 min maksimaalsel kiirusel toatemperatuuril ning asetati magnetlusele. Supernatant asetati uutesse 1,5 ml tuubidesse. *Input*-d, mis seisid -20 °C juures, viidi elueerimispuhvrit lisades proovidega sama mahuni (100 µl). Proove ning *input*-proove inkubeeriti üleöö 65 °C juures, et lõhkuda ristsidemed DNA ja antikeha vahel. Järgnevalt lisati proovidele 2800 µl TE-puhvrit. Proove töödeldi Rnaasiga (Rnase Coctail Enzyme Mix, Ambion, Life Technologies) termomikseril (Thermomixer comfort, Eppendorf) 1 h 37 °C ja 700 rpm juures, lõppkontsentratsioon oli 0,2 mg/ml. Seejärel töödeldi proove proteinaas K-ga (Thermo Scientific) termomikseril 1 h 55 °C ja 700 rpm juures, lõppkontsentratsioon oli 0,4 mg/ml. Ning viimase etapina puhastati proovid DNA puhastamise komplektiga *MinElute<sup>®</sup>PCR Purification Kit* (Qiagen) vastavalt tootja protokollile.

### 2.2.8 ChIP-i proovide qPCR

Kvantitatiivse polümeraasi ahelreaktsiooni (*quantitative polymerase chain reaction*, qPCR) eesmärk oli detekteerida erinevate immunosadestatud alade rikastust võrreldes kogu kromatiiniga (*input*) vastusena stimulatsioonile patsiendi rakkudes ning kontrollrakkudes. Praimerid disainiti programmidega Primer3 ning telliti firmast Metabion International AG. Promootoralade praimerid disainiti uuritavate geenide märklaudgeenide promootorala transkriptsiooni algussaiti vastavalt ENCODE-i transkriptsioonifaktori seandumissaitide aktiivsemate alade põhjal. Disainitud ChIP-i praimerite järjestused on toodud tabelis 2. qPCR-i meetod on kirjeldatud peatükis 2.2.7. ChIP proovide qPCR-i tulemusi analüüsiti võrdleva Ct meetodiga, kus normaliseeriti proovid *input*-i põhjal kasutades valemit  $2^{-\Delta C_t}$ . Sadestatud proovide väärtused normaliseeriti *input*-i suhtes (protsent *input*-ist).

**Tabel 2. ChIP-i praimerite järjestused.**

<b>Geen</b>	<b><i>Forward praimer</i></b>	<b><i>Reverse praimer</i></b>
STAT1	TGCGCAGGAAAGCGAAAC	GGAACAGCCGCGTCTAATTG
IRF1	CCTTCGCCGCTAGCTCTACAA	CCACCGAGCAATCCAAACAC
STAT3	AGCAGGACATTCCGGTCATCTT	GAGCCAAGAGGAGACTGATACGC
Kontr	CTGAGGTGCGTGGACCTGTT	AGGGTGGAGTCTGGGTGGAA

### 2.2.9 ChIP-i variatsioonikordaja arvutamine

Patsiendi T-rakkudega tehti kolm eraldiseisvat ChIP-i katset. Patsiendi T-rakud olid stimuleeritud IL-21-ga ning ChIP viidi läbi STAT1 ja STAT3 antikehadega. Variatsioonikordaja ehk suhteline viga (CV) arvutati valemiga  $CV(\%) = \sigma / \mu * 100$ , kus  $\sigma$  on kolme ChIP-i katse *STAT3* ning *IRF1* promootorala rikastuse väärtuste standardhälve ja  $\mu$  on kolme ChIP-i katse rikastuse väärtuste keskmine.

### 2.2.10 Raamatukogude valmistamine

Raamatukogude valmistamisel kasutati materjalina patsiendi ning kontrollisiku fibroblaste. Rakke stimuleeriti 3 h IFN- $\alpha$  ja IFN- $\gamma$ -ga. Stimuleeritud proovidele sooritati ChIP katse vastavalt protokollile (kirjeldatud punktis 2.2.7). Kokku valmistati kaheksa raamatukogu: IFN- $\alpha$ -ga stimuleeritud patsiendi *input*, patsiendi ChIP-i proov, kontrollisiku *input*, kontrollisiku ChIP-i proov ning IFN- $\gamma$ -ga stimuleeritud patsiendi *input*, patsiendi ChIP-i proov, kontrollisiku *input*, kontrollisiku ChIP-i proov.

Raamatukogude proovid valmistati Tartu Ülikooli Eesti geenivaramu tuumiklaboris. ChIP-i proovidest tehti raamatukogud, kasutades komplekti *Ovation® Ultralow Library Systems Kit* (NuGeneration Limited, England and Wales) vastavalt tootja protokollile. Raamatukogude valmistamiseks võeti *input* proove 1 ng ning ChIP proove 10  $\mu$ l (hinnanguliselt 0,1 - 1 ng DNA-d).

### 2.2.11 Sekvenerimine

Raamatukogude sekvenerimine viidi läbi Tartu Ülikooli Eesti geenivaramu tuumiklaboris. Teise põlvkonna sekvenerimiseks vajalike adapterite olemasolu raamatukogu fragmentidel kontrolliti kvantitatiivse PCR abil kasutades *Kapa Library Quantification Kit*-i (Kapa Biosystems, Woburn, USA). Proovid sekveneriti Illumina HiSeq2500 masinaga (Illumina, San Diego, USA) kasutades paardunud järjestusi (*paired-end*, PE) 2 x 50 aluspaari. Sekvenerimise toorandmed *demultiplex*-iti CASAVA 1.8.2. (Illumina, San Diego, USA) programmiga lubades 1 vea indeks järjestusetesse. Proovi kohta saadi 12-23 miljonit paardunud järjestust (fastQ järjestusefaili formaadis).

### 2.2.12 ChIP-seq andmete analüüs

Suuremahulised andmetöötluse etapid viidi läbi Tartu Ülikooli Teadusarvutuskeskuse arvutusklastril *Rocket*<sup>3</sup>. Sekvenerimisel saadud toorandmetele tehti esmane kvaliteedikontroll programmiga FastQC<sup>4</sup> (parameetrid: `-t 2 --noextract`), et hinnata, kas raamatukogud on õnnestunud ning kui suure osa kogu andmemahust moodustavad ebakvaliteetsed ja duplikaatsed lugemid. Ebakvaliteetsete nukleotiidide ja lugemite eemaldamiseks kasutati programmi Trim Galore!<sup>5</sup> (parameetrid: `-q 30 --paired --retain_unpaired --fastqc_args '--noextract'`). Lugemitest eemaldati nukleotiidid, mille Phred kvaliteediskoor jäi alla 30 (Phred skoor =  $-10\log_{10}P$ ; P – tõenäosus, et sekvenaator määras lugemis oleva nukleotiidi valesti). Lisaks eemaldas antud tööriist lugemite lõpust adapterjärjestused. Järgmise etapina joondati lugemid referentsgenoomile (GRCh37/hg19) programmiga Bowtie2<sup>6</sup> (parameetrid: `-x hg19 -p 10`). Joondatud lugemid, mille MAPQ skoor jäi alla 30 (MAPQ =  $-10\log_{10}P$ ; P – tõenäosus, et joondus on vale) ja millel puudus paariline lugem, filtreeriti välja SAMtools 1.1 programmiga<sup>7</sup> (`samtools view` parameetrid: `-q 30 -f 2 -b`), jättes seega alles suure tõenäosusega unikaalsed lugemid, mis pärinesid DNA fragmentide mõlemast otsast. Tulemused sorteeriti SAMtools sort programmiga ( parameetrid: `-m 2G -@ 10 -T /tmp/`) ja duplikaatjärjestused eemaldati Picard komplekti<sup>8</sup> kuuluva MarkDuplicates programmiga (`java -Xmx12g -jar REMOVE_DUPLICATES=true ASSUME_SORTED=true`). Joondamistulemuste esialgsed kokkuvõtted (GC%, DNA fragmentide pikkuste, eemaldatud duplikaatide osakaal) koostati samuti Picard programmidega (CollectAlignmentSummaryMetrics: `java -Xmx2g -jar REFERENCE_SEQUENCE = ~/Genomes/hg19.fa ASSUME_SORTED=true`; CollectGcBiasMetrics: `java -Xmx2g -jar ASSUME_SORTED=true`; CollectInsertSizeMetrics: `java -Xmx2g -jar`).

Transkriptsioonifaktori STAT1 seondumiskohad genoomis leiti programmiga MACS2<sup>9</sup> (parameetrid: -f BAMPE -g hs), võrreldes immuunosadestatud proovi signaali kontrollproovi signaali suhtes. Seondumiskohtade genoomseid koordinaate filtreeriti n-õ mustas nimekirjas olevate genoomsete piirkondade suhtes<sup>10</sup>, mis suure tõenäosusega annavad valepositiivseid signaale. Seondumiskohad annoteeriti programmidega (vaikimisi sätted) ChIPseeker<sup>12</sup>, ChIPpeakAnno<sup>13</sup>, GREAT<sup>14</sup> ja MEME-ChIP<sup>15</sup>. Sekvenerimisandmete visualiseerimiseks referentsgenoomil kasutati IGV brauserit<sup>16</sup>.

### 2.2.13 Statistiline analüüs

Stimuleeritud T-rakkude FACS-i katses mõõdeti igas ajapunktis kaks kordust, mille põhjal arvutati keskmine ning standardhälve. Ekspressioonianalüüsi ning ChIP-i katsete graafikutel on qPCR-i triplikaatide keskmine ning SEM (*strandard error of the mean*) ehk standardviga. IL-21 stimulatsiooniga ChIP-i katse oli sooritatud kolmes korduses, mille tulemusena arvutati keskmine ning standardhälve. Sooritati kahepoolne t-test. Tulemuste statistiline analüüs sooritati programmeerimiskeskonnas R (versioon 3.1.3)<sup>17</sup>. Statistilise olulisuse määramiseks ( $p \leq 0,05$ ) FACS-i analüüsil ning ekspressioonianalüüsil leiti 3 kontrollproovi keskmine t-skoor ning nende põhjal arvutati kontrollproovide ning patsiendi vaheline p-väärtus. T-skoor arvutati valemi<sup>18</sup> järgi:

$$t = \frac{\bar{x} - \mu_0}{s/\sqrt{n}}$$

$\bar{x}$  – patsiendi proovi keskmine

$\mu_0$  – kolme kontrolli keskmine

s – patsiendi standardhälve

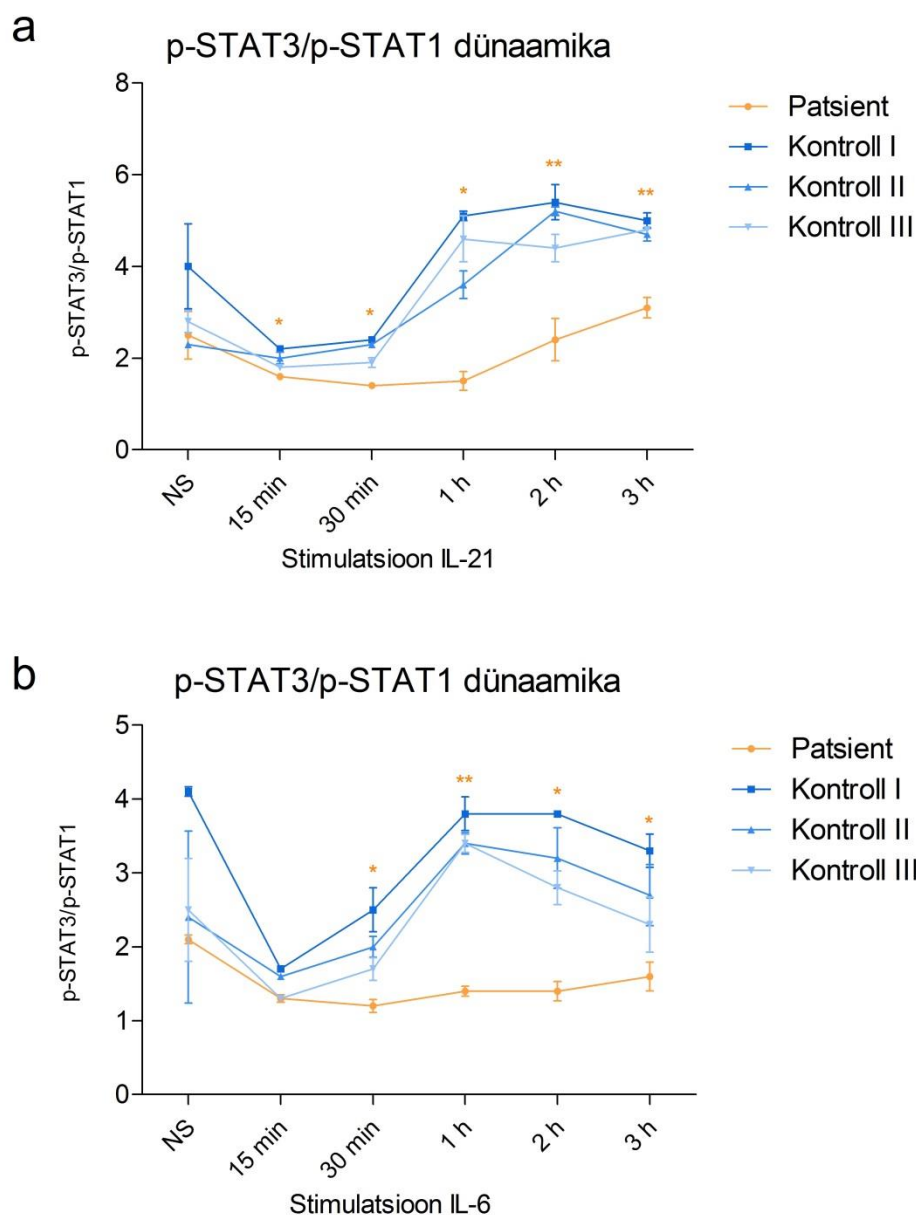
n – proovide arv

Seejärel leiti p-väärtused, mis vastasid kriitiliste t-väärtuste t-jaotustabelile. Katseandmete graafikute joonistamiseks kasutati programmi GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc) ning FlowJo 7.5 (Tree Star Inc).

## 2.3 Tulemused

### 2.3.1 STAT1 ja STAT3 aktivatsiooni dünaamika tsütokiinidega stimuleeritud T-rakkudes

FACS analüüsiga tuvastati intratsellulaarse fosforüleeritud STAT1 ning STAT3 (antikehad p-STAT1, p-STAT3) tasemed T-rakkudes erinevates ajapunktkides. Lisade peatükis on IL-21-ga stimuleeritud proovide näitel toodud FACS-i graafikud (lisa 3). Rakke stimuleeriti tsütokiinidega IL-21 ja IL-6 ning uuriti nende toimet STAT1 ja STAT3 transkriptsioonifaktorite aktivatsioonile patsiendi ning kontrollisikute T-rakkudes. IL-21 ja IL-6 toimel aktiveeritakse rakkudes nii STAT1 kui STAT3. STAT1 valgu fosforüleerimine ja defosforüleerimine toimub suhteliselt kiiresti: p-STAT1 signaali maksimum on 15 minutit pärast stimulatsiooni algust ning on 30 minuti pärast juba veidi madalam. Tund pärast stimulatsiooni algust on p-STAT1 taas algtasemel. STAT3 fosforüleeritud vorm on samuti oma maksimumis juba 15 minutit pärast stimulatsiooni algust, kuid defosforüleerimine on aeglasem, püsides veel 3 tundi pärast stimulatsiooni algust. Seetõttu langeb kontrollisikute rakkudes p-STAT3/p-STAT1 suhe IL-21 ja IL-6 stimulatsiooni esimese poole tunni jooksul ning tõuseb seejärel algtasemest kõrgemale. Kuid patsiendi rakkudes jääb p-STAT3/p-STAT1 suhte tase madalaks ka 3 tunni möödudes, sest p-STAT1 defosforüleerimine on oluliselt aeglustunud võrreldes tervete kontrollidega (joonis 10). Näitamaks patsiendi p-STAT3/p-STAT1 suhte erinevust tervetest kontrollidest, arvutati igas ajapunktis t-skoor kontrollisikute keskmise ja standardhälbe alusel, mis näitab patsiendi väärtuste erinevuse ulatust kontrollidest ning p-väärtus, mis näitab patsiendi erinevuse statistilist olulisust.

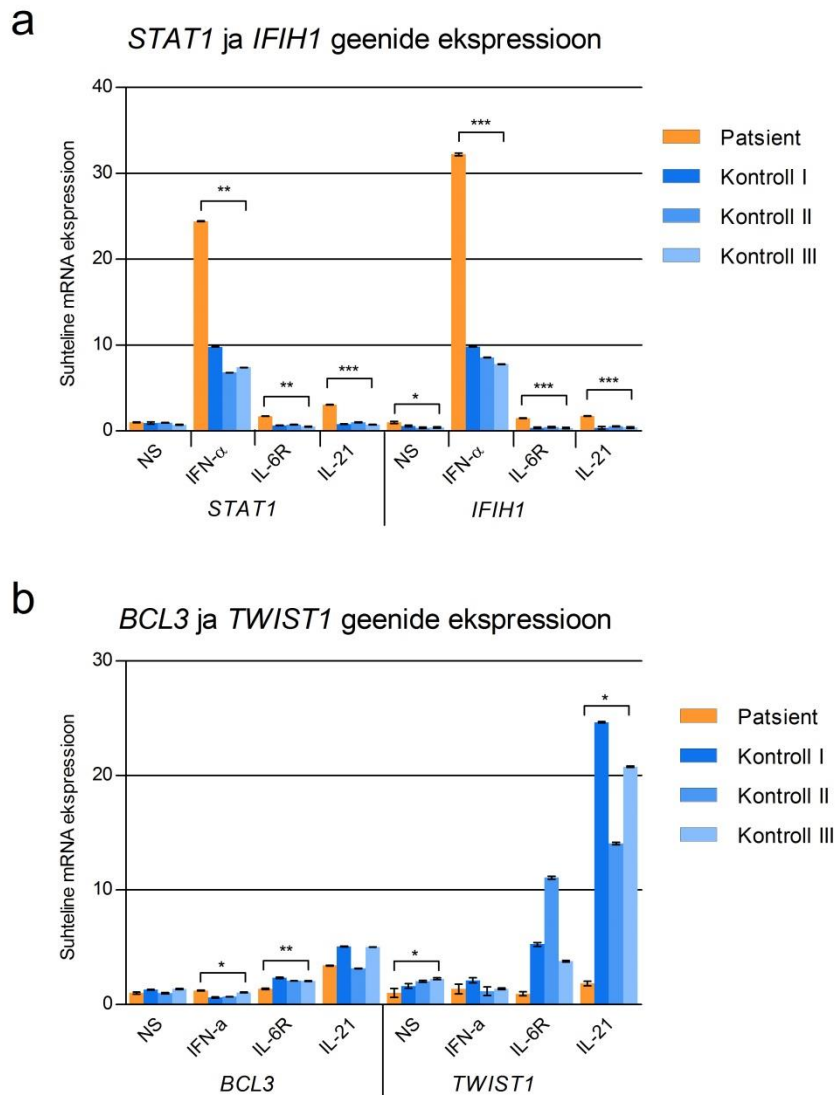


**Joonis 10. Rakkude stimulatsioon IL-21-ga ja IL-6-ga.** Patsiendi ja kontrollisikute T-rakke stimuleeriti a) IL-21-ga ja b) IL-6-ga ning rakke märgistati antikehadega p-STAT1 ja p-STAT3. Rakke stimuleeriti erinevate ajapunktide jooksul – 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h ning stimuleerimata proov (NS, *non stimulated*). Graafikutel on näidatud p-STAT3/p-STAT1 suhte keskmised väärtused ja standardhälve. Keskmiste väärtuste erinevuste statistilise olulisuse hindamiseks arvutati igas ajapunktis patsiendi väärtusele t-skoor ja p-väärtus: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

Kuna patsiendil on selge STAT1 ja STAT3 signaaliülekanne raja häire, siis väljendub see tõenäoliselt ka märklaudgeenide ekspressioonitasemetes tsütokiinidega stimuleerimise järgselt. Antud oletust uuritigi järgmises peatükis.

### 2.3.2 Märklaudgeenide ekspressioonianalüüsi tulemused patsiendi ja kontrollisikute T-rakkudes

Patsiendi ning kontrollisikute stimuleeritud T-rakkudes kontrolliti erinevate geenide ekspressioonitasemeid. Rakke stimuleeriti tsütokiinidega IFN- $\alpha$ , IL-6 + IL-6R (IL-6 retseptor) ning IL-21 4 tundi koekultuuri inkubaatoris, eraldati RNA, sünteesiti cDNA ja kontrolliti ekspressioonitasemeid qPCR-ga. Määrati interferoonide poolt stimuleeritud geene (ISG), mida vahendab STAT1 (märklaudgeenid *STAT1* ja *IFIH1*) ning IL-6 ja IL-21 poolt aktiveeritud STAT3 märklaudgeene *BCL3* ja *TWIST1*. Joonisel 11a on tuvastatav patsiendi T-rakkudes märgatavalt tugevam interferooni stimuleeritud geenide ekspressiooni tõus IFN- $\alpha$  stimulatsiooni järgselt võrreldes tervete kontrollidega. Kui kontrollisikute puhul IL-6 ja IL-21 ISG ekspressiooni ei indutseeri, siis patsiendi rakkudes on see siiski märgatav. STAT3 märklaudgeenide ekspressioon tõuseb vastuseks IL-6 ja IL-21 stimulatsioonile. Iseäranis *TWIST1* puhul on näha puudulik ekspressiooni tõus patsiendi T-rakkudes (joonis 11b). Näitamaks patsiendi geeniekspressiooni erinevust tervetest kontrollidest, arvatati igale stimulatsioonile t-skoor kontrollisikute keskmise ja standardhälbe alusel, mis näitab patsiendi väärtuste erinevuse ulatust kontrollidest, ning p-väärtus, mis näitab erinevuse olulisust.



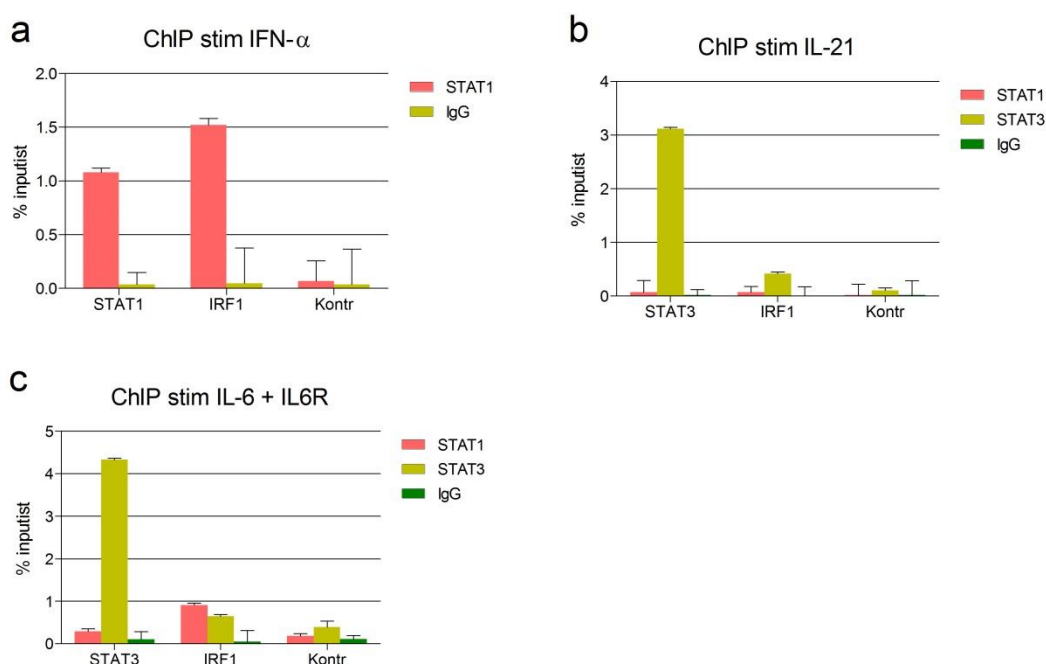
**Joonis 11. STAT1 ja STAT3 märklaudgeenide ekspressioon.** Patsiendi ning kontrollisikute rakke stimuleeriti IFN- $\alpha$ , IL-6 + IL-6R (IL-6R) ja IL-21-ga ning võrdluseks on graafikul stimuleerimata proovid (NS, *non stimulated*). a) *STAT1* ja *IFIH1* geenide ekspressiooni puhul on patsiendi rakkudes tuvastatav IFN- $\alpha$  poolt aktiveeritud geenide ekspressioonitaseme tõus võrreldes kontrollisikutega. b) *BCL3* ja *TWIST1* geenide ekspressioonitaseme tõus on märgatav IL-21 poolt stimuleeritud proovides ning erinevus on olemas ka IL-6 + IL-6R poolt stimuleeritud proovides. Kontrollisikutel on kõrgem tase võrreldes patsiendi rakkudega. Graafikutel on T-rakkude keskmine ekspressioon  $\pm$  SEM. Keskmiste väärtuste erinevuste statistilise olulisuse hindamiseks arvutati iga stimulatsiooni korral patsiendi väärtusele t-skoor ja p-väärtus: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

Kokkuvõtvalt saame järeldada, et *STAT1* GOF mutatsioon häirib *STAT1* ja *STAT3* signaaliraja tasakaalu rakkudes ning *STAT1* ja *STAT3* märklaudgeenide ekspressiooni. See võib olla põhjustatud *STAT1* GOF variandi tugevamast seondumisest GAS ja ISRE järjestustele ning selle variandi inhibeerivast toimest *STAT3* seondumisele *STAT3*-

vahendatud geenide promootoritele. Selle võimaluse uurimiseks hindasime STAT1 ja STAT3 kromatiinile seondumist ChIP meetodikaga.

### 2.3.3 ChIP-i qPCR

ChIP-i katse viidi läbi 30 minuti jooksul stimuleeritud patsiendi ning kontrollisikute T-rakkudega. Kromatiinifragmente sadestati STAT1 ja STAT3 spetsiifiliste antikehadega, negatiivse kontrollina kasutati IgG-d. qPCR-i analüüsil selgitati välja rikastus genoomi erinevates regioonides. Antud ChIP-i katsed sooritati stimuleeritud kontrollisikute T-rakkudele (joonis 12). qPCR-i regioonideks valiti STAT1 seondumissaidid interferoonide poolt indutseeritud geenide promootoritel – *IRF1* ja *STAT1*, ning STAT3 seondumissaiti geeni *STAT3* promootoralas; ning kontrollregioon (Kontr), mis paikneb geenidevahelisel alal. IFN- $\alpha$  stimulatsiooniga proovidel esineb STAT1 rikastus *IRF1* ja *STAT1* geenide promootoritel. IL-21-g ning IL-6-ga stimuleeritud proovidel esineb STAT3 rikastus eelkõige *STAT3* geeni promootoril, mõnevõrra ka *IRF1*-l. Lisaks näitab katse kvaliteeti kontrollregioon (Kontr), millel puudub rikastus, ning negatiivne kontroll IgG on samuti rikastuseta.



**Joonis 12. ChIP katse IFN- $\alpha$ , IL-21 ning IL-6 + IL-6R stimulatsioonidega.** a) Antikehadena kasutati IFN- $\alpha$  stimulatsiooni puhul STAT1-e ning negatiivse kontrollina IgG-d. b) IL-21 ning c) IL-6 + IL-6R stimulatsiooni puhul kasutati antikehadena STAT1-e, STAT3-e ning negatiivse kontrollina IgG-d. Uuritavad regioonid olid geenid *IRF1*, *STAT1*, *STAT3* ning kontrollregioon (Kontr). Graafikutel on ChIP-i proovide keskmine rikastus  $\pm$  SEM.

### 2.3.3.1 ChIP-i katse variatsioonikordaja arvutamine

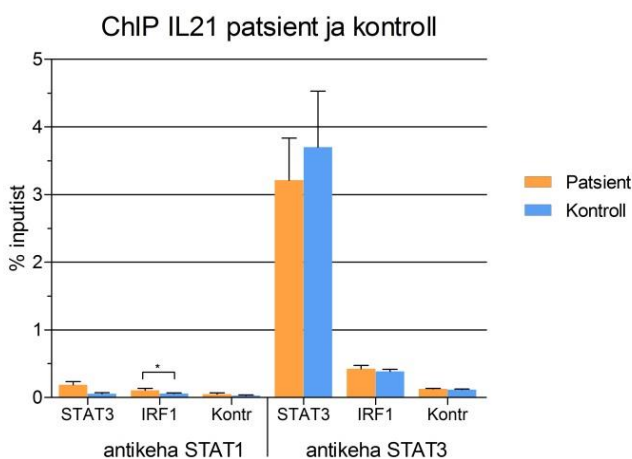
ChIP-i katsekäigu keerukus ning nõudlikkus võib põhjustada varieeruvaid tulemusi. Seetõttu, hindamaks ChIP-i katsete tulemuste korratavust, arvutati välja variatsioonikordajad (CV) ehk suhtelised vead (tabel 3). Kalkulatsioonis kasutati kolme iseseisvat ChIP-i katset sama algmaterjaliga IL-21-ga stimuleeritud patsiendi T-rakkudest. Proove analüüsiti praimeripaariga geenidele *STAT3*, *IRF1* ning variatsioonikordaja arvutati vastavalt STAT3 ja STAT1 antikeha rikastuse baasil.

Tabel 3. ChIP-i katse variatsioonikordajad.

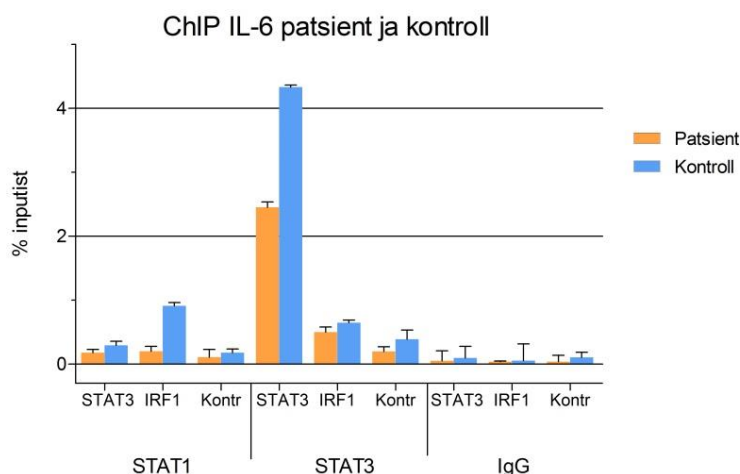
Uuritavate geenide variatsioonikordajad			
	<i>STAT3</i>		<i>IRF1</i>
STAT3 antikeha	19,34 %	STAT1 antikeha	24,05 %

### 2.3.3.2 Stimuleeritud patsiendi ning kontrollisikute ChIP-i proovide qPCR

Edasi analüüsisime patsiendi ning kontrollisikute stimuleeritud T-rakkude ChIP-i proove võrdlevalt. IL-21 stimulatsiooni järgselt ei õnnestunud näidata oluliselt erinevat STAT3 seondumist *STAT3* promootorile. Ainuke statistiliselt oluline seondumise erinevus tuli ilmsiks STAT1 seondumisel *IRF1* promootorile (joonis 13). IL-6 + IL-6 retseptori (IL-6R) stimulatsioonile järgnevat ChIP-i on tehtud vaid ühel korral. Selles katses ilmnis patsiendi T-rakkudes tendents madalamale STAT3 seondumisele *STAT3* geeni promootoralas ning madalamale STAT1 seondumisele *IRF1* geeni promootoralas (joonis 14).



**Joonis 13. Patsiendi ning kontrollisikute ChIP IL-21 stimulatsiooniga.** Patsiendi ning kontrollisikute T-rakkudele sooritati kolm iseseisvat ChIP-i katset. ChIP-i katses kromatiini immunosadestamiseks kasutati antikehasid STAT1 ning STAT3. qPCR-l uuriti praimeripaaridega kindlaid geeniregioone *IRF1*, *STAT3* ning kontrollregioon (Kontr). Graafikutel on ChIP-i proovide keskmine rikastus  $\pm$  standardhälve. Keskmiste väärtuste erinevuste statistilise olulisuse hindamiseks sooritati kahepoolne t-test. Esitatud on korrigeerimata p-väärtus: \*p < 0,05.



**Joonis 14. Patsiendi ning kontrollisikute ChIP IL-6 + IL-6R stimulatsiooniga.** ChIP-i katses kromatiini immunosadestamiseks kasutati antikehasid STAT1 ning STAT3. qPCR-l uuriti praimeripaaridega kindlaid geeniregioone *IRF1*, *STAT3* ning kontrollregioon (Kontr). Graafikutel on ChIP-i proovide keskmine rikastus  $\pm$  SEM.

### 2.3.4 ChIP-seq

STAT1-e ja STAT3-e seondumise ülegenoomseks uurimiseks oli vaja teostada ChIP-seq ehk sekveneerida ja analüüsida kromatiini immunosadestatud materjal. Pilooteksperiment viidi läbi tervete kontrollisikute ja patsiendi naha fibroblastide kasutades (fibroblastid on sobiv allikas patsiendi piiratud rakumaterjali amplifitseerimiseks). Kokku valmistati kaheksa raamatukogu: 3 h IFN- $\alpha$ -ga stimuleeritud patsiendi *input*, patsiendi ChIP-i proov, kontrollisiku *input*, kontrollisiku ChIP-i proov ning 3 h IFN- $\gamma$ -ga stimuleeritud patsiendi *input*, patsiendi ChIP-i proov, kontrollisiku *input*, kontrollisiku ChIP-i proov. Lugemid joondati referentsgenoomile ning andmetest eemaldati ebakvaliteetsed lugemid. *Paired-end* lugemitest saadi fragmendid. Transkriptsioonifaktori STAT1 seondumiskohtade leidmiseks genoomis võrreldi immuunosadestatud proovi signaali kontrollproovi (*input* proovi) signaali suhtes. Antud tulemused on toodud välja tabelis 4.

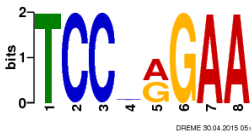

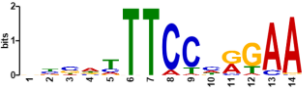

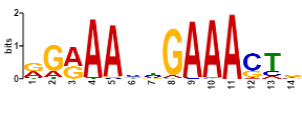



**Tabel 4. Proovide filtreeritud fragmentide ning piikide arv.**

	Proovi nimi	Filtreeritud fragmentid	Piigid	Piigid pärast filtreerimist
1	Patsient_IFN- $\gamma$	9473168	7686	7680
2	Kontroll_IFN- $\gamma$	8635787	2180	2173
3	INPUT_Patsient_IFN- $\gamma$	8658195		
4	INPUT_Kontroll_IFN- $\gamma$	8901120		
5	Patsient_IFN- $\alpha$	5943771	287	262
6	Kontroll_IFN- $\alpha$	4338842	106	100
7	INPUT_Patsient_IFN- $\alpha$	11842117		
8	INPUT_Kontroll_IFN- $\alpha$	7946193		

### 2.3.4.1 Seondumismotiivid

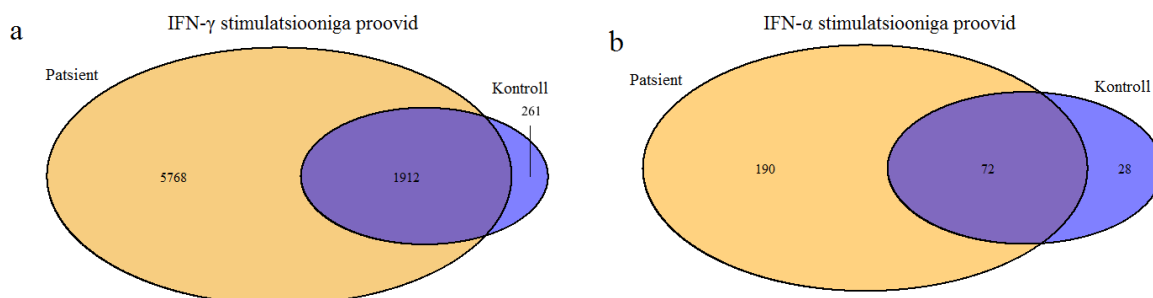
MEME-ChIP programmiga tuvastati, millised seondumismotiivid on kõige sagedamini esindatud ChIP-seq andmestikus (tabel 5). Kasutati seondumiskohtade tipukoordinaatide andmeid. Võeti FASTA järjestus, 50 bp allavoolu ning 50 bp ülesvoolu tipukoordinaadist. Seondumismotiivid on IFN- $\gamma$  proovide puhul STAT3 ning STAT1 seondumismotiivid. IFN- $\alpha$  stimulatsiooni puhul on seondumismotiiviks STAT1:STAT2.

**Tabel 5. ChIP-seqi proovide kõige sagedasemad seondumismotiivid.** Tabelis on välja toodud igale proovile kaks kõige sagedasemat motiivi. Lisatud on sarnaste motiividega geeninimed. E-väärtusega näidati iga motiivi statistilist olulisust.

Proovi nimi	1. motiiv	Sarnased motiivid	E-väärtus	2. motiiv	Sarnased motiivid	E-väärtus
Patsient IFN- $\gamma$		STAT3, STAT1	1.1e-571		RELA	1.1e-131
Kontroll IFN- $\gamma$		STAT1	2.4e-606		JUN::FOS, NFE2::MAF, BATF::JUN	8.3e-024
Patsient IFN- $\alpha$		STAT2::STAT1, PRDM1, IRF2	4.8e-230		STAT1, STAT3	5.0e-158
Kontroll IFN- $\alpha$		STAT2::STAT1	1.9e-149		STAT1	4.3e-019

### 2.3.4.2 Seondumiskohtade kattuvus erinevate proovide vahel

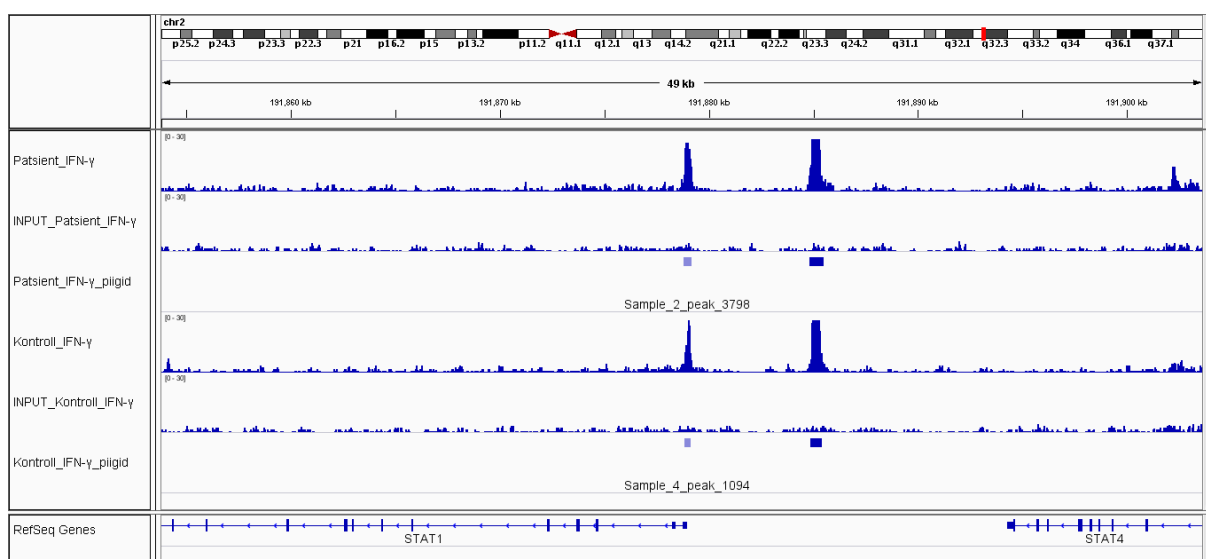
Programmiga ChIPpeakAnno leiti kattuvad seondumiskohad proovide vahel (joonis 15). Lähtuti proovide seondumiskohtade koordinaatidest ning nende põhjal leiti kattuvus. IFN- $\gamma$  stimulatsiooniga proovide vahel oli tugev kattuvus, kontrolli seondumiskohtadest kattus patsiendi piikidega 88%, niisamuti IFN- $\alpha$  stimulatsiooni puhul kattus kontrolli piikidest 72% patsiendi piikidega.



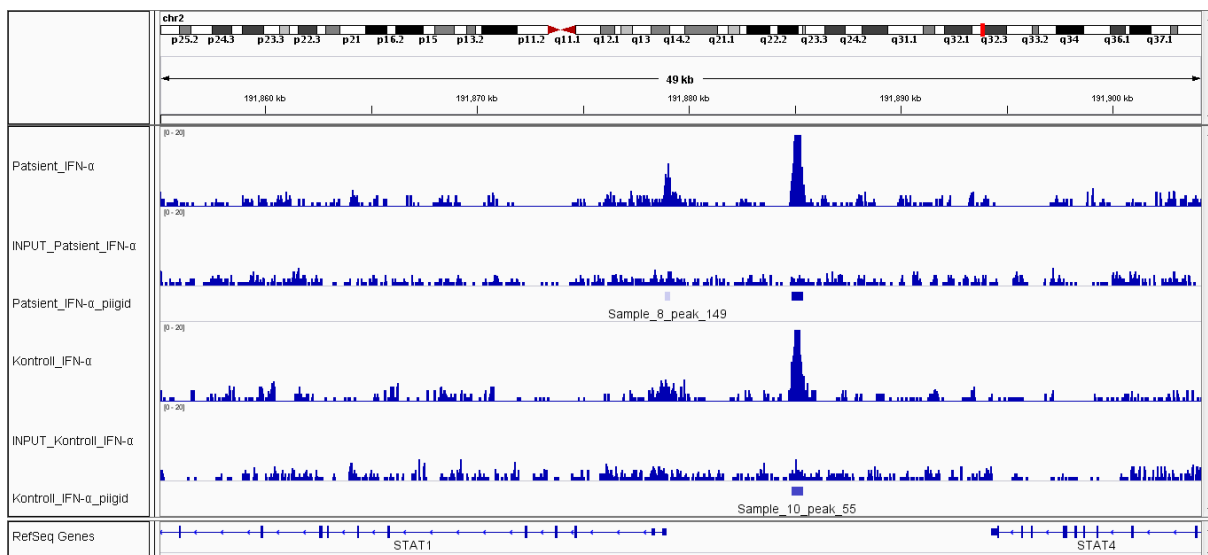
**Joonis 15. Kattuvad seondumiskohad proovide vahel.** a) IFN- $\gamma$  ning b) IFN- $\alpha$  stimulatsiooniga patsiendi ning kontrolli piikide kattuvus.

### 2.3.4.3 Joondatud lugemid ning piigid genoomibrauseris

Sekvenerimisandmete visualiseerimiseks referentsgenoomil kasutati IGV brauserit. Brauseris vaadeldi proovide referentsgenoomile joondatud filtreeritud lugemeid ning piike (joonis 16 ning 17). Lugemite ning seondumiskohtade genoomseid koordinaate filtreeriti n-õ mustas nimekirjas olevate genoomsete piirkondade suhtes.



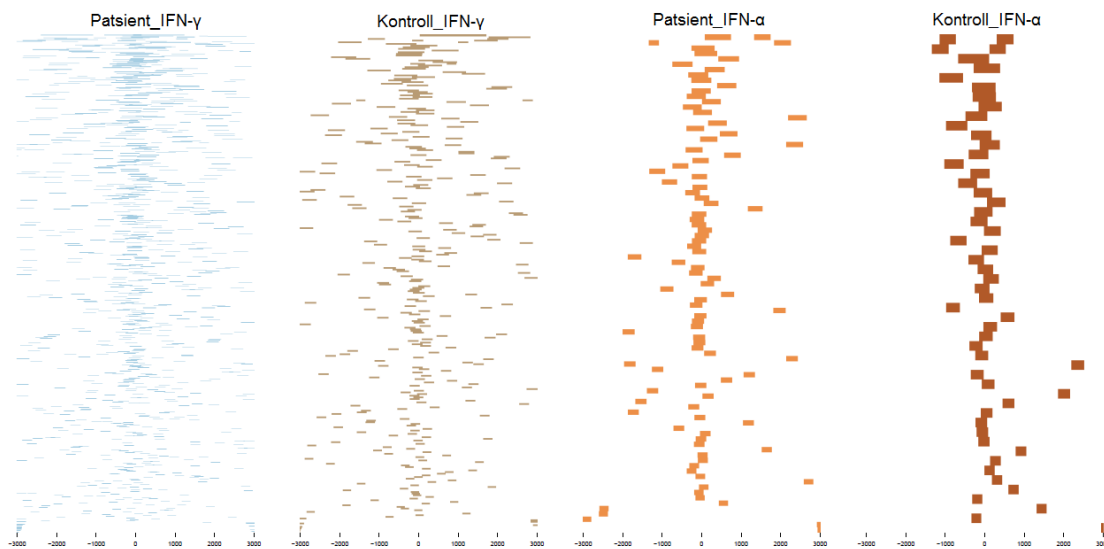
**Joonis 16. IGV brauseriga visualiseeriti STAT1 geen IFN- $\gamma$  stimuleeritud proovide puhul.** Nii patsiendi kui ka kontrollisiku proovidel leiti seondumiskohad STAT1 geeni startsaidis.



**Joonis 17.** IGV brauseriga visualiseeriti *STAT1* geen IFN- $\alpha$  stimuleeritud proovide puhul. Patsiendi proovis leiti seondumiskoht *STAT1* geeni startsaidis. Kontrollisikul ei suudetud seondumiskohta tuvastada *STAT1* geeni startsaidis antud eksperimendi puhul.

#### 2.3.4.4 Transkriptsiooni startsaidide heatmap-d

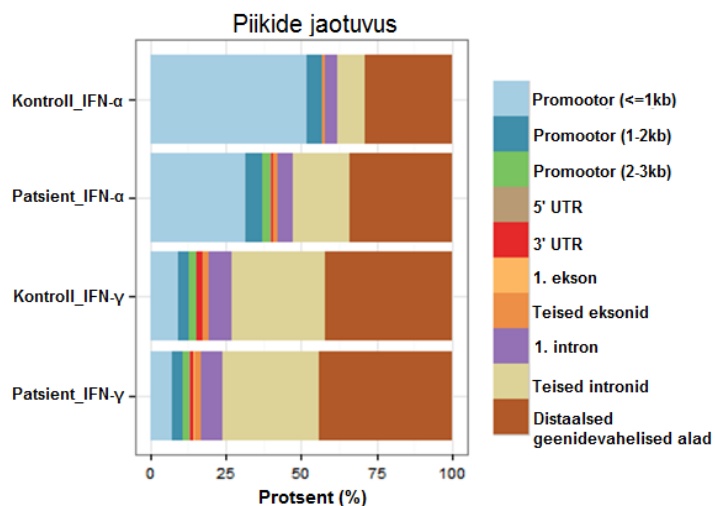
Piikide omaduste uurimiseks eraldati transkriptsiooni startsaidide (*transcription startsite*, TSS)  $\pm$  3000 aluspaari sisse jäävad piigid ning koordinaatidest koostati heatmap-d (joonis 18).



**Joonis 18.** TSS  $\pm$  3000 bp heatmap-d. Graafikul on näha, et IFN- $\gamma$  stimuleeritud proovidel on rohkem piike, mis vastab ka eelnenud infole. Sellegipoolest iga proovi puhul on märgata muster, et enamik piike jääb TSS alasse.

### 2.3.4.5 Piikide jaotuvus geenis

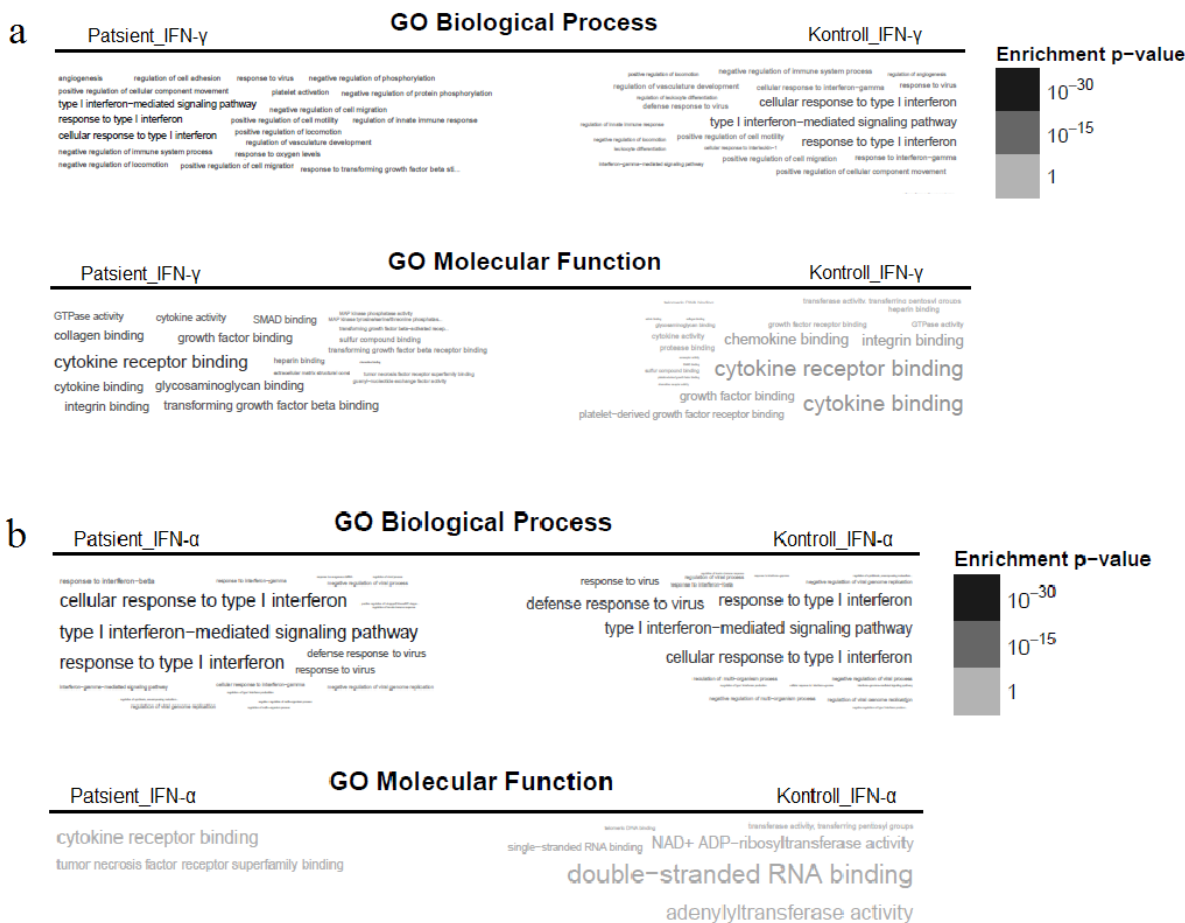
Piikide jaotuvust uuriti programmiga ChIPseeker. Hinnati seondumiskohtade kattuvust geeni erinevate osadega (nt promootor, 5' UTR, 3' UTR jmt). IFN- $\alpha$ -ga stimuleeritud proovide seondumiskohad asuvad enamasti promootoralades. See-eest aga IFN- $\gamma$ -ga stimuleeritud proovide seondumiskohad jäävad geenidest kaugemale, enamasti geenidevahelistesse aladesse (joonis 19).



**Joonis 19. Piikide jaotuvus geenis.** IFN- $\alpha$ -ga stimuleeritud proovide puhul asuvad piigid enamasti promootoralades. IFN- $\gamma$ -ga stimuleeritud proovide piigid jäävad aga enamasti geenidevahelistesse aladesse.

### 2.3.4.6 Annoteerimine lähedal asuvate geenidega

Annoteerimine viidi läbi lähedal asuvate geenide põhjal ning tulemusena saadi bioloogilised terminid, mis seostuvad antud proovide piikide regioonidega. Nii IFN- $\alpha$ -ga kui ka IFN- $\gamma$ -ga stimuleeritud proovide puhul leiti interferoonispetsiifilisi termineid ning radasid (joonis 20).



**Joonis 20. Annoteerimine lähedal asuvate geenidega. Nii a) IFN-γ-ga kui ka b) IFN-α-ga stimuleeritud proovide puhul leiti interferoonispetsiifilisi termineid ning radasid.**

## Arutelu

Käesoleva uurimistöö patsiendi dominantne negatiivne *de novo* mutatsioon asub DNA-d seostavas domeenis – kromosoomis 2 positsioonis 390 on metioniin asendunud treoniiniga (Met390Thr, A/G). Programm PolyPhen2 ennustab, et antud positsioonis olev mutatsioon on ilmselt kahjustava mõjuga (<http://genetics.bwh.harvard.edu/cgi-bin/pph2/dbsearch.cgi>). Uuritava mutatsiooni patogeensusele viitab STAT1-e hüperfosforüleerumine nii IFN- $\alpha$  kui IL-6 stimulatsiooni järgselt. Voolutsütomeetrist p-STAT1-e määramist soovitatakse ka juba diagnostilise testina kasutada, et hõlbustada GOF *STAT1* mutatsiooniga CMC patsientide tuvastamist (Mizoguchi et al., 2014).

STAT1-e hüperfosforüleerumise põhjuseks peetakse STAT1 valgu aeglasemat defosforüleerimist. Nimelt kui 15 minutit pärast stimulatsiooni algust töödelda rakke staurosporiiniga ehk türosiini kinaasi inhibiitoriga, siis tervel isikul langeb p-STAT1-e tase märgatavalt, kuid patsiendi rakkudes säilib p-STAT1-e signaal (Mizoguchi et al., 2014). Selles töös uuritud patsiendil on samuti T-rakkudes aeglustunud STAT1-e defosforüleerimine ning leiab aset valgu hüperfosforüleerimine. Defosforüleerimise häire põhjused ei ole täpselt teada, kuid varasematele töödele toetudes võib teha mõningaid oletusi. Varasemalt on kindaks tehtud, et STAT1 signaaliülekanDES leiab aset dimeeri konformatsiooni muutus paralleelse ning antiparalleelse vormi vahel. Paralleelne vorm fosforüleeritakse ning seondatakse DNA-ga. Dimeeri defosforüleerimiseks moodustub paralleelsest vormist antiparalleelne, viimast presenteeritakse fosfataasidele. Antiparalleelses vormis DBD üks monomeer interakteerub teise monomeeri CC-domeeniga (Zhong et al., 2005). Hüperfosforüleerumise põhjuseks võib olla antiparalleelse konformatsiooni stabiilsuse häiritus, mille tulemusena on fosfataaside töö takistatud (Meyer, Marg, Lemke, Wiesner, & Vinkemeier, 2003; Staab, Herrmann-lingen, & Meyer, 2013). Antud uurimistöös patsiendi mutatsioon asub positsioonis 390, mis on lähedal DBD domeeni positsioonidele CC-domeeniga seandumiseks. Seega uuritav mutatsioon võib samuti olla vajalik CC-domeeniga seandumiseks, et stabiliseerida antiparalleelset konformatsiooni defosforüleerimiseks.

Kuidas *STAT1* GOF mutatsioon põhjustab CMC-d, pole kaugeltki veel selge. Veel ei ole suudetud kindlaks teha, kuidas mõjutab *STAT1* GOF mutatsioon transkriptsioonifaktorit STAT3 ning mis põhjusel on kandidoosi patsientidel vähenenud Th-17 rakkude produktsioon. Varasemalt on leitud, et kandidoosi vastuvõtlikkus on põhjustatud Th-17 raku funktsionaalsetest häiretest (Puel et al., 2011). STAT1 signaaliraja tsütokiinid IFN- $\alpha/\beta$ , IFN- $\gamma$

ning IL-27 on Th-17 rakkude diferentseerumise inhibiitorid (Villarino et al., 2010) ning STAT3 signaaliraja tsütokiinid IL-6, IL-23 ning IL-21 indutseerivad Th-17 rakkude diferentseerumist (Yang et al., 2007). Kuna nii IL-6 kui IL-21 indutseerivad lisaks p-STAT3-le ka teatud määral p-STAT1-e, võib korrektse signaaliülekanne jaoks olla vajalik kindel p-STAT1-e ja p-STAT3-e omavaheline tasakaal. Käesolevas töös keskendusime tsütokiinide IL-6 ning IL-21 aktiveeritavatele signaaliradadele, mis on olulised Th-17 rakupopulatsiooni tekkimiseks. Tavaliselt toimub STAT1 valgu fosforüleerimine ja defosforüleerimine suhteliselt kiiresti, juba 30 minuti pärast hakkab p-STAT1-e signaalitase taas langema. Ühe tunni pärast on p-STAT1 taas algtasemel. Kuid patsiendi rakkudes jääb p-STAT1-e kõrge tase püsima ka 3 tunni möödudes ja seetõttu on oluliselt häiritud STAT3 ja STAT1 fosfovormide normaalne tasakaal, mis tõenäoliselt põhjustab muutusi ka geeniekspressioonis. Signaali kestus määrab ilmselt paljuski geenitranskriptsiooni iseloomu (Fowler, Kuchroo, & Chakraborty, 2012).

Kuna patsiendil on selge STAT1 ja STAT3 signaaliülekanne raja häire, siis järgnevalt uurisime erinevusi märklaudgeenide ekspressioonitasemetes. IFN- $\alpha$  stimulatsiooni järgselt on STAT1 faktori poolt vahendatavate märklaudgeenide *STAT1* ja *IFIH1* puhul tuvastatav patsiendi T-rakkudes märgatavalt tugevam interferooni stimuleeritud geenide (ISG) ekspressiooni tõus. See on kooskõlas varem avaldatud tulemustega et GOF mutatsioonid võimendavad IFN- $\alpha$  stimulatsiooni järgset rakulist vastust, mis potentsiaalselt inhibeerib IL-17 rakuliini diferentseerumist (Liu et al., 2011; Takezaki et al., 2012). Kui kontrollisikute puhul interleukiinid IL-6 ja IL-21 ISG ekspressiooni ei indutseeri, siis patsiendi rakkudes on see siiski märgatav ning seletatav juba eespool kirjeldatud tugevama p-STAT1 vastusega neile tsütokiinidele. Ka varem on näidatud, et patsientide Epstein-Barr viirusega transformeeritud B-rakud annavad vastuseks IL-6-le ja IL-21-le tugevama p-STAT1 signaali kui kontrollisikud (Liu et al., 2011). Lisaks õnnestus käesolevas töös näidata, et STAT3 märklaudgeenide *BCL3* ja *TWIST1* ekspressioonitase on IL-21 ning IL-6 poolt stimuleeritud kontrollisikutel kõrgema tasemega võrreldes patsiendi T-rakkudega.

Kokkuvõtvalt antud tulemustest järeldasime, et *STAT1* GOF mutatsioon häirib STAT1 ja STAT3 signaaliraja tasakaalu ning märklaudgeenide ekspressiooni. See võib olla põhjustatud *STAT1* GOF variandi tugevamast seondumisest GAS ja ISRE järjestustele ning selle variandi inhibeerivast toimest STAT3-e seondumisele märklaudgeenide promootoritele. Sarnane võimalus on välja pakutud varasemas uurimistöös, et STAT1 supresseerib STAT3-e funktsiooni, asendades STAT3-e seondumisel märklaudgeeni promootorile (Hu & Ivashkiv, 2009). STAT1 $\beta$  isovormi, millel puudub transkriptsiooni aktivatsiooni domeen, seondumine

promootorile põhjustaks transkriptsiooni inhibitsiooni. Või STAT1-e seandumisel promootorile kaasab esimene supressorvalgu STAT3-e inhibeerimiseks. Kuid siiani on väga vähe tõendusmaterjali mehhanismi kohta, mis võistleks DNA seandumiskohtade või transkriptsiooni koaktivaatorite pärast (Hu & Ivashkiv, 2009).

Et uurida, kas STAT valkude seandumine kromatiinile on muutunud GOF mutatsiooni mõjul, uurisime STAT1-e ja STAT3-e seandumist märklaudgeenide promootoritele kromatiini immunopretsipitatsiooni (ChIP) abil. Vastupidiselt meie hüpoteesile ei olnud IL-21 stimulatsiooni järgselt STAT3-e seandumine *STAT3* promootorile patsiendi rakkudes oluliselt madalam kui kontrollisikutel. Ainuke statistiliselt oluline seandumise erinevus tuli ilmsiks STAT1-e seandumisel *IRF1* promootorile (patsiendil pisut kõrgem). IL-6 stimulatsioonile järgnevalt ilmnis patsiendi T-rakkudes tendents madalamale STAT3 faktori seandumisele *STAT3* geeni promootoralas, kuid ka madalamale STAT1-e seandumisele *IRF1* geeni promootoralas. Statistilise analüüsi tegemiseks vajaks see eksperiment veel kordamist paralleelselt erinevate tervete kontrollisikute T-rakkudega. Üllatuslikult sarnane STAT3-e seandumine IL-21 stimulatsiooni puhul võib olla põhjustatud mitmetest faktoritest. On võimalik, et 30-minutiline stimulatsioon on liiga lühike, et erinevused hakkaksid ilmnema. 30-minutiline stimulatsioon sai valitud esialgsete pilootkatsete alusel, kus STAT3 andis hilisemates ajapunktides juba tunduvalt madalamat rikastust. Samuti ei ole ChIPi abil võimalik hinnata, kui palju seostunud STAT3-st oli promootoril homodimeerina ja kui palju heterodimeerina STAT1-ga. Homo- ja heterodimeeri seandumisel promootorile võivad olla erinevad tulemid geeniekspressioonile (Hu & Ivashkiv, 2009). Avatud geeni märgib histooni H3 4. lüsiini trimetülatsioon (*histone H3 trimethyl Lys4*, H3K4me3) ning suletud geeni regiooni märgib histooni H3 27. lüsiini trimetülatsioon (*histone H3 trimethyl Lys27*, H3K27me3) (Barski et al., 2007). On võimalik, et pideva kõrgeenenud IFN-delt tuleva signaali tõttu on tekkinud patsiendi rakkudes promootoritel histoonide modifikatsioonid, mis soodustavad ISG-de ekspressiooni (*histone H3 trimethyl Lys4*, H3K4me3) ja takistavad IL-6 ja IL-21 märklaudgeenide ekspressiooni (geenide promootoritel H3K27me3).

STAT1-e ja STAT3-e seandumise uurimiseks ülegenoomselt planeerisime ChIP proovide sekveneerimist. Pilooteksperimendis kasutati patsiendi ning kontrollisikute naha fibroblaste, kuna patsiendi rakumaterjal on piiratud ning fibroblaste on võimalik suurtes kogustes amplifitseerida. Katsetati IFN- $\alpha$  ning IFN- $\gamma$  stimulatsiooni ning STAT1 faktori vastast antikeha kromatiini pretsipiteerimiseks. ChIP-seq andmeanalüüsil saadud seandumiskohtade ehk piikide arvu erinevus patsiendi ja kontrollisiku proovides oli oodatava suunaga: patsiendil leidis piike rohkem. IFN- $\alpha$ -ga stimuleeritud proovidel oli seandumiskohti

tunduvalt vähem võrreldes IFN- $\gamma$  stimulatsiooniga. See võib tuleneda asjaolust, et IFN- $\alpha$  indutseerib STAT1:STAT2 heterodimeeri ning madalamad piigid võisid jääda materjali vähesuse tõttu detekteerimata. Seandumismotiivide analüüs näitas, et kõige sagedamini esineb STAT valgu seandumismotiiv. Genoomibrauseris on näha piigid kindlates regioonides, nt *STAT1* geeni transkriptsiooni startsaidis. Proovide andmeid annoteeriti lähedal asuvate geenidega ning tulemusena saadi interferoonispetsiifilisi termineid ning radasid. Seega sobib kasutatud meetod STAT1 seandumissaitide võrdlevaks uurimiseks. Seandumiskohtade kattuvus on küllaltki suur mõlema stimulatsiooni korral. See on ka oodatav, sest geenide repertuaar, mida kumbki IFN indutseerib on samuti suures osas kattuv. IFN- $\alpha$ -ga stimuleeritud proovide puhul asuvad piigid enamasti promootoralades. IFN- $\gamma$ -ga stimuleeritud proovide piikidest jääb aga suur osa geenidevahelistesse aladesse. Et välistada katse tehnilisest veast tulenevat ekslikku järeldust, on vaja katset korrata erinevate kontrollisikutega võrreldes.

Edasine plaan oleks uurida STAT1:STAT3 heterodimeeri osakaalu GOF mutatsiooniga rakkudes. Kuidas toimub täpselt homo- või heterodimeerse vormi tekke regulatsioon ning kuidas see mõjutab funktsionaalselt signaalirada, pole siiani selge. Varasemalt on välja toodud hüpoteese, kuidas STAT1 inhibeerib STAT3-e funktsiooni. Nimelt STAT1 hõivab STAT3 valgu STAT1:STAT3 heterodimeersesse vormi, mille tulemusena väheneb STAT3:STAT3 homodimeeri osakaal. STAT3-e liitmine STAT1:STAT3 heterodimeersesse vormi esineb sagedamini rakkudes, kus on suuremas koguses STAT1 valku. On võimalik, et STAT1:STAT3 heterodimeer on transkriptsionaalselt madalama aktiivsusega võrreldes STAT3 homodimeeriga või heterodimeer suudab seonduda alternatiivse promootoralaga (Hu & Ivashkiv, 2009). Edasine plaan oleks uurida ka histooni modifikatsioone ning nende seotust STAT1 transkriptsioonifaktoriga. Praeguse hüpoteesi kohaselt ootame *STAT1* GOF variandi korral avatud kromatiinile iseloomulike märgiste kõrgemat taset ISG promootoritel ning madalamat taset STAT3 märklaudgeenidel. Lisaks võiks uurida ka erinevaid rakutöötusi STAT1-e hüperfosforüleerimise vastu. Atsetüleerimise soodustamine taastab *STAT3*-e geeniekspressiooni. Histooni deatsetülaasi inhibiitor pidurdab STAT1 funktsioneerimist (Klampfer, Huang, Swaby, & Augenlicht, 2004). STAT1 valgu inhibitsioon fludarabiiniga parandab STAT3-e funktsiooni. Fludarabiin inhibeerib tsütokiiniga indutseeritud STAT1 valgu aktivatsiooni ning STAT1-st sõltuvat geenitranskriptsiooni (Frank, Mahajan, & Ritz, 1999). Need võivad olla ka potentsiaalseteks ravimiteks *STAT1* GOF mutatsiooniga patsientidele.

## KOKKUVÕTE

Kroonilise mukokutaanse kandidoosi (CMC) pärilike vormide uuringud panustavad suuresti seeninfektsioonide vastaste immuunmehhanismide paremasse mõistmisse. Kõiki CMC-ga seotud monogeenseid haigusi on seostatud spetsiifilise lümfotsüütide subpopulatsiooni, T-helper 17 abistajarakkude (Th-17), defektse diferentseerumise või kahjustunud funktsioneerimisega. Th-17 abistajarakk vahendab immuunvastust rakuväliste patogeenide – bakterite ning seente vastu. Antud rakkude diferentseerumise eest vastutavad tsütokiinid signaliseerivad läbi transkriptsioonifaktori STAT3, samas nende arengut inhibeerivad STAT1 faktori kaudu signaliseerivad tsütokiinid. Käesoleva uurimistöö eesmärk oli välja selgitada molekulaarne mehhanism, mis selgitab T-helper 17 rakkude defektset diferentseerumist CMC patsientides, kellel on *STAT1* geenid dominantne negatiivne *gain-of-function* (GOF) mutatsioon. Antud töös suutsime näidata, et Th-17 rakke indutseerivad tsütokiinid IL-21 ning IL-6 on seotud STAT1 hüperfosforüleerimise ning faktori hilinevad defosforüleerimisega patsiendi rakkudes. Tsütokiinidega stimuleerimisel aset leidnud aktiivsete fosforüleeritud STAT1 ning STAT3 omavaheline tasakaalu häire põhjustas patsiendi rakkudes ilmselt häireid ka geeniekspressioonis. Patsiendi T-rakkudes esines märgatavalt tugevam STAT1 faktori vahendatud interferooni stimuleeritud geenide ekspressioon. STAT3 märklaudgeenid olid madalamat RNA ekspressiooni patsiendi T-rakkudes võrreldes tervete kontrollidega. Kromatiini immunopretsipitatsiooni (ChIP) eksperimendiga soovisime välja selgitada, kas *STAT1* GOF mutatsioon mõjutab transkriptsioonifaktorite seondumist märklaudgeenide promootoraladega pärast tsütokiinidega stimuleerimist. Vastupidiselt meie seatud hüpoteesile ei osutunud patsiendi T-rakkudes STAT3 faktori seondumine *STAT3* geeni promootoralale märkimisväärselt madalamaks võrreldes kontrollisikutega. ChIP-seq andmeanalüüsil leitud seondumiskohtade ehk piikide arvu erinevus patsiendi ja kontrollisiku proovides oli oodatava suunaga – patsiendil esines interferoonide toimetel piike rohkem. Antud uurimistöö tulemused aitavad paremini mõista haigust põhjustavat mehhanismi *STAT1* GOF mutatsiooniga patsientides ning hõlbustavad leida parimat võimalikku ravi.

## SUMMARY

### **The impact of *STAT1* gain-of-function mutation on JAK-STAT signaling pathway**

Epp Kaleviste

Studies on hereditary forms of chronic mucocutaneous candidiasis (CMC) have contributed a lot to the understanding of the mechanisms of immune protection against fungal pathogens. Monogenic diseases associated with CMC are all connected with defective differentiation or impaired function of a very specific lymphocyte subpopulation called T helper 17 (Th17). Th17 cells mediate immune protection against extracellular pathogens – bacteria and fungi. Their differentiation is governed by cytokines that signal through the transcription factor STAT3, while their development is opposed by interferons that signal through STAT1. The aim of the current thesis was to find the molecular mechanisms that could lead to defective Th17 differentiation in CMC patients with dominant negative gain-of-function (GOF) mutations in the *STAT1* gene. We were able to show that Th17-inducing cytokines IL-21 and IL-6 are associated with STAT1 hyperphosphorylation and delayed dephosphorylation of the transcription factor. Probably this imbalance of active phosphorylated forms of STAT1 and STAT3 after cytokine stimulation provoked disturbed gene expression. The interferon stimulated genes that are the target genes of STAT1 had considerably higher expression levels in the cells of the patient. For STAT3 the target genes had lower expression in the patient's cells. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments were then performed to investigate if the *STAT1* GOF variant affected the binding of the transcription factor to the target gene promotor regions in response to cytokine stimulation. As opposed to our hypothesis the binding of STAT3 to the promoter of the *STAT3* gene was not considerably lower compared to healthy controls. In ChIP-seq analysis the number of STAT1 binding sites in response to interferon stimulation was higher in patient cells as expected. The results of the thesis help to understand the mechanisms that cause the disease in patients with *STAT1* GOF mutations and to find the best possible cure.

## Tänuõnad

Tänaksin abi ja toetuse eest oma juhendajaid Kai Kisandit ning Lili Milanit. Tänuõnad ka molekulaarpatoloogia töögrupi liikmetele Mario Saarele ning Maire Pihlapile ja teistele toredatele kolleegidele. Lisaks tänan moraalse toe eest oma lähedasi – Hindrek Tederit, Ann Kalevistet ning teisi perekonnaliikmeid.

## Kasutatud kirjanduse loetelu

- Bach, E. A., Aguet, M., & Schreiber, R. D. (1997). THE IFN $\gamma$  RECEPTOR: A Paradigm for Cytokine Receptor Signaling. *Annual Review of Immunology*, 15(1), 563–591. doi:10.1146/annurev.immunol.15.1.563
- Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T.-Y., Schones, D. E., Wang, Z., ... Zhao, K. (2007). High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell*, 129(4), 823–37. doi:10.1016/j.cell.2007.05.009
- Bromberg, J., & Wang, T. C. (2009). Inflammation and cancer: IL-6 and STAT3 complete the link. *Cancer Cell*, 15(2), 79–80. doi:10.1016/j.ccr.2009.01.009
- Casanova, J.-L., Holland, S. M., & Notarangelo, L. D. (2012). Inborn errors of human JAKs and STATs. *Immunity*, 36(4), 515–28. doi:10.1016/j.immuni.2012.03.016
- Collas, P., & Dahl, J. A. (2008). Chop it, ChIP it, check it: the current status of chromatin immunoprecipitation. *Frontiers in Bioscience : A Journal and Virtual Library*, 13, 929–43. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17981601>
- Costa-Pereira, A. P., Tininini, S., Strobl, B., Alonzi, T., Schlaak, J. F., Is'harc, H., ... Poli, V. (2002). Mutational switch of an IL-6 response to an interferon-gamma-like response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(12), 8043–7. doi:10.1073/pnas.122236099
- Darnell Jr., J. E. (1997). STATs and Gene Regulation. *Science*, 277(5332), 1630–1635. doi:10.1126/science.277.5332.1630
- Dong, C. (2006). Diversification of T-helper-cell lineages: finding the family root of IL-17-producing cells. *Nature Reviews. Immunology*, 6(4), 329–33. doi:10.1038/nri1807
- Durant, L., Watford, W. T., Ramos, H. L., Laurence, A., Vahedi, G., Wei, L., ... O'Shea, J. J. (2010). Diverse targets of the transcription factor STAT3 contribute to T cell pathogenicity and homeostasis. *Immunity*, 32(5), 605–15. doi:10.1016/j.immuni.2010.05.003
- Fowler, K. D., Kuchroo, V. K., & Chakraborty, A. K. (2012). A model for how signal duration can determine distinct outcomes of gene transcription programs. *PLoS ONE*, 7(3). doi:10.1371/journal.pone.0033018
- Frank, D. A., Mahajan, S., & Ritz, J. (1999). Fludarabine-induced immunosuppression is associated with inhibition of STAT1 signaling. *Nature Medicine*, 5(4), 444–7. doi:10.1038/7445
- Glocker, E.-O., Hennigs, A., Nabavi, M., Schäffer, A. A., Woellner, C., Salzer, U., ... Grimbacher, B. (2009). A homozygous CARD9 mutation in a family with susceptibility to fungal infections. *The New England Journal of Medicine*, 361(18), 1727–35. doi:10.1056/NEJMoa0810719
- Guzzo, C., Che Mat, N. F., & Gee, K. (2010). Interleukin-27 induces a STAT1/3- and NF-kappaB-dependent proinflammatory cytokine profile in human monocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(32), 24404–11. doi:10.1074/jbc.M110.112599
- Haan, S., Keller, J. F., Behrmann, I., Heinrich, P. C., & Haan, C. (2005a). Multiple reasons for an inefficient STAT1 response upon IL-6-type cytokine stimulation. *Cellular Signalling*, 17(12), 1542–50. doi:10.1016/j.cellsig.2005.03.010

- Haan, S., Keller, J. F., Behrmann, I., Heinrich, P. C., & Haan, C. (2005b). Multiple reasons for an inefficient STAT1 response upon IL-6-type cytokine stimulation. *Cellular Signalling*, *17*(12), 1542–50. doi:10.1016/j.cellsig.2005.03.010
- Habib, T., Nelson, A., & Kaushansky, K. (2003). IL-21: a novel IL-2-family lymphokine that modulates B, T, and natural killer cell responses. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *112*(6), 1033–45. doi:10.1016/j.jaci.2003.08.039
- Hernández-Santos, N., & Gaffen, S. L. (2012). Th17 Cells in Immunity to *Candida albicans*. *Cell Host & Microbe*, *11*(5), 425–435. doi:10.1016/j.chom.2012.04.008
- Hilton, D. J., Richardson, R. T., Alexander, W. S., Viney, E. M., Willson, T. A., Sprigg, N. S., ... Nicola, N. A. (1998). Twenty proteins containing a C-terminal SOCS box form five structural classes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(1), 114–9. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=18144&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Ho, H. H., & Ivashkiv, L. B. (2006). Role of STAT3 in type I interferon responses. Negative regulation of STAT1-dependent inflammatory gene activation. *The Journal of Biological Chemistry*, *281*(20), 14111–8. doi:10.1074/jbc.M511797200
- Hoffman, B. G., & Jones, S. J. M. (2009). Genome-wide identification of DNA-protein interactions using chromatin immunoprecipitation coupled with flow cell sequencing. *The Journal of Endocrinology*, *201*(1), 1–13. doi:10.1677/JOE-08-0526
- Hu, X., & Ivashkiv, L. B. (2009). Cross-regulation of Signaling Pathways by Interferon- $\gamma$ : Implications for Immune Responses and Autoimmune Diseases. *Immunity*, *31*(4), 539–550. doi:10.1016/j.immuni.2009.09.002
- Husebye, E. S., Perheentupa, J., Rautemaa, R., & Kämpe, O. (2009). Clinical manifestations and management of patients with autoimmune polyendocrine syndrome type I. *Journal of Internal Medicine*, *265*(5), 514–29. doi:10.1111/j.1365-2796.2009.02090.x
- Kao, C.-Y., Chen, Y., Thai, P., Wachi, S., Huang, F., Kim, C., ... Wu, R. (2004). IL-17 Markedly Up-Regulates  $\alpha$ -Defensin-2 Expression in Human Airway Epithelium via JAK and NF- $\kappa$ B Signaling Pathways. *The Journal of Immunology*, *173*(5), 3482–3491. doi:10.4049/jimmunol.173.5.3482
- Kisand, K., Lilic, D., Casanova, J.-L., Peterson, P., Meager, A., & Willcox, N. (2011). Mucocutaneous candidiasis and autoimmunity against cytokines in APECED and thymoma patients: clinical and pathogenetic implications. *European Journal of Immunology*, *41*(6), 1517–27. doi:10.1002/eji.201041253
- Kisand, K., & Peterson, P. (2013). Autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy and other primary immunodeficiency diseases help to resolve the nature of protective immunity against chronic mucocutaneous candidiasis. *Current Opinion in Pediatrics*, *25*(6), 715–21. doi:10.1097/MOP.0000000000000028
- Klampfer, L., Huang, J., Swaby, L.-A., & Augenlicht, L. (2004). Requirement of histone deacetylase activity for signaling by STAT1. *The Journal of Biological Chemistry*, *279*(29), 30358–68. doi:10.1074/jbc.M401359200
- Korn, T., Bettelli, E., Gao, W., Awasthi, A., Jäger, A., Strom, T. B., ... Kuchroo, V. K. (2007). IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature*, *448*(7152), 484–7. doi:10.1038/nature05970

- Kuo, M. H., & Allis, C. D. (1999). In vivo cross-linking and immunoprecipitation for studying dynamic Protein:DNA associations in a chromatin environment. *Methods (San Diego, Calif.)*, *19*(3), 425–33. doi:10.1006/meth.1999.0879
- Levy, D. E., & Darnell, J. E. (2002). Stats: transcriptional control and biological impact. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *3*(9), 651–62. doi:10.1038/nrm909
- Li, X., Leung, S., Qureshi, S., Darnell, J. E., & Stark, G. R. (1996). Formation of STAT1-STAT2 Heterodimers and Their Role in the Activation of IRF-1 Gene Transcription by Interferon-. *Journal of Biological Chemistry*, *271*(10), 5790–5794. doi:10.1074/jbc.271.10.5790
- Liao, W., Lin, J.-X., & Leonard, W. J. (2011). IL-2 family cytokines: new insights into the complex roles of IL-2 as a broad regulator of T helper cell differentiation. *Current Opinion in Immunology*, *23*(5), 598–604. doi:10.1016/j.coi.2011.08.003
- Ling, Y., Cypowyj, S., Aytakin, C., Galicchio, M., Camcioglu, Y., Nepesov, S., ... Puel, A. (2015). Inherited IL-17RC deficiency in patients with chronic mucocutaneous candidiasis. *The Journal of Experimental Medicine*. doi:10.1084/jem.20141065
- Liu, L., Okada, S., Kong, X.-F., Kreins, A. Y., Cypowyj, S., Abhyankar, A., ... Casanova, J.-L. (2011). Gain-of-function human STAT1 mutations impair IL-17 immunity and underlie chronic mucocutaneous candidiasis. *The Journal of Experimental Medicine*, *208*(8), 1635–48. doi:10.1084/jem.20110958
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔC<sub>T</sub></sup> Method, *408*, 402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262
- Luger, D., Silver, P. B., Tang, J., Cua, D., Chen, Z., Iwakura, Y., ... Caspi, R. R. (2008). Either a Th17 or a Th1 effector response can drive autoimmunity: conditions of disease induction affect dominant effector category. *The Journal of Experimental Medicine*, *205*(4), 799–810. doi:10.1084/jem.20071258
- MacMicking, J. D. (2012). Interferon-inducible effector mechanisms in cell-autonomous immunity. *Nature Reviews. Immunology*, *12*(5), 367–82. doi:10.1038/nri3210
- Maródi, L., Cypowyj, S., Tóth, B., Chernyshova, L., Puel, A., & Casanova, J.-L. (2012). Molecular mechanisms of mucocutaneous immunity against *Candida* and *Staphylococcus* species. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *130*(5), 1019–27. doi:10.1016/j.jaci.2012.09.011
- Mathis, D., & Benoist, C. (2009). Aire. *Annual Review of Immunology*, *27*, 287–312. doi:10.1146/annurev.immunol.25.022106.141532
- Mertens, C., Zhong, M., Krishnaraj, R., Zou, W., Chen, X., & Darnell, J. E. (2006). Dephosphorylation of phosphotyrosine on STAT1 dimers requires extensive spatial reorientation of the monomers facilitated by the N-terminal domain. *Genes & Development*, *20*(24), 3372–81. doi:10.1101/gad.1485406
- Meyer, T., Marg, A., Lemke, P., Wiesner, B., & Vinkemeier, U. (2003). DNA binding controls inactivation and nuclear accumulation of the transcription factor Stat1. *Genes & Development*, *17*(16), 1992–2005. doi:10.1101/gad.268003
- Milner, J. D., & Holland, S. M. (2013). The cup runneth over: lessons from the ever-expanding pool of primary immunodeficiency diseases. *Nature Reviews. Immunology*, *13*(9), 635–48. doi:10.1038/nri3493

- Minegishi, Y. (2009). Hyper-IgE syndrome. *Current Opinion in Immunology*, 21(5), 487–92. doi:10.1016/j.coi.2009.07.013
- Minegishi, Y., Saito, M., Nagasawa, M., Takada, H., Hara, T., Tsuchiya, S., ... Karasuyama, H. (2009). Molecular explanation for the contradiction between systemic Th17 defect and localized bacterial infection in hyper-IgE syndrome. *The Journal of Experimental Medicine*, 206(6), 1291–301. doi:10.1084/jem.20082767
- Minegishi, Y., Saito, M., Tsuchiya, S., Tsuge, I., Takada, H., Hara, T., ... Karasuyama, H. (2007). Dominant-negative mutations in the DNA-binding domain of STAT3 cause hyper-IgE syndrome. *Nature*, 448(7157), 1058–62. doi:10.1038/nature06096
- Mizoguchi, Y., Tsumura, M., Okada, S., Hirata, O., Minegishi, S., Imai, K., ... Kobayashi, M. (2014). Simple diagnosis of STAT1 gain-of-function alleles in patients with chronic mucocutaneous candidiasis. *Journal of Leukocyte Biology*, 95(4), 667–76. doi:10.1189/jlb.0513250
- Ohtani, T., Ishihara, K., Atsumi, T., Nishida, K., Kaneko, Y., Miyata, T., ... Hirano, T. (2000). Dissection of Signaling Cascades through gp130 In Vivo. *Immunity*, 12(1), 95–105. doi:10.1016/S1074-7613(00)80162-4
- Oritani, K., Kincade, P. W., Zhang, C., Tomiyama, Y., & Matsuzawa, Y. (2001). Type I interferons and limitin: a comparison of structures, receptors, and functions. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 12(4), 337–348. doi:10.1016/S1359-6101(01)00009-0
- Puel, A., Cypowj, S., Bustamante, J., Wright, J. F., Liu, L., Lim, H. K., ... Casanova, J.-L. (2011). Chronic mucocutaneous candidiasis in humans with inborn errors of interleukin-17 immunity. *Science (New York, N.Y.)*, 332(6025), 65–8. doi:10.1126/science.1200439
- Puel, A., Cypowj, S., Maródi, L., Abel, L., Picard, C., & Casanova, J.-L. (2012). Inborn errors of human IL-17 immunity underlie chronic mucocutaneous candidiasis. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 12(6), 616–22. doi:10.1097/ACI.0b013e328358cc0b
- Puel, A., Picard, C., Cypowj, S., Lilic, D., Abel, L., & Casanova, J.-L. (2010). Inborn errors of mucocutaneous immunity to *Candida albicans* in humans: a role for IL-17 cytokines? *Current Opinion in Immunology*, 22(4), 467–74. doi:10.1016/j.coi.2010.06.009
- Qin, H., Yeh, W.-I., De Sarno, P., Holdbrooks, A. T., Liu, Y., Muldowney, M. T., ... Benveniste, E. N. (2012). Signal transducer and activator of transcription-3/suppressor of cytokine signaling-3 (STAT3/SOCS3) axis in myeloid cells regulates neuroinflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(13), 5004–9. doi:10.1073/pnas.1117218109
- Qing, Y., & Stark, G. R. (2004). Alternative activation of STAT1 and STAT3 in response to interferon-gamma. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(40), 41679–85. doi:10.1074/jbc.M406413200
- Rautemaa, R., Hietanen, J., Niissalo, S., Pirinen, S., & Perheentupa, J. (2007). Oral and oesophageal squamous cell carcinoma--a complication or component of autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED, APS-I). *Oral Oncology*, 43(6), 607–13. doi:10.1016/j.oraloncology.2006.07.005
- Rautemaa, R., Richardson, M., Pfaller, M., Perheentupa, J., & Saxen, H. (2008). Reduction of fluconazole susceptibility of *Candida albicans* in APECED patients due to long-term use of ketoconazole and miconazole. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 40(11-12), 904–7. doi:10.1080/00365540802275853

- Renner, E. D., Rylaarsdam, S., Anover-Sombke, S., Rack, A. L., Reichenbach, J., Carey, J. C., ... Ochs, H. D. (2008). Novel signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) mutations, reduced T(H)17 cell numbers, and variably defective STAT3 phosphorylation in hyper-IgE syndrome. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *122*(1), 181–7. doi:10.1016/j.jaci.2008.04.037
- Riley, J. K., Takeda, K., Akira, S., & Schreiber, R. D. (1999). Interleukin-10 Receptor Signaling through the JAK-STAT Pathway: REQUIREMENT FOR TWO DISTINCT RECEPTOR-DERIVED SIGNALS FOR ANTI-INFLAMMATORY ACTION. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(23), 16513–16521. doi:10.1074/jbc.274.23.16513
- Rutz, S., Eidenschenk, C., & Ouyang, W. (2013). IL-22, not simply a Th17 cytokine. *Immunological Reviews*, *252*(1), 116–32. doi:10.1111/imr.12027
- Saha, B., Jyothi Prasanna, S., Chandrasekar, B., & Nandi, D. (2010). Gene modulation and immunoregulatory roles of interferon gamma. *Cytokine*, *50*(1), 1–14. doi:10.1016/j.cyto.2009.11.021
- Schindler, C., & Plumlee, C. (2008). Interferons pen the JAK-STAT pathway. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *19*(4), 311–8. doi:10.1016/j.semcd.2008.08.010
- Smekens, S. P., Plantinga, T. S., van de Veerdonk, F. L., Heinhuis, B., Hoischen, A., Joosten, L. a B., ... Netea, M. G. (2011). STAT1 hyperphosphorylation and defective IL12R/IL23R signaling underlie defective immunity in autosomal dominant chronic mucocutaneous candidiasis. *PLoS One*, *6*(12), e29248. doi:10.1371/journal.pone.0029248
- Staab, J., Herrmann-lingen, C., & Meyer, T. (2013). A rapid conformational rearrangement of STAT1 dimers is required for termination rather than for amplification of interferon- $\gamma$  signaling. (March), 1–13.
- Stark, G. R., & Darnell, J. E. (2012). The JAK-STAT pathway at twenty. *Immunity*, *36*(4), 503–14. doi:10.1016/j.immuni.2012.03.013
- Stumhofer, J. S., Silver, J. S., Laurence, A., Porrett, P. M., Harris, T. H., Turka, L. A., ... Hunter, C. A. (2007). Interleukins 27 and 6 induce STAT3-mediated T cell production of interleukin 10. *Nature Immunology*, *8*(12), 1363–71. doi:10.1038/ni1537
- Takezaki, S., Yamada, M., Kato, M., Park, M.-J., Maruyama, K., Yamazaki, Y., ... Ariga, T. (2012). Chronic mucocutaneous candidiasis caused by a gain-of-function mutation in the STAT1 DNA-binding domain. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *189*(3), 1521–6. doi:10.4049/jimmunol.1200926
- Tsumura, M., Okada, S., Sakai, H., Yasunaga, S., Ohtsubo, M., Murata, T., ... Kobayashi, M. (2012). Dominant-negative STAT1 SH2 domain mutations in unrelated patients with Mendelian susceptibility to mycobacterial disease. *Human Mutation*, *33*(9), 1377–87. doi:10.1002/humu.22113
- Villarino, A. V., Gallo, E., & Abbas, A. K. (2010). STAT1-activating cytokines limit Th17 responses through both T-bet-dependent and -independent mechanisms. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *185*(11), 6461–71. doi:10.4049/jimmunol.1001343
- Xie, M. H., Aggarwal, S., Ho, W. H., Foster, J., Zhang, Z., Stinson, J., ... Gurney, A. L. (2000). Interleukin (IL)-22, a novel human cytokine that signals through the interferon receptor-related proteins CRF2-4 and IL-22R. *The Journal of Biological Chemistry*, *275*(40), 31335–9. doi:10.1074/jbc.M005304200

- Yang, X. O., Panopoulos, A. D., Nurieva, R., Chang, S. H., Wang, D., Watowich, S. S., & Dong, C. (2007). STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(13), 9358–63. doi:10.1074/jbc.C600321200
- Zakharova, N., Lymar, E. S., Yang, E., Malik, S., Zhang, J. J., Roeder, R. G., & Darnell, J. E. (2003). Distinct transcriptional activation functions of STAT1alpha and STAT1beta on DNA and chromatin templates. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(44), 43067–73. doi:10.1074/jbc.M308166200
- Zammarchi, F., de Stanchina, E., Bournazou, E., Supakorndej, T., Martires, K., Riedel, E., ... Cartegni, L. (2011). Antitumorigenic potential of STAT3 alternative splicing modulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(43), 17779–84. doi:10.1073/pnas.1108482108
- Zeng, P.-Y., Vakoc, C. R., Chen, Z.-C., Blobel, G. A., & Berger, S. L. (2006). In vivo dual cross-linking for identification of indirect DNA-associated proteins by chromatin immunoprecipitation. *BioTechniques*, 41(6), 694, 696, 698. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17191611>
- Zhong, M., Henriksen, M. A., Takeuchi, K., Schaefer, O., Liu, B., ten Hoeve, J., ... Darnell, J. E. (2005). Implications of an antiparallel dimeric structure of nonphosphorylated STAT1 for the activation-inactivation cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(11), 3966–71. doi:10.1073/pnas.0501063102

## Kasutatud veebiaadressid

- <sup>1</sup> [http://jaspar.genereg.net/cgi-bin/jaspar\\_db.pl?ID=MA0137.1&rm=present&collection=CORE](http://jaspar.genereg.net/cgi-bin/jaspar_db.pl?ID=MA0137.1&rm=present&collection=CORE)  
[http://jaspar.genereg.net/cgi-bin/jaspar\\_db.pl?ID=MA0137.2&rm=present&collection=CORE](http://jaspar.genereg.net/cgi-bin/jaspar_db.pl?ID=MA0137.2&rm=present&collection=CORE)  
[http://jaspar.genereg.net/cgi-bin/jaspar\\_db.pl?ID=MA0137.3&rm=present&collection=CORE](http://jaspar.genereg.net/cgi-bin/jaspar_db.pl?ID=MA0137.3&rm=present&collection=CORE)
- <sup>2</sup> [http://jaspar.genereg.net/cgi-bin/jaspar\\_db.pl?ID=MA0144.2&rm=present&collection=CORE](http://jaspar.genereg.net/cgi-bin/jaspar_db.pl?ID=MA0144.2&rm=present&collection=CORE)
- <sup>3</sup> <http://www.hpc.ut.ee/>
- <sup>4</sup> <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
- <sup>5</sup> [http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim\\_galore/](http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/)
- <sup>6</sup> <http://www.nature.com/nmeth/journal/v9/n4/full/nmeth.1923.html>
- <sup>7</sup> <http://www.htslib.org/>
- <sup>8</sup> <http://broadinstitute.github.io/picard>
- <sup>9</sup> <https://github.com/taoliu/MACS/>
- <sup>10</sup> <http://hgdownload.cse.ucsc.edu/goldenPath/hg19/encodeDCC/wgEncodeMapability/wgEncodeDacMapabilityConsensusExcludable.bed.gz>
- <sup>11</sup> <https://github.com/taoliu/MACS/wiki/Call-differential-binding-events>
- <sup>12</sup> <http://bioinformatics.oxfordjournals.org/content/early/2015/03/11/bioinformatics.btv145.abstract>
- <sup>13</sup> <http://www.biomedcentral.com/1471-2105/11/237>
- <sup>14</sup> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20436461>
- <sup>15</sup> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21486936>
- <sup>16</sup> <http://www.nature.com/nbt/journal/v29/n1/abs/nbt.1754.html>
- <sup>17</sup> <http://www.r-project.org/>
- <sup>18</sup> <http://www.statisticshowto.com/t-score-formula/>
- <sup>19</sup> <http://genetics.bwh.harvard.edu/cgi-bin/pph2/dbsearch.cgi>

## LISAD

### Lisa 1. Patsiendi kirjeldus

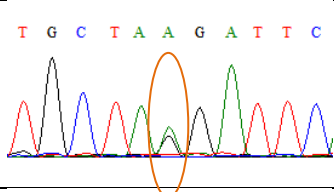
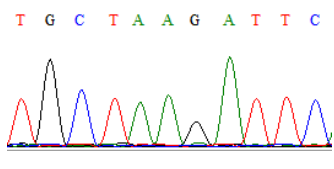
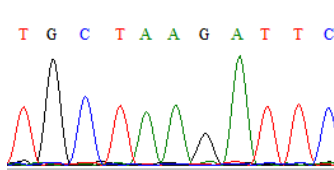
#### Patsiendi haiguslugu

10-aastane tüdruk. 3. elukuust suusoor, 5. elukuust raskelt ravile alluv seendermatiit mähkmepiirkonnas. Mikrobioloogilistest külvidest kasvas korduvalt välja *Candida albicans*. Kaasuvalt aneemia (Hgb 90 – 100 mg/l), kaalu-ja kasvupeetus (1 aastaselt 8,5 kg, pikkus 72 cm, pü 44,5 cm), motoorses arengus mahajäämus. Vajab pidevat ravi Fluconazoliga. 5-aastasena laienes *Candida albicans*-i põhjustatud lööve ka näole, juuste alla ja vasakule põidlale. 6-aastasena tekkis resistentsus Fluconazolile, alustatud ravi Voriconazoliga.



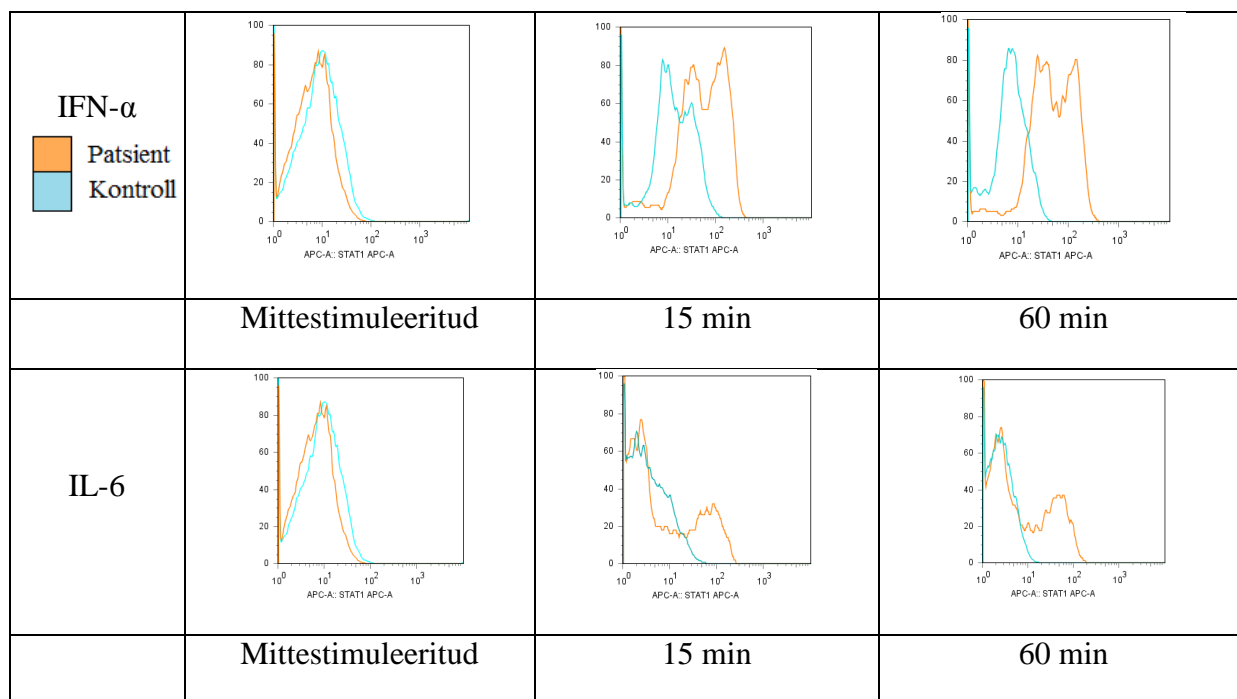
#### Patsiendi mutatsiooni info ning Sangeri sekveneerimise pilt

Patsiendi proovist Sangeri sekveneerimine viidi läbi Eesti Biokeskuse tuumiklaboris. Antud mutatsiooni mõju kalkuleeriti programmiga PolyPhen2<sup>19</sup>. Antud mutatsioon on ilmselt kahjustava mõjuga (*probably damaging*).

Patsient		Positsioon	Chr2: 191851632
		Ref/Allele	A/G
Ema		Geen	STAT1
		Muutus	Met390Thr
Isa		HDivPred	probably damaging

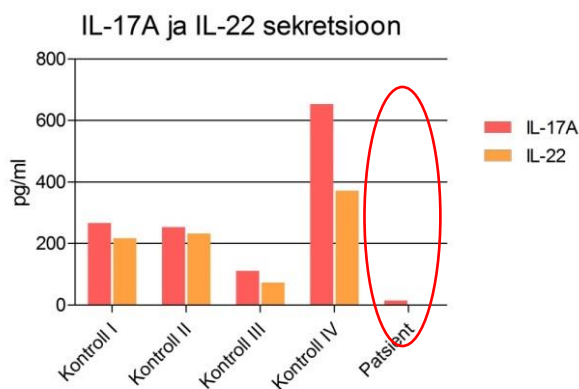
## Mutatsiooni patogeensuse tõestamine

Katse viidi läbi arstiteaduskonna bio- ja siirdemeditiini instituudi molekulaarpatoloogia laboris. Patsiendi ja kontrollisiku vererakke stimuleeriti IFN- $\alpha$  või IL-6 abil 15 minutit ja 60 minutit. p-STAT1-e induksiooni määrati voolutsütomeetriselt. STAT1-e hüperfosforüleerimine on *STAT1* GOF mutatsioonile diagnostiline. Patsiendil võrreldes kontrollisikuga on märgata aktiveeritud p-STAT1 taseme püsima jäämist, mis normaaljuhul peaks taanduma ühe tunni möödudes.



## IL-17A ja IL-22 sekretsiooni puudulikkus

Katse viidi läbi arstiteaduskonna bio- ja siirdemeditiini instituudi molekulaarpatoloogia laboris. PBMCd stimuleeriti PMA ja ionomüsiiniga 72 tundi. Supernatandist määrati IL-17A ja IL-22 ELISA kittidega. Patsiendi rakkudes võrreldes kontrollisikuga esineb IL-17A ning IL-22 sekretsiooni puudulikkus (punane ring).



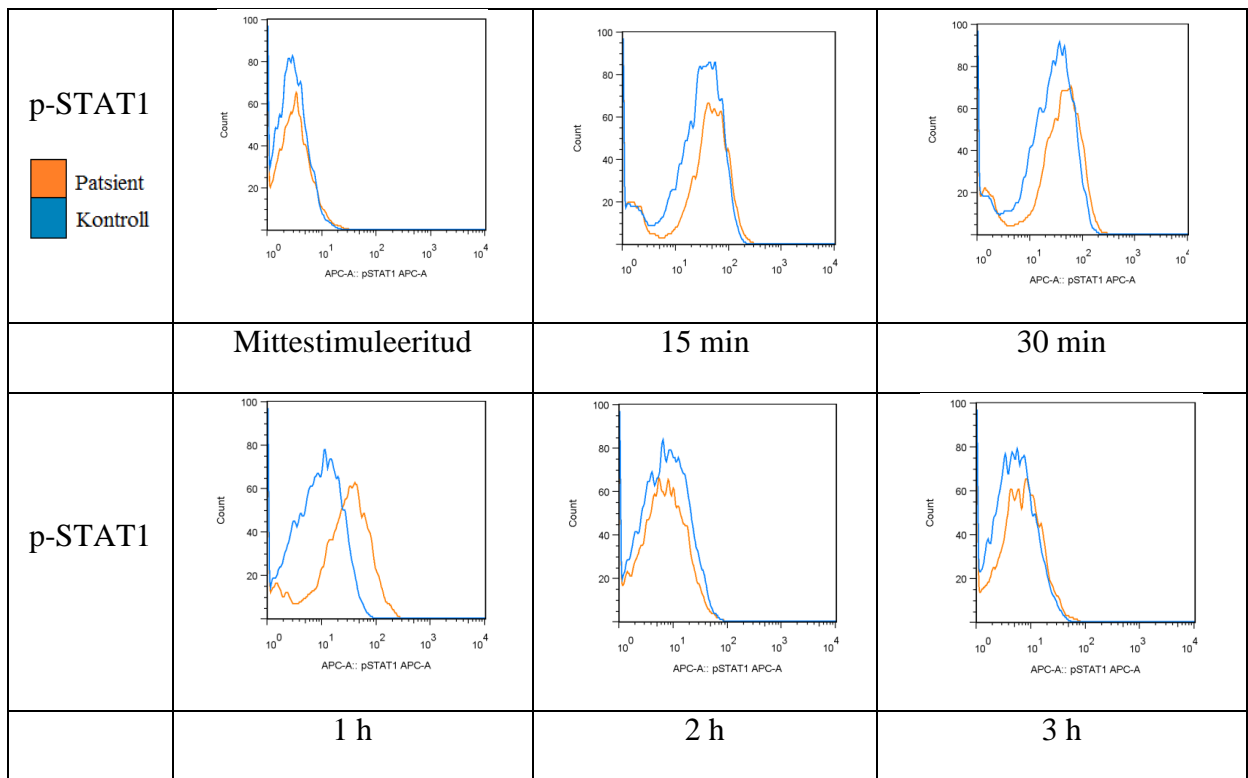
## Lisa 2. Kromatiini fragmentide pikkuse kontrollimine

Rakud fikseeriti (kirjeldatud punktis 2.2.7.1), lüüsi ning kromatiin sheeriti (kirjeldatud punktis 2.2.7.3). Lüüsitud DNA sheeriti umbes 300 bp pikkusteks fragmentideks Bioruptor UCD-200 sonikaatoriga (Diagenode). Sonikeerimine leidis aset 15 ml tuubides, mis asetati eelnevalt jääga külmutatud veevanni ning sonikeeriti 10 min (30 sekundiliste *On* ja *OFF*) tsüklitena kõrgeima võimsuse juures (*High*, 200 W). Sonikeerimist sooritati kokku 30 min, 40 min, 50 min ning 60 min. Iga 10 minuti tagant lisati jääd jahutamiseks veele ning proove tsentrifugeeriti lühidalt 1 min 300 x g (5810 R, Eppendorf). Seejärel eemaldati jää, proovid asetati vette ning alustati uue tsükliga. Proovide ristsidemed lõhuti ehk inkubeeriti 4 h 65 °C juures. Proove töödeldi Rnaasiga (Rnase Coctail Enzyme Mix, Ambion, Life Technologies) termomikseril (Thermomixer comfort, Eppendorf) 1 h 37 °C ja 700 rpm juures, lõppkontsentratsioon oli 0,2 mg/ml. Seejärel töödeldi proove proteinaas K-ga (Thermo Scientific) termomikseril 1 h 55 °C ja 700 rpm juures, lõppkontsentratsioon oli 0,4 mg/ml. Proovid puhastati DNA puhastamise komplektiga *MinElute<sup>®</sup> PCR Purification Kit* (Qiagen) vastavalt tootja protokollile.

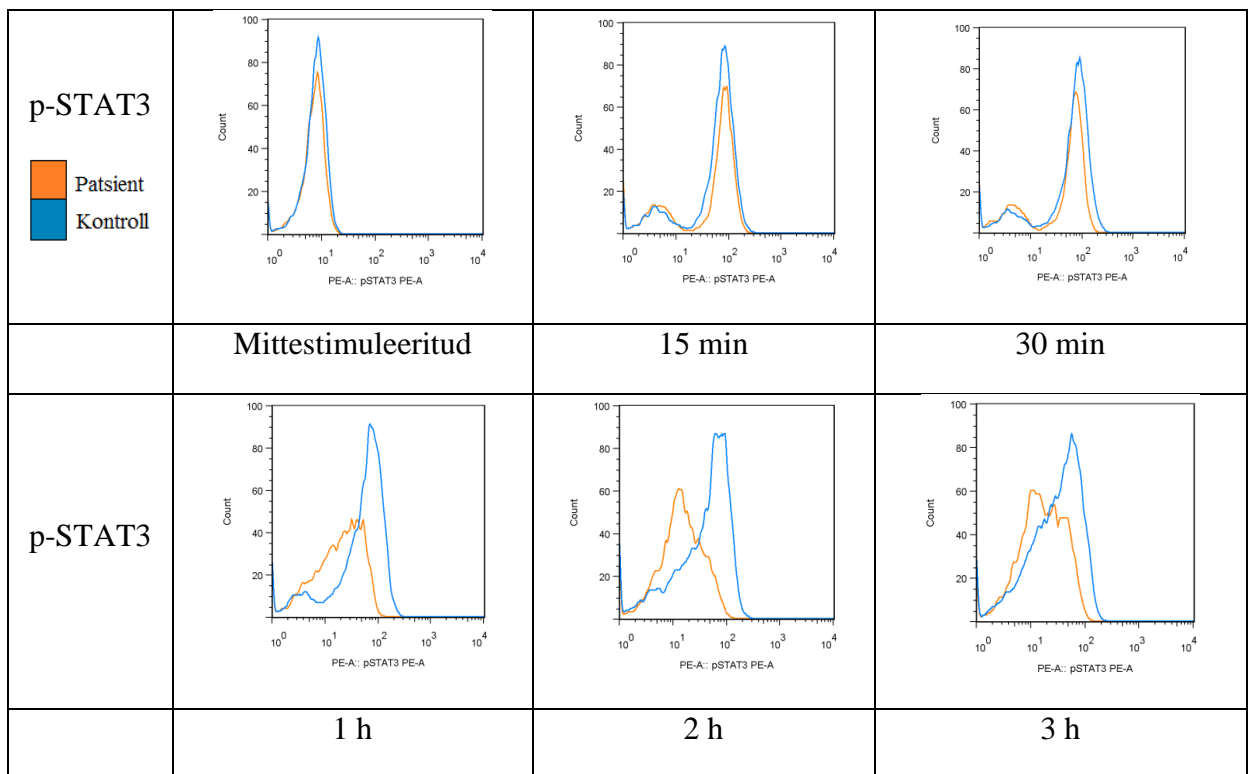
Fragmentide pikkuse kontrollimiseks sooritati geelelektroforees horisontaalse agaros-geelelektroforeesi aparaadiga (Bio-Rad Laboratories). Selleks võeti 5 µl proovi ning segati 2 µl *6X DNA Loading Dye*-ga (Fermentas). Geelile lisati etiidumbromiidi (lõppkontsentratsiooniga 0,01 µg/ml) (Smart Mix, Naxo). 7 µl proovide segud ning 3 µl marker *GeneRuler 100 bp DNA ladder* (Fermentas) pipeteeriti 1% TAE-agarosgeelile. Proove jooksutati 30 min 150 V pinge all. Geel pildistati UVIdoc geelipildistamisaparaadiga (UVItec Limited). Saadud geelipildi põhjal valiti ChIP katse sheerimise ajaks 40 min.

## Lisa 3. STAT1 ja STAT3 aktivatsiooni dünaamika IL-21-ga stimuleeritud T-rakkudes

Rakke stimuleeriti tsütokiiniga IL-21 ning uuriti nende toimet STAT1 ja STAT3 aktivatsioonile patsiendis ning kontrollisikutes. Kontrollisikus on STAT1 valgu p-STAT1 signaali maksimum 15 minutit pärast stimulatsiooni algust ning 1 h möödudes madalam. Patsiendi rakkudes aga püsib p-STAT1 signaal kõrgem veel ka 1 h möödudes.



STAT3 fosforüleeritud vorm on samuti oma maksimumis juba 15 minutit pärast stimulatsiooni algust, kuid defosforüleerimine on aeglasem, püsides veel 3 tundi pärast stimulatsiooni algust. Patsiendil on p-STAT3 signaal madalam.



## LIHTLISENTS

### Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina Epp Kaleviste

(sünnikuupäev: 15.04.1990)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose  
**STAT1 geeni uudifunktsiooniga mutatsiooni mõju JAK-STAT signaalirajale**

mille juhendaja on Kai Kisand, PhD ja Lili Milani, PhD,

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

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **01.06.2017** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

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

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

Tartus, 26.05.2015