

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

I ja II tüüpi interferoonide roll süsteemse erütematoosse luupuse patogeneesis

Bakalaureusetöö
12 EAP
Marcella Laura Polverino

Juhendajad MSc Liis Haljasmägi
PhD Kai Kisand
PhD Tõnis Org

TARTU 2024

I ja II tüüpi interferoonide roll süsteemse erütematoosse luupuse patogeneesis

I ja II tüüpi interferoonid (IFN) osalevad süsteemse erütematoosse luupuse (SLE) patogeneesis ning kõrvalekalded nendes radades võivad panustada erinevate kliiniliste sümptomite tekkeks. Antud töö eesmärgiks oli võrrelda I ja II tüüpi IFN skooride SLE patsientide ja tervete kontrollide vahel ning IFN skooride seoseid IFN- α , IFN- β ja IFN- γ kontsentratsioonidega vereseerumis, kliiniliste sümptomitega ja haiguse aktiivsusega. Uuritavate geenide ekspressiooni leidmiseks kasutati reaalaaja kvantitatiivset PCR-i meetodit (qPCR) ning uuriti 16 IFN raja alla kuuluvat geeni. Töö raames analüüsiti kokku 121 patsiendi ja 43 kontrollisiku proove ning leiti, et SLE patsientide I tüüpi IFN skoorid on oluliselt kõrgemad tervete kontrollide skooridest. I ja II tüüpi IFN skoorid korreleerusid vastavalt IFN- α ja IFN- γ kontsentratsioonidega. Toetudes käesoleva töö tulemustele, võivad I ja II tüüpi IFN skoorid peegeldada haiguse aktiivsust, kuid nende raja alla kuuluvate geenide mõju kliinilistele sümptomitele vajab täiendavat uurimist.

Märksõnad: I tüüpi interferoonid, II tüüpi interferoonid, SLE

CERCS: B500 Immunoloogia, seroloogia, transplantoloogia

The role of type I and II interferons in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus

The role of type I and II interferons (IFN) has been described in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus (SLE) and impairments in these pathways can be involved in the development of various clinical symptoms. The aim of this work was to compare type I and II IFN scores between SLE patients and healthy controls and to correlate IFN scores with IFN- α , IFN- β and IFN- γ concentrations in the serum, clinical symptoms and disease activity. The quantitative real-time PCR (qPCR) method was used to analyze the expression of 16 IFN-stimulated genes. A total of 124 patients' and 43 controls' samples were studied, and we found that type I IFN scores of SLE patients are significantly higher compared with healthy controls. Also, type I and II IFN scores correlated with IFN- α and IFN- γ concentrations, respectively. Based on the results of the present work, type I and II IFN scores may reflect disease activity, but the impact of these interferon-stimulated genes on clinical symptoms needs further investigation.

Key words: Type I interferons, type II interferons, SLE

CERCS: B500 Immunology, serology, transplantation

SISUKORD

SISSEJUHATUS	7
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	8
1.1. Interferoonid	8
1.2. Interferoonide jaotus	9
1.2.1. I tüüpi interferoonid.....	10
1.2.2. II tüüpi interferoonid	11
1.2.3. III tüüpi interferoonid	11
1.3. Interferoonide indutseeritud geenid	13
1.3.1. <i>MX1</i> ja <i>MX2</i>	13
1.3.2. PKR ja OAS/RNaas L süsteem	14
1.3.3. <i>IFIT</i> , <i>IFITM</i> ja <i>ISG15</i>	14
1.3.4. <i>RSAD2</i> ja <i>IFI44L</i>	15
1.3.5. <i>CIITA</i> ja <i>CXCL10</i>	15
1.3.6. ISG skooride kasutamine.....	16
1.4. Interferoonide roll autoimmuunhaiguste patogeneesis	17
1.5. Süsteemne erütematoosne luupus	17
1.5.1. SLE sümptomid ja ravi	18
1.5.2. I ja II tüüpi interferoonid SLE patogeneesis.....	20
2. EKSPERIMENTAALOSA	21
2.1. Töö eesmärgid	21
2.2. Materjal ja meetodika	21
2.2.1. Uuritud materjal.....	21
2.2.2. RNA isoleerimine täisverest.....	23
2.2.2.1. Stabiliseeritud vere töötlemine enne puhastamist.....	23
2.2.2.2. RNA puhastustsükli läbiviimine.....	23

2.2.3.	cDNA süntees	24
2.2.4.	Uuritavad geenid ja kasutatud praimerid.....	25
2.2.5.	cDNA amplifitseerimine qPCR-i meetodiga.....	26
2.2.6.	Andmete statistiline analüüs.....	27
2.3.	Tulemused	28
2.3.1.	I tüüpi IFN skoor on kõrgem patsientide grupis.....	28
2.3.2.	I ja II tüüpi IFN skooride seos IFN- α , IFN- β , IFN- γ kontsentratsioonidega vereseerumis	29
2.3.3.	I ja II tüüpi IFN skooride võrdlus kliiniliste sümptomitega	32
2.3.4.	I ja II tüüpi IFN skoori võrdlus kõrge ja madala SLEDAI väärtustega patsientide gruppide vahel	35
2.4.	Arutelu	37
2.4.1.	Interferoon-stimuleeritud geenide ekspressioon.....	37
2.4.2.	Interferoonide skooride seos kliiniliste sümptomitega	38
2.4.3.	Uurimuse piirangud ja edasised uurimissuunad	40
	KOKKUVÕTE	42
	SUMMARY	43
	TÄNUSÕNAD	45
	KIRJANDUSE LOETELU	46
	KASUTATUD VEEBIAADRESSID.....	62
	LISAD.....	63
	Lisa 1.....	63
	Lisa 2.....	63
	Lisa 3.....	64
	Lisa 4.....	65
	Lisa 5.....	66

Lisa 6.....	67
Lisa 7.....	68
Lisa 8.....	69
Lisa 9.....	70
Lisa 10.....	71
Lisa 11.....	72
Lisa 12.....	73
Lisa 13.....	74
Lisa 14.....	75
Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks.....	76

KASUTATUD LÜHENDID

cDNA	Komplementaarne DNA (<i>complementary DNA</i>)
DC	Dendriitrakud (<i>dendritic cells</i>)
dsDNA	Kaheaheelaline DNA (<i>double stranded DNA</i>)
dsRNA	Kaheaheelaline RNA (<i>double stranded RNA</i>)
GAS	Gamma aktiveeritud järjestused (<i>gamma activated sequences</i>)
IFN	Interferoon (<i>interferon</i>)
IFNAR	I tüüpi interferoonide retseptor (<i>type I interferon receptor</i>)
IFN- γ R	Interferoon gamma retseptor (<i>interferon gamma receptor</i>)
IFNLR1/IL10R β	Interferoon lambda retseptor (<i>interferon lambda receptor</i>)
ISGF3	Interferooni stimuleeritud geeni faktor 3 (<i>interferon stimulated gene factor 3</i>)
IRF1	Interferooni regulatoorne faktor 1 (<i>interferon regulatory factor 1</i>)
IRF9	Interferooni regulatoorne faktor 9 (<i>interferon regulatory factor 9</i>)
ISG	Interferooni stimuleeritud geenid (<i>interferon stimulated genes</i>)
ISRE	Interferooni stimuleeritud vastuse element (<i>interferon stimulated response element</i>)
JAK	Janus kinaas (<i>Janus kinase</i>)
mRNA	Messenger RNA (<i>messenger RNA</i>)
NETs	Neutrofiilide rakuvälised lõksud (<i>neutrophil extracellular traps</i>)
NK	Naturaalsed tapjarakud (<i>natural killer cells</i>)

NLR	Nukleotiidide oligomerisatsioonidomeeni sarnased retseptorid (<i>nucleotide binding oligomerization domain like receptor</i>)
OAS/RNaas L	2',5'-oligoadenülaadi süntetaas/RNaasL (<i>2',5'-oligoadenylate synthetase RNase L</i>)
pDC	Plasmatsütoidsed dendriittrakud (<i>plasmacytoid dendritic cells</i>)
PKR	Proteiinkinaas R (<i>protein kinase R</i>)
PRR	Mustrituvastusretseptorid (<i>pattern recognition receptors</i>)
RA	Reumatoidartriit (<i>rheumatoid arthritis</i>)
RIG-I	Retioniinhappe indutseeriv geen I (<i>retionic acid induced gene I</i>)
RNA	Ribonukleiinhape (<i>ribonucleic acid</i>)
SjS	Sjögreni sündroom (<i>sjogren's syndrome</i>)
SLE	Süsteemne erütematoosne luupus (<i>systemic lupus erythematosus</i>)
SLEDAI	SLE haiguse aktiivsust kirjeldav indeks (<i>Systemic Erythematosis Disease Activity Index</i>)
STAT	Signaali muundur ja transkriptsiooni aktivaatorvalk (<i>signal transducer and activator transcription protein</i>)
TLR	Tolli-sarnane retseptor (<i>toll-like receptor</i>)
TYK2	Türosiini kinaas II (<i>tyrosine kinase II</i>)

SISSEJUHATUS

Tsütokiinide perekonda kuuluvate I ja II tüüpi interferoonide keskset rolli on kirjeldatud mitmete autoimmuunhaiguste, nagu reumatoidartriidi (RA), Sjögreni sündroomi (SjS), süsteemse skleroosi ja süsteemse erütematoosse luupuse patogeneesis. SLE on heterogeenne autoimmuunhaigus, mida iseloomustab väga varieeruv kliiniline pilt. SLE patsientidel on suurenenud IFN-ide produktsioon ja kontsentratsioon nii geeniekspressiooni kui vereseerumi tasemel, mille tekkepõhjuseid on erinevaid. Interferooni stimuleeritud geenide (ISG) ülemäärane ekspressioon võib viia kliiniliste sümptomite süvenemiseni ja erinevate organite intensiivsema haaratuseni.

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli uurida I ja II tüüpi interferoonide stimuleeritud geenide ekspressiooni SLE patsientide täisverest ja võrrelda seeläbi I ja II tüüpi interferoonide skooore patsientidel ja kontrollidel. Lisaks võrreldi I ja II tüüpi IFN skooore IFN- α , IFN- β ja IFN- γ kontsentratsiooniga vereseerumis. Samuti oli eesmärgiks välja selgitada, kumb IFN skoor mõjutab rohkem kliiniliste sümptomite teket ning SLE haiguse aktiivsust.

Käesolev bakalaureusetöö on kirjutatud Tartu Ülikooli geenitehnoloogia õppekava raames. Uurimistöö katsed viidi läbi Tartu Ülikooli meditsiiniteaduste valdkonnas Bio- ja siirdemeditsiini instituudis molekulaarpatoloogia uurimisgrupis. Antud töö valmis koostöös Ida-Tallinna Keskhaigla reumatoloogiakeskusega, kust saadi SLE patsientide ja kontrollgrupi täisvered ja kliinilised andmed. IFN- α kontsentratsiooni määramine seerumist teostati koostöös Pasteuri Instituudiga, IFN- β ja IFN- γ seerumi kontsentratsioonide määramine teostati antud teenust pakkuvate ettevõtete poolt.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Interferoonid

Inimese immuunsüsteemi moodustab keeruline võrgustik, mis jaguneb kaheks - kaasasündinud ehk loomulik ja omandatud ehk adaptiivne immuunsus (Uibo *et al.*, 2015). Immuunsüsteem kaitseb organismi patogeenide eest ning kokkupuutel infektsioonitekitajaga hakatakse ekspresseerima interferoone, mis omavad võtmerolli patogeenide vastu kaasasündinud immuunsuses (Tough, 2004). Interferoone toodavad sellised kaasasündinud immuunrakud nagu makrofaagid, leukotsüüdid, fibroblastid, lümfotsüüdid, dendriitrakud, osteoblastid ning endoteelirakud, mis kokkupuutel patogeeniga käivitavad immuunreaktsiooni ning seeläbi takistavad organismis viiruse edasist levimist (Uibo *et al.*, 2015).

Interferoonid on valgud, mis kuuluvad tsütokiinide perekonda. Neil on oluline roll viirusevastastes mehhanismides ning lahutamatu osa immuunvastuste reguleerimisel (Kline & Kitagaki, 2006). Interferoonid tunnevad ära ja seonduvad spetsiifilistele rakkudel olevatele retseptoritele, mis tekitavad edasisi biokeemilisi reaktsioone, mille eesmärgiks on jõuda viirusevastaste ning immuunsust moduleerivate geenide ekspressioonini (Taylor, 2014).

Interferoonidel on võime piirata viiruse replikatsiooni, seega on neil oluline roll infektsioonist põhjustatud kahjustuste minimeerimisel ning immunopatogeensete mehhanismide summutamisel (Lee & Ashkar, 2018). Interferoone indutseerivad lisaks viirustele ka näiteks dsRNA, sünteetiline dsRNA ning ka osad bakteriliigid, endotoksiinid ja ka mõningad teised tsütokiinid (Taylor, 2014). IFN-ide kasulikkust hinnatakse erinevate haiguste vastases ravis, nagu polüskleroos, melanoom B, C hepatiit ja samuti mõningad vähkhaigused, mille vastu kasutatakse IFN teraapiat (Schneider *et al.*, 2014).

1.2. Interferoonide jaotus

IFN-ide jaotamisel lähtutakse järjestuse homoloogiast, retseptorite kasutusest, funktsionaalsusest ja bioloogilisest aktiivsusest, mille alusel on need jaotatud kolmeks tüübiks: I, II ning III tüüpi interferoonideks (vt Tabel 1) (Lazear *et al.*, 2019). I tüüpi IFN-d, IFN- α ja IFN- β , kasutavad seondumiseks sama retseptorit, mis on erinev nii IFN- γ kui ka IFN λ seondumisretseptoritest (Taylor, 2014). IFN-de erinevate tüüpide ja nende alatüüpide signaalimiste tulemused on varieeruvad nii interferooni stimuleeritud geenide profiilide, induktsioonikineetika, viirusevastases ja immunomodulaarsetes mehhanismides (Schneider *et al.*, 2014).

Tabel 1. Interferoonide alatüübid, klassid, retseptorid ning peamised tootvad rakud.

Tüüp	Klassid	Retseptorid	Peamised tootvad rakud
Tüüp I	IFN- α , IFN- β , IFN- ϵ , IFN- κ , IFN- ω , IFN- δ , IFN- ζ , IFN- τ	IFNAR1, IFNAR2 (IFN- α R1/ IFN- α R2)	Makrofaagid, plasmatsütoidsed dendriitrakud (pDC), monotsüüdid
Tüüp II	IFN- γ	IFNGR1, IFNGR2 (IFN- γ R1/ IFN- γ R2)	Makrofaagid, dendriitrakud, naturaalsed tapjarakud (NK), T-rakud
Tüüp III	IFN λ 1, IFN λ 2, IFN λ 3 ja IFN λ 4	IL-10R β ja IFN- λ R1	Epiteelirakud, makrofaagid, aju-verebarjääri endoteelirakud

1.2.1. I tüüpi interferoonid

I tüüpi interferoonid indutseerivad immuunvastust nakatunud rakkude kaudu, mille eesmärgiks on viiruse replikatsiooni mahasurumine. I tüüpi IFN-e hakatakse tootma infektsiooni varajases staadiumis (Lee & Ashkar, 2018; Sim *et al.*, 2022). I tüüpi IFN-d jagunevad kaheksasse klassi: IFN- α , IFN- β , IFN- ϵ , IFN- κ ja IFN- ω , IFN- δ , IFN- ζ ja IFN- τ (Lee & Ashkar, 2018), kus IFN- α omakorda jaguneb 13 subtüübiks (Pestka *et al.*, 2004). Igal subtüübil on erinev aminohappejärjestus, spetsiifiline aktiivsus ning viirusevastane spekter (Rubinstein, 1987). I tüüpi IFN on võimelised tootma pea kõik kehas leiduvad rakud, kuid viirusinfektsiooni ajal on peamiseks produtseerijateks plasmatsütoidsed dendriitrakud (pDC) (Uibo *et al.*, 2015). IFN- β toodavad peamiselt fibroblastid ja epiteelirakud vastuseks viirustele ja dsRNA-le (Taylor, 2014).

I tüüpi interferoonide tootmist indutseerivad viirused, bakterid või mikroobsed nukleiinhapped, kui nende molekulaarseid ligande, nagu lipopolüsahhariide (Gauthier *et al.*, 2022), tunnevad ära tsütosoolis või endosoomis paiknevad mustrituvastusretseptorid (*pattern recognition receptors*, PRR). Tulenevalt nende asukohast jaotatakse PRR-id tollilaadseteks retseptoriteks (*toll-like receptors*, TLR), retioniinhapet indutseeriva geeni I (*retionic acid inducible gene I*, RIG-I) sarnasteks retseptoriteks ning nukleotiidide oligomerisatsioonidomeeni sarnasteks retseptoriteks (*nucleotide oligomerization domain receptor*, NLR) (Barrat *et al.*, 2016).

I tüüpi interferoonid seonduvad I tüüpi interferooni heterodimeersele IFNAR retseptorile (Platanias, 2005), mis koosneb kahest transmembraansest valgust - madalama afiinsusega IFNAR1-st ning kõrge afiinsusega IFNAR2-st, mis on IFN-de peamiseks seondumiskohaks. IFNAR1 ja IFNAR2 subühikud on vajalikud I tüüpi IFN-de bioloogiliste efektide vahendamiseks (Sim *et al.*, 2022). I tüüpi IFN-ide IFNAR ekspresseerub kõikides tuumaga rakkudes ja seetõttu esineb viiruse replikatsiooni peatamist väga paljudes rakutüüpides (Wells & Coyne, 2018). Lisaks nimetatud transmembraansetele valkudele on retseptoriga seotud veel kaks tsütoplasmaatilist kinaasi - türosiini kinaas II (*Tyrosine proteiin kinase 2*, TYK2) ning Janus kinaas I (*Janus Kinase 1*, JAK1). IFN-i seondumisel retseptoriga toimub JAK1 ja TYK2 aktiveerimine, mille tulemusel fosforüleeritakse IFN retseptorid ja STAT (STAT1 ja STAT2) valgud (Steen & Gamero, 2013). Fosforüülimine põhjustab signaali muundur ja transkriptsiooni aktivaatorvalkude (*signal transducer and activator transcription protein*, STAT) dimeriseerumist (Taylor, 2014) ning translokatsiooni tuumas (Lin *et al.*, 1998), kus STAT valgud toimivad kui ISG-de ekspressiooni juhtivad transkriptsiooniaktivaatorid (Schneider *et al.*, 2014). STAT1 ja STAT2 ühinevad I tüüpi IFN-ide signaalirajas interferooni

vastuse faktor 9-ga (*interferon response factor 9*, IRF9), millega koos moodustub interferooni stimuleeritud geenifaktori 3 (*interferon stimulated gene factor 3*, ISGF3) kompleks. ISGF3 kompleks liigub rakutuuma, kus ta seondub IFN reguleeritud geenide promootorites interferooni stimuleeritud vastuse elementidega (*interferon stimulated response element*, ISRE) (Platanias, 2005), mille eesmärgiks on indutseerida ISG-de ekspressiooni (Taylor, 2014) (vt Joonis 1).

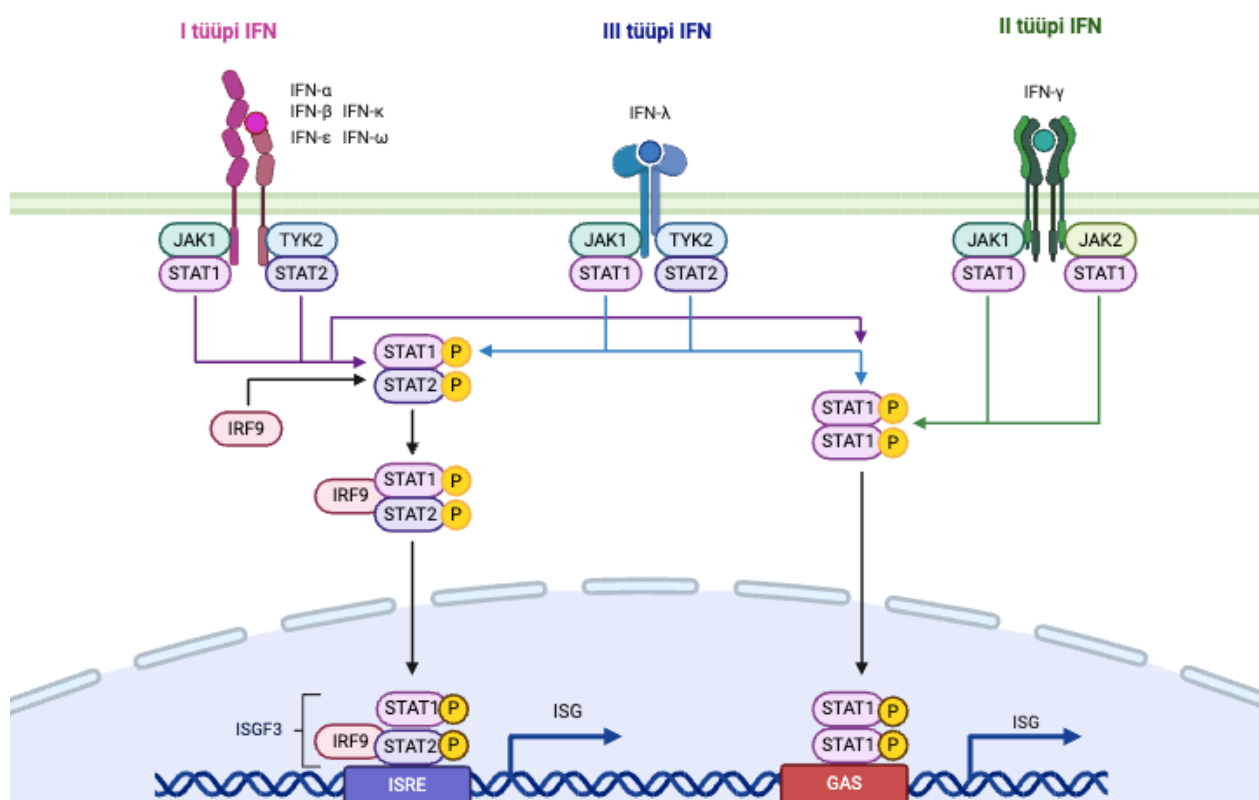
1.2.2. II tüüpi interferoonid

II tüüpi interferoonide alla kuulub IFN- γ , mida toodavad infektsiooni ajal erinevad immuunrakud nagu NK rakud, T-lümfotsüüdid, makrofaagid ja dendriitrakud. IFN- γ sekretsiooni stimuleerivad ja kontrollivad dendriitrakkude ja makrofaagide poolt toodetud IL-12 ja IL-18 tsütokiinid, I tüüpi IFN-d ja mitmed kasvufaktorid (Golub *et al.*, 2000). II tüüpi interferoonidel on sarnaselt I tüüpi IFN-idega viirusevastane toime, samas on leitud, et IFN- γ kohalolu suurendab reaktiivsete hapnikuühendite ja reaktiivsete lämmastiku vaheühendite tootmist (Schroder *et al.*, 2004) ning neil on oluline roll loomuliku ja omandatud immuunvastuse aktiveerimisel (Lee & Ashkar, 2018). IFN- γ aktiivsus reguleerib immuunsust mitmesuguste patogeenide vastu, nagu näiteks klamüüdiainfektsioonid (Rothfuchs *et al.*, 2004), tuberkuloos, listerioos ja salmonelloos (Berns *et al.*, 2022; Gordon *et al.*, 2005). Samuti on leitud, et IFN- γ aktiivsusel on ka vähirakkudele hävitav toime (Kak *et al.*, 2018). IFN- γ seondub rakumembraanil olevate homodimeersete IFN- γ R retseptoritega, misjärel aktiveeritakse JAK kinaasid 1 ja 2, mis osalevad STAT1 valkude fosforüleerimisel. STAT1 homodimeriseerub ning seondub indutseeritavatest geenidest ülesvoolu asuvate spetsiifilise DNA järjestusega, mida nimetatakse gamma aktiveeritud järjestuseks (*gamma activated sequence*, GAS) (Sanda *et al.*, 2006), mis seejärel interakteeruvad interferooni regulatoorse faktoriga 1 (*interferon regulatory factor 1*, IRF1), mille sihiks on stimuleerida II tüüpi IFN-de transkriptsioon (vt Joonis 1) (Blanco *et al.*, 2000). Nakatumata rakkudes interferoone ei ole ning seetõttu on ka geen represseritud (Taylor, 2014).

1.2.3. III tüüpi interferoonid

III tüüpi interferoonid on IFN λ 1 (IL-29), IFN λ 2 (IL-28A), IFN λ 3 (IL-28B) ja IFN λ 4. III tüüpi IFN-de signaaliülekanne on sarnane I ja II tüüpi IFN-ide omale - nad kontrollivad viiruse replikatsiooni ning lisaks erinevate epiteelirakkude, nagu aju-verebarjääri, soole- ja kopsuepiteeli ning maksa infektsioone (Manivasagam & Klein, 2021). IFN λ toodavad

peamiselt epiteelirakud, aju-verebarjääri endoteelirakud (Lazear *et al.*, 2015) ning sarnaselt I ja II tüüpi interferoonidele ka makrofaagid ning DC-d. IFN λ kasutab rakupinnaga seondumiseks I ja II tüüpi interferoonidest erinevat retseptori kompleksi, milleks on madala afiinsusega IFNLR1/IL10R β , mis ekspresseeruvad epiteelirakkudel, hepatotsüütidel ning ka osadel immuunrakkudel (vt Joonis 1) (Andreacos *et al.*, 2019). III tüüpi IFN-de retseptorkompleksi poolt vahendatud viiruste immuunvastused on spetsiifilised barjääripindadel paljunevate viiruste suhtes (Sommereyans *et al.*, 2008) ning IFN λ kasutamine arvatakse olevat otstarbekas terapeutilistel eesmärkidel - viiruste ja vähivastases ravis juhul, kui on tekkinud teiste interferoonide vastane resistentsus (Taylor, 2014). III tüüpi IFN-del on kõrgem koespetsiifilisus ning madalam tõenäosus kõrvalmõjude tekkimises, mis võivad I tüüpi IFN-dega võrreldes sagedamini esineda (Manivasagam & Klein, 2021).



Joonis 1. I, II ja III tüüpi interferoonide signaalirajad.¹ Joonisel on välja toodud I, II ja III tüüpi IFN-de signaalirajad. Infektsiooni tagajärjel indutseeritakse IFN-ide produktsioon, mis seonduvad rakumembraanil olevatele spetsiifilistele retseptoritele. IFN-de seondumise tagajärjel aktiveeruvad retseptorite tsütosoolses osas olevad JAK 1 ja 2 ning TYK2, mille aktivatsioon tagab STAT1 ja STAT2 fosforüleerimise. STAT valkude kompleks koos

¹ <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352396421004357>

transkriptsioonifaktoritega seondub spetsiifilisele promootorjärjestusele ning indutseerib ISG-de ekspressiooni.

1.3. Interferoonide indutseeritud geenid

IFN signaalimine toimub märkimisväärse kiirusega, sest vajalikud komponendid on algselt juba olemas ning uute valkude sünteesimine ei ole vajalik (Larner *et al.*, 1984, Larner *et al.*, 1986). Nakatunud raku poolt vastsünteesitud IFN molekulid seonduvad rakupinnal olevatele retseptoritele, mis käivitavad läbi rakumembraani (Schneider *et al.*, 2014) JAK-STAT raja kaudu signaalide kaskaadi (Stark & Darnell, 2012). Nii I kui ka II tüüpi interferoonid indutseerivad mitmeid tsütokiine (Taylor, 2014), mis omakorda indutseerivad mitmete ISG-de transkriptsiooni (Schoggins, 2014). IFN signaalirajas osalevad JAK2, STAT1 ja STAT2 ning IRF9 kuuluvad ISG-de hulka ning osalevad IFN vastuse töös (Schneider *et al.*, 2014).

ISG-de sihtmärgiks on patogeeni elutsükliks vajalike radade ja funktsioonide tabamine ning viirusevastaste molekulide kodeerimine (Schoggins, 2014), mis läbi on ISG-del oluline roll viiruslike, bakteriaalsete ja parasiitsete infektsioonide kontrollimises ja reguleerimises (Schneider *et al.*, 2014) (vt Joonis 2). Samaaegselt aktiveerivad ISG-d erinevaid immuunrakkude tüüpe (Liu *et al.*, 2012) ning mõned ISG-d vastutavad raku apoptoosini viimise eest (Schneider *et al.*, 2014). Paljud IFN-stimuleeritud geenidest on head IFN aktiivsuse markerid, ent nende viirusele reageerimise reguleerimist võib olla keeruline eristada (Schoggins, 2019).

Mitmed hiljutised uuringud on avastanud, et IFN-id reguleerivad ligikaudu 10% inimese geenidest (Schoggins, 2019). Seni kirjeldatud ISG-dest moduleerivad näiteks 2',5'-oligoadenülaadi süntetaas/RNaasL (2',5'-*oligoadenylate synthetase RNase L*, OAS/RNase L) ja *ADAR1* nukleiinhappe terviklikkust, *IFITM3* moduleerib viiruse sisenemist ning mõned ISG-d suunavad valkude translatsiooni. Kuna ISG-d kontrollivad viiruste replikatsiooni ja levikut, siis ISG-de puuduliku ekspressiooni korral on ka IFN vastus defektne ning inimene on seetõttu viirushaigustele palju vastuvõtlikum (Sancho-Shimizu *et al.*, 2011).

1.3.1. *MX1* ja *MX2*

Tuntumate ISG-de hulka kuulub viirusevastane müksoviiruse resistentsuse geen *MX1* (teise nimega *MXA*). *MX1* on GTPaas, mis pärsib ribonukleiinide transporti ning inhibeerib viiruste replikatsiooni (Krug *et al.*, 1985). *MX1* on indutseeritud peamiselt I ja III tüüpi IFN-ide poolt

(Verhelst *et al.*, 2012) ning eelkõige on *MX1* seotud influenza A ja B hepatiidi viirusliku DNA ja RNA inhibeerimisega ning influenza A resistentsusega (Horisberger *et al.*, 1983). Rohkelt uuritud *MX1* ISG-ga on tihedalt seotud *MX2* (teise nimega *MXB*) geen, mida indutseerivad I tüüpi IFN-id (Kane *et al.*, 2013). *MX2* pidurdab esimest tüüpi inimese immuunpuudulikkuse retroviiruse replikatsiooni (Gelinas *et al.*, 2018). Samuti on kirjeldatud *MX2* inhibeerivat funktsiooni herpesviiruste ja B-hepatiidi puhul (Wang *et al.*, 2020).

1.3.2. PKR ja OAS/RNaas L süsteem

PKR ehk dsRNA aktiveeritud proteiinkinaas osaleb kaasasündinud immuunsuses ning blokeerib viirusliku päritoluga mRNA translatsiooni (Cole, 2007), fosforüülides valgusünteesini viivaid faktoreid (Mertowska *et al.*, 2023). Samuti osaleb PKR rakkude apoptoosis ja põletikuliste protsesside regulatsioonil (Kang & Tang, 2012). OAS/RNaas L süsteem on üks varasemaid avastatud IFN signaaliradasid, kus IFN aktiivsus mõjutab rakus RNAasi aktiivsust. IFN indutseerib OAS/RNaas L signaalirajas OAS-i ekspressiooni, mis omakorda sünteesib viirusliku infektsiooni korral RNAas L aktivatsiooni ja dimerisatsiooni jaoks vajalikke oligoadenülaatide komponente, et degradeerida viirusliku päritoluga genome (Drappier & Michiels, 2015; Schoggins, 2019; Świątek *et al.*, 2014).

1.3.3. *IFIT*, *IFITM* ja *ISG15*

Teadlastele on suurt teadushuvi pakkunud *IFIT* ja *IFITM* perekonda kuuluvad I tüüpi ISG-d. *IFIT* perekonda kuuluvad ISG-d (*IFIT1*, *IFIT2*, *IFIT3* ja *IFIT5*) tunnevad ära viirusliku päritoluga RNA, millel on 2'-O metülatsioonis puudujäägid või mis sisaldavad 5'-trifosfaate, mille kaudu on neil translatsiooni inhibeeriv toime (Schoggins, 2014). *IFIT2* uuringud hiirtel on näidanud, et geenil on oluline roll neurotroopsete viiruste replikatsiooni kontrollimisel (Schoggins, 2014). *IFITM* perekonda kuuluvatel geenidel on samuti viirusevastased omadused, kuid lisaks osalevad selle perekonna geenid nakkuslike virionide tootmise ning nakkuvuse inhibeerimisel (Zhao *et al.*, 2019).

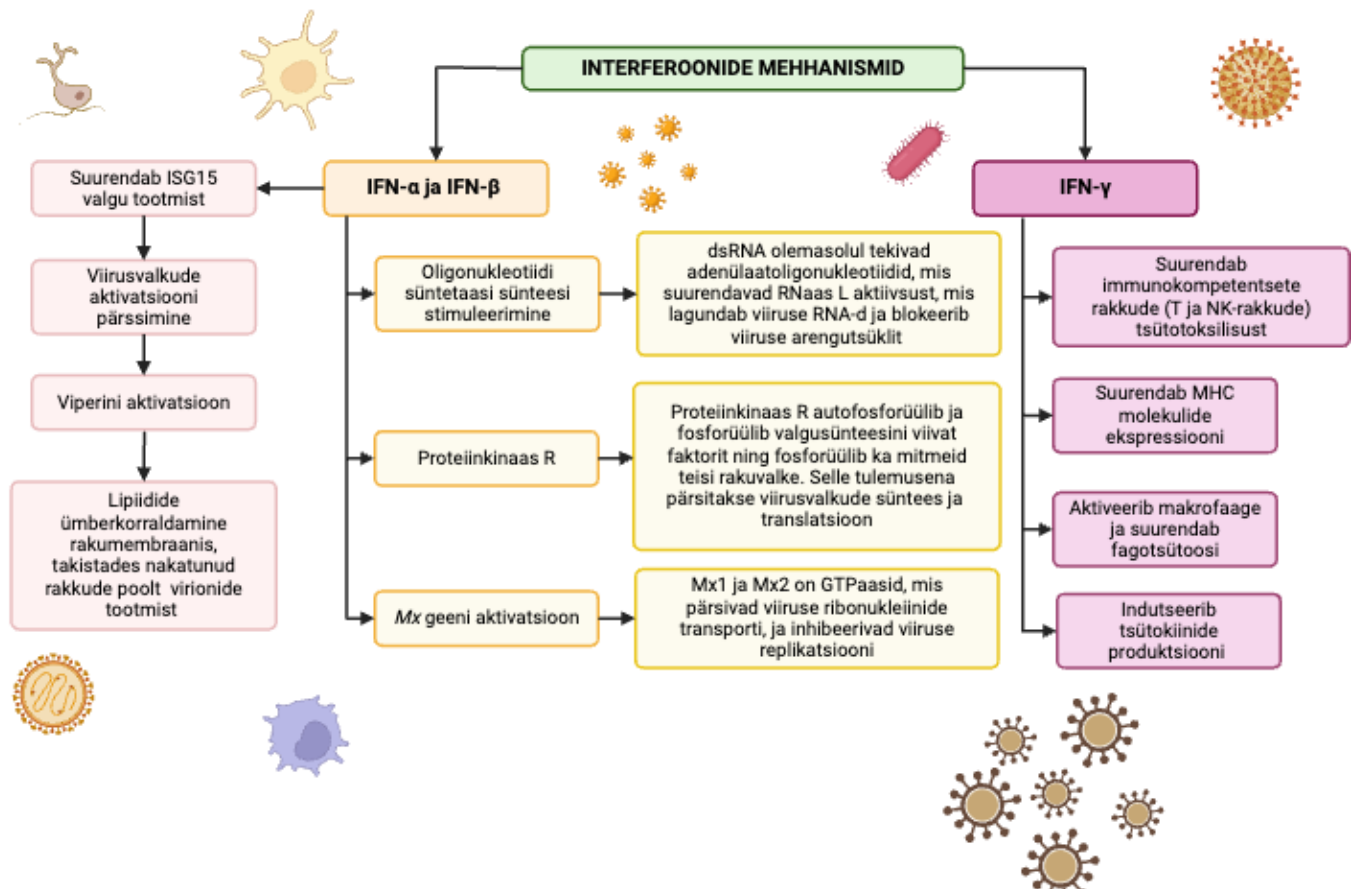
ISG15 omab I tüüpi IFN poolt indutseeritud geenides keskset rolli, olles üks kõige kiiremini indutseeritav ISG (Der *et al.*, 1998; Korant *et al.*, 1984; Perng & Lenschow, 2018). *ISG15-1* on viirusele otsene inhibeeriv mõju ning samuti on geenil immuunsust moduleeriv funktsioon (Perng & Lenschow, 2018).

1.3.4. *RSAD2* ja *IFI44L*

RSAD2 geen on I tüüpi IFN indutseeritud geen, mis kodeerib valku nimega viperin, mis osaleb inimese tsütomegaloviiruse, influenza A ja Sindbise viiruse molekulaarsete protsesside kontrollimises (Schoggins, 2014). Varasemad uuringud on leidnud, et *RSAD2-1* on oluline roll kaasasündinud immuunsuses, mis inhibeerib viiruse replikatsiooni ning mõjutab dendriitrakkude küpsemist (Jang *et al.*, 2018; Rivera-Serrano *et al.*, 2020). *RSAD2* kõrget ekspressiooni on täheldatud mõnedes immuunhaigustes, näiteks SjS ja SLE patogeneesis, kuid SLE puhul on selle geeni täpsemad funktsioonid ähmased (Zhu *et al.*, 2021). I tüüpi IFN indutseeritud geenide hulgas on huviorbiiti kerkinud ka *IFI44L*. *IFI44L* on samuti viirusevastase toimega ja omab rolli kaasasündinud immuunsuses. Hiljuti avastatud *IFI44L* interferooni indutseeritud geeni üleekspressiooni on täheldatud mitmetes autoimmuunhaigustes (Luo *et al.*, 2022).

1.3.5. *CIITA* ja *CXCL10*

CIITA ja *CXCL10* on II tüüpi IFN raja alla kuuluvad geenid. *CIITA* vahendab valkude valmimist, mis kontrollivad II klassi koesobivusantigeeni kompleksi geenide transkriptsiooni. *CIITA* geenil on oluline roll spetsialiseerunud immuunvalkude produktsioonil. Need valgud on leitavad mitmete immuunrakkude pinnalt, nagu näiteks valged vererakud. *CIITA* produtseeritud immuunvalgud osalevad aktiivselt immuunsüsteemi töös ning immuunvalkude muteerunud variandid võivad põhjustada *CIITA* valgu produktsiooni häiringuid, mis võivad viia teatud haigusteni (Chang *et al.*, 1994). *CXCL10* geen kuulub kemokiinide perekonda, mis mängib rolli raku apoptoosi indutseerimisel ning raku kasvu reguleerimisel. *CXCL10* geeni on seostatud mitmete haigustega, nagu immuunsüsteemi düsfunktsiooni, kroonilise põletiku ja kasvajate arenguga. Seetõttu võib *CXCL10* geen olla mitmesuguste haiguste indikaatoriks (Kanda *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2009; Mee *et al.*, 2007).



Joonis 2. Interferoonide mehhanismid. Joonisel on välja toodud peamised IFN- α , IFN- β ja IFN- γ funktsioonid.²

1.3.6. ISG skooride kasutamine

ISG skooride kasutatakse süsteemsete autoimmuunsete reumaatiliste haiguste IFN vahendatud geeniekspressioonide hindamiseks (El-Sherbiny *et al.*, 2018). I tüüpi IFN-de kontsentratsiooni määramine vereseerumist on olnud vähe usaldusväärne ning seetõttu mõõdetakse IFN aktiivsust või ravivastust (Pascual *et al.*, 2009) ISG-de skoori kaudu (Feng *et al.*, 2006). ISG skooride arvutamise viise on erinevaid, kuid tüüpiliselt arvutatakse skoor liites kokku uuritud geenide suhtelised ekspressioonitasemed (Rao *et al.*, 2013). ISG skoorid on potentsiaalsed biomarkerid erinevate haiguste aktiivsuse ennustamisel ja kliiniliste sümptomite esinemise puhul (Weiden *et al.*, 2023).

² <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10298684/>

1.4. Interferoonide roll autoimmuunhaiguste patogeneesis

Paljud uuringud viitavad, et kõigil kolmel IFN tüübil on erinev roll autoimmuunhaiguste arengus (Choubey & Moudgil, 2011), kuid neist enim on teada I tüüpi interferoonide rollist mitmete autoimmuunsete ja põletikuliste haiguste patogeneesis. I tüüpi IFN süsteem on mitmetes autoimmuunhaigustes düsreguleeritud (Fernandez-Ruiz & Niewold, 2022). Sellised kompleksed haigused on süsteemsed autoimmuunhaigused, nagu süsteemne hulgiskleroos, RA ja SLE (JC, 2010; Tsokos&Kammer, 2000).

Autoimmuunhaiguste korral ründab inimese immuunsüsteem tema enda terveid rakke või kudesid ning hävitatavate kudede arvu järgi jagatakse autoimmuunhaigused kaheks - haigused, kus on sihtmärgiks üks kindel organ (I tüüpi diabeet, sihtorganiks pankreas) või mitmed organid, nagu SLE puhul (Choubey & Moudgil, 2011). Peamiseks IFN düsregulatsiooni põhjustajaks on geneetiline variatsioon, samuti on IFN- α suurenenud produktsioon seotud TLR-ide ja teiste tsütosoolsete nukleiinhapete sensorite aktivatsiooniga, mis tekivad defektidest apoptoosiga seotud radades või DNA-d sisaldavate neutrofiilide rakuväliste lõksude (*neutrophil extracellular traps*, NETs) vabanemise tagajärjel (Baccala *et al.*, 2007, 2007; Blasius & Beutler, 2010; Bouts *et al.*, 2012; Crowl *et al.*, 2017; Yu & Liu, 2021). Samuti on leitud, et IFN- α kõrgem kontsentratsioon suurendab aktiveeritud T-rakkude vastust, võimendab autoantigeenide esitamist antigeene esitlevate rakkude poolt ning suurendavad autoantikehade tootmist (Baccala *et al.*, 2007; Marshak-Rothstein, 2006). Plasmatsütoidsete dendriitrakkude, mis on peamised I tüüpi IFN tootjad autoimmuunhaigustes (Reizis, 2019), akumulereerumine ja liigne I tüüpi IFN produktsioon võivad aktiveerida ka TLR-st sõltuvate ja mittesõltuvate radade kaudu endogeenseid nukleiinhappeid (Baccala *et al.*, 2007).

1.5. Süsteemne erütematoosne luupus

SLE on heterogeenne autoimmuunhaigus, mille korral inimese immuunsüsteem ründab organismi enda kudesid. Haaratud organite osalus on varieeruv - SLE võib mõjuda nii nahale, liigestele, neerudele kui ka kesknärvisüsteemile (Fischer-Betz *et al.*, 2005) ning haiguse tähelepanuta jätmise võib põhjustada püsivaid organukahjustusi (Hiraki *et al.*, 2008). Umbes 15% diagnoositutest on haigus avastatud lapsepõlves (Hiraki *et al.*, 2008) ning enamasti esineb SLE sagedamini naistel kui meestel (Petri, 2002). Soolised erinevused ja patoloogia areng võivad olla tingitud hormonaalsetest erinevustest (Elkon & Stone, 2011).

SLE patogenees on keeruline geneetilise eelsoodumuse, keskkonna, hormonaalsete ja immunoloogiliste tegurite kompleks (Tsokos *et al.*, 2016). Paljud keskkonnafaktorid on seotud SLE patogeneesiga, nagu näiteks ultraviolettkiirgus, narkootikumid, toidulisandid, suitsetamine, infektsioonid, keemilised ühendid (näiteks merkuur) ja ka füsioloogiline stress (Blomberg *et al.*, 1994; Burger *et al.*, 1997; Cooper & Parks, 2004; Crowe *et al.*, 2017; Ede *et al.*, 2009; Petri & Allbritton, 1992; Roberts *et al.*, 2017; Song *et al.*, 2018; Spelman *et al.*, 2006).

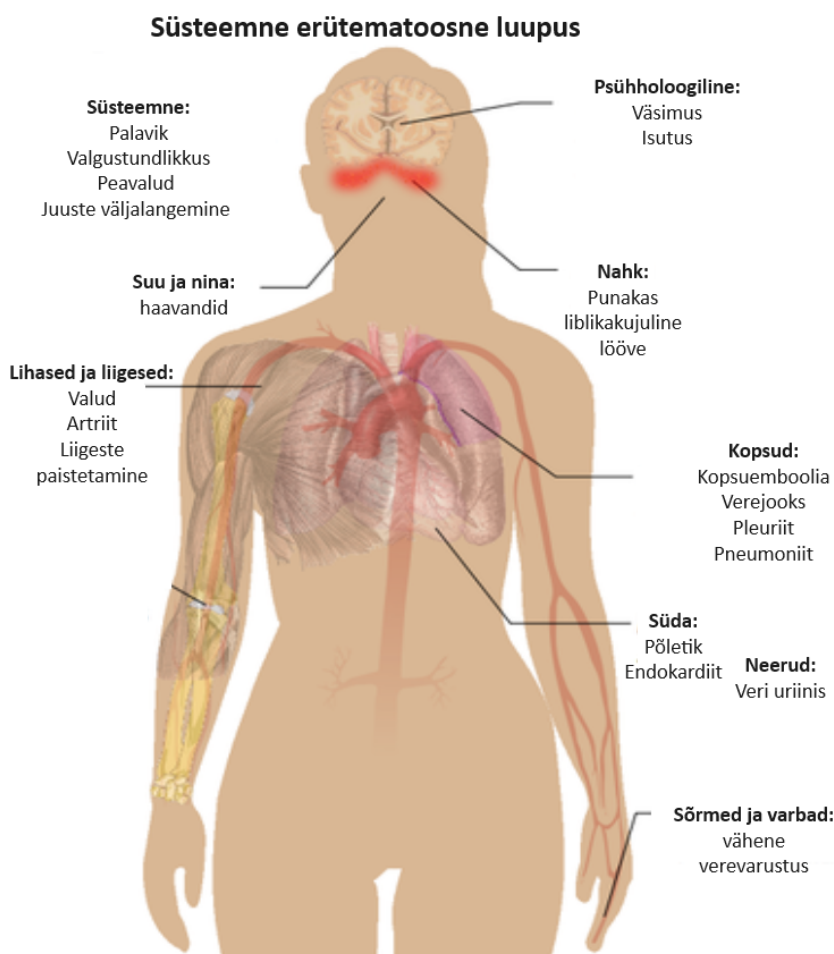
SLE diagnostikas on oluline roll biomarkeritel. Peamiseks SLE biomarkeriks on seerumis leiduvad anti-dsDNA, antinukleosoomsed, tuumavastased antikehad, RNA ning fosfolipiidide vastased autoantikehad, samuti ka RNA ja DNA seonduvate valkude vastased autoantikehad ning võib esineda madal C3 ja C4 komplementide sisaldus veres (Em, 1982; Hochberg, 1997; Ramsey-Goldman *et al.*, 2017; Yu *et al.*, 2021). SLE tekkemehhanismide tuvastamiseks on teostatud ka ülekenoomseid uuringuid (*Genome Wide Association Studies*). Mitmeid gene seostatakse luupuse eelsoodumusega, milleks on enamasti immuunkomponente kodeerivad geenid (Generali *et al.*, 2017; Ghodke-Puranik & Niewold, 2015).

1.5.1. SLE sümptomid ja ravi

SLE patsientide sümptomid võivad olla väga varieeruvad kergematest raskemateni. Sümptomid võivad olla nii mööduvad kui ka pikaajalisemad ning aja jooksul võib tekkida uusi sümptomeid. SLE võib mõjutada nii üht kui ka mitut keha- ja organipiirkonda ning haigus mõjutab peamiselt nahka, liigeseid, südant, kopse, neere ning aju, põhjustades neis kudede kahjustust ning põletikulist reaktsiooni (vt Joonis 3). Kui sihtmärkorganiks on nahk, siis esineb tihti liblikakujuline punetus näol, punased laigud ning suu ja nina limaskesta haavandid. Neeruhaaratuse korral on peamiseks sümptomiks hematuuria ja proteiinuuria. Tekkinud põletik võib viia neerupuudulikkuseni ja mäluprobleemideni, ühtlasi ka südameveresoonekonna häireteni. SLE levinumate sümptomite hulka kuuluvad palavik, juuste väljalangemine, alakõhuvalud, peavalud, paistetused peamiselt nina ja suuümbruskonnas ja mitmed muud sümptomid (Cojocaru *et al.*, 2011).

SLE sümptomite mahasurumiseks kasutatakse immunosupressiivseid ja bioloogilisi ravimeid. Bioloogiliste SLE ravimite hulka kuuluvad Belimumab ja Anifrolumab (Katarzyna *et al.*, 2023). Belimumab on monoklonaalne antikeha, mille eesmärgiks on inhibeerida B-rakke aktiveerivat faktorit, mis võib leevendada haiguse sümptomeid (Gross *et al.*, 2000). Veelgi uuem lähenemine haiguse sümptomite stabiliseerimiseks on Anifromulabi ravimi kasutuselevõtt. Anifromulab toimib kui antagonist, mis inhibeerib I tüüpi IFN-de aktiivsust,

seondudes I tüüpi IFN retseptorile (Riggs *et al.*, 2018). Rituximab kuulub samuti autoimmuunhaiguste bioloogiliste ravimite hulka, kuid üldjuhul manustatakse seda patsientidele, kellel muu ravim ei ole seisundit paremaks muutnud (England, 2023).



Joonis 3. Põhilised SLE sümptomid.³ Joonisel on kujutatud peamised SLE patsientide sümptomid, mis võivad kulgeda kergematest raskemateni. SLE-d iseloomustab erinevate organite ja kehapiirkondade haaratus, mille raskusaste võib olla erinev. Peamised SLE sümptomid on palavik, peavalu, väsimus, valud ning liblikakujuline lööve näopiirkonnas.

³ https://www.physio-pedia.com/Systemic_Lupus_Erythematosus

1.5.2. I ja II tüüpi interferoonid SLE patogeneesis

SLE-d iseloomustab suurenenud IFN-ide kontsentratsioon patsiendi vereseerumis. SLE patsientide geeniekspressiooni uuringud on näidanud I tüüpi IFN-ide, peamiselt IFN- α , reguleeritud geenide suurenenud ekspressiooni, mida nimetatakse I tüüpi IFN signatuuriks (Chiche *et al.*, 2013). IFN signatuuri uuritakse perifeersetest või täisvere leukotsüütidest ning uuringud on näidanud, et mitmeid ISG-sid indutseerivad nii I, II kui ka III tüüpi IFN-id, ent tulemused on olnud varieeruvad. Ebamäärased tulemused on raskendanud erinevat tüüpi IFN-ide osatähtsuse kindlaks tegemist SLE IFN signatuuris (Rönnblom & Leonard, 2019).

I tüüpi IFN liigset produktsiooni SLE patogeneesis võivad ajendada mitmed tegurid. I tüüpi IFN-ide suurenenud tootmine võib esineda liigse pDC stimulatsiooni tõttu, mis tekib, kui neutrofiili ekstratsellulaarseid lõkse ei degradeerita ekstratsellulaarse DNAas I defektide tõttu, mis võib omakorda põhjustada kudede homöostaasis häireid, autoantigeenide produktsiooni ning põletiku teket (Hakkim *et al.*, 2010). Hakkim *et al.*, (2010) leidsid uuringus retrospektiivse korrelatsioonianalüüsi tulemusena, et patsiendid, kellel esines defektne NETs-ide degradeerimine, arenes sagedamini välja luupusnefriit, kui neil, kelle NETs-ide degradeerimisvõime oli normis. Nahalööbe puhul on täheldatud IFN- λ 1 ja IFN κ suurenenud ekspressiooni (Sarkar *et al.*, 2018; Zahn *et al.*, 2011). II tüüpi IFN-i aktiivsust seostatakse Th1 rakkude diferentseerumise ning küpsemisega ning samuti ka T-rakkude Th2-ks diferentseerumise pärssimisega, mis põhjustab Th1 ja Th2 tasakaalutust (Liu & Wang, 2022; M. H. Sarkar *et al.*, 2021).

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

Hüpotees: I ja II tüüpi IFN-ide skoor ennustab kõrgemat IFN- α , β ja γ kontsentratsiooni SLE patsientide vereseerumis ning kõrgem IFN skoor korreleerub raskema kliinilise kuluga.

Käesoleva uurimistöö eesmärgid:

- 1) Kirjeldada I ja II tüüpi interferoonide stimuleeritud geenide ekspressiooni süsteemse erütematoosse luupusega patsientide vererakkudes.
- 2) Võrrelda I ja II tüüpi interferoonide skooore patsientidel ja kontrollidel.
- 3) Võrrelda IFN skooore IFN- α , β ja γ kontsentratsioonidega.
- 4) Võrrelda IFN skooore kliiniliste sümptomitega.
- 5) Seostada IFN skooore haigusaktiivsusega.

2.2. Materjal ja meetodika

2.2.1. Uuritud materjal

Käesoleva uurimuse raames uuriti 71 SLE patsiendi esimese ajapunkti, 50 teise ajapunkti (ligikaudu kuus kuud peale esimest vereproovi) ning 43 kontrolli RNA stabilisaatoriga segatud täisverest eraldatud RNA-d. Patsientide ja kontrollide iseloomustavad andmed on välja toodud Tabelis 2. Patsientide proovid pärinesid Ida-Tallinna Keskhaigla reumatoloogiakeskusest. Kontrollgruppi kaasati isikuid nii Ida-Tallinna Keskhaigla patsientide kui Bio- ja siirdemeditiini instituudi töötajate seast, kellel ei esine autoimmuunhaigusi. Uuring on läbi viidud kooskõlas Eetkikakomiteega (TAIEK otsus 564, TAIEK otsus 630) ning kõik uuritavad allkirjastasid informeeritud nõusoleku.

Tabel 2. Kliinilisse valimisse kaasatud patsientide ja kontrollide keskmine vanus, sugu, IFN kontsentratsioonid ja keskmine SLEDAI väärtus ajapunktide järgi.

	Patsiendid				Kontrollid	
	Esimene ajapunkt		Teine ajapunkt			
	n=71		n=50		n=43	
	Naised	Mehed	Naised	Mehed	Naised	Mehed
	(89%)	(11%)	(88%)	(12%)	(91%)	(9%)
	63	8	44	6	39	4
Rass	Kaukaaslased					
Vanus, mediaan (IQR)	49 (41-58)		50 (42-59)		49,5 (42-58)	
IFN- α kontsentratsioon*, mediaan (IQR)	152,2 fg/ml (10,02-591,52)		117,1 fg/ml (29,05-509,7)		0,71 fg/ml (0,33 – 2,58)	
IFN- β kontsentratsioon*, mediaan (IQR)	72,5 fg/ml (31-134)		101 fg/ml (53-162)		58,4 fg/ml (45,7 – 91,7)	
IFN- γ kontsentratsioon*, mediaan (IQR)	7,8 NPX (7,33-8,51)		8,28 NPX (7,57-8,92)		7,8 NPX (7,1 – 8,6)	
Kõrge ja madala SLEDAI väärtusega gruppide jaotus						
	Andmed 71 patsiendi kohta		Andmed 46 patsiendi kohta			
	Kõrge	Madal	Kõrge	Madal		
	(>4)	(0-4)	(>4)	(0-4)		
	28 (39%)	43 (61%)	13 (28%)	33 (72%)		
Mediaan (IQR)	8 (6-11)	2 (0-4)	8 (6-8,5)	2 (0-4)		

* IFN- α , IFN- β ja IFN- γ kontsentratsioonid määrati teiste uurimisgrupi liikmete poolt. IFN- α kontsentratsioon määrati koostöös Pasteuri Instituudiga, kasutades Simoa meetodit. IFN- β kontsentratsioon määrati kasutades S-Plex Human IFN- β kitti (Meso Scale Discovery USA) ning IFN- γ kontsentratsioon määrati kasutades Olink *Target 96 Inflammation* paneeli (Olink Proteomics, Sweden).

2.2.2. RNA isoleerimine täisverest

2.2.2.1. Stabiliseeritud vere töötlemine enne puhastamist

Uuritavate täisveri koguti Tempus™ Blood RNA tuubidesse (Thermo Fischer Scientific, Leedu) ning RNA isoleerimiseks kasutati Tempus™ Spin RNA Isolation kitti (Thermo Fischer Scientific, Leedu). Vere töötlemiseks lisati vereproovidele 3 mL PBS-i (*IX Phosphate-Buffered Saline*, $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ vaba). Seejärel segati proove vortexil (Heidolph Reax Top, Saksamaa) maksimum pööretel 30 sekundit. Proove tsentrifugeeriti 4°C juures 3000 rcf 30 minutit (Eppendorf Centrifuge 5810 R). Tekkinud supernatant eemaldati, tekkinud RNA sade jäi tuubi põhja. Seejärel lasti proovil kuivada 1-2 minutit, pipeteeriti 400 µL RNA Purification Resuspension lahust ja segati RNA sademe resuspendeerimiseks vortexil 10 sekundit .

2.2.2.2. RNA puhastustsükli läbiviimine

RNA puhastamiseks pipeteeriti 100 µL RNA Purification Wash lahust I filtri niisutamiseks kolonnile. Resuspendeeritud proovid pipeteeriti kolonnile ja tsentrifugeeriti 30 sekundit 16000 rcf juures. Seejärel eemaldati kolonn kogumistuubilt ning valati ära läbi jooksnud vedelik.

Järgnevalt pipeteeriti 500 µL RNA Purification Wash I lahust kolonnile ja tsentrifugeeriti 30 sekundit 16000 rcf juures. Läbi jooksnud vedelik valati ära. Etappi korrati kaks korda. Seejärel pipeteeriti 500 µL RNA Purification Wash II lahust kolonnile ja tsentrifugeeriti 60 sekundit 16000 rcf juures, eemaldati läbi jooksnud vedelik.

DNaasi töötamiseks kasutati RNase-Free DNase Set kitti (Qiagen, Saksamaa). DNaaS I võeti üles RDD puhvril vastavalt tootja protokollile. Kolonnile lisati 80 µL DNaaS I ja inkubeeriti 15 minutit toatemperatuuril. Kolonnile pipeteeriti 500 µL RNA Purification Wash II lahust ja tsentrifugeeriti 30 sekundit 16000 rcf juures, eemaldati läbi jooksnud vedelik ja korrati tsentrifugeerimist samadel tingimustel. Seejärel teostati elueerimine, milleks pipeteeriti 100 µL elueerimislahust (*Nucleic Acid Purification Elution Solution*) kolonnile ning inkubeeriti proovi 2 minutit 70 °C juures. Proove tsentrifugeeriti 30 sekundit 16000 rcf juures. Seejärel pipeteeriti 100 µL RNA eluaati tagasi kolonnile ning tsentrifugeeriti 2 min 16000 rcf juures. 81 µL RNA eluaati tõsteti uude tuubi ning proove hoiustati -80 °C juures. RNA puhastamine teostati teise uurimisgrupi liikme poolt.

2.2.3. cDNA süntees

Eraldatud RNA puhtust ja kontsentratsiooni mõõdeti *NanoDrop 2000c* (Thermo Fischer Scientific, Leedu) spektrofotomeetriga. Uuritavate patsientide verest eraldatud RNA-st sünteesiti komplementaarne DNA (cDNA) kasutades Superscript III pöördtranskriptaasi (Invitrogen, USA). Reaktsiooniks segati kokku 1 µl 10 mM dNTP segu (Solis BioDyne, Eesti), 1 µl Oligo(dt)20 praimerit (Metabion) ja 500 ng isoleeritud RNA-d. Seejärel teostati proovidele inkubatsioon viis minutit 65 °C juures. Peale inkubatsiooni hoiti proove üks minut jääl. Seejärel segati kokku ensüümisegu, mis sisaldas ühe proovi kohta 4 µl 5x esimese ahela sünteesipuhvrit (*5x First Strand Buffer*), 1 µl 0.1M DTT, 1 µl ribonukleaasi inhibiitorit RiboLock 40 U/µl (Thermo Fischer Scientific, Leedu) ensüümi ning 1 µl SuperScript III 200 U/µl. Ensüümisegu lisati eelnevalt inkubeeritud proovidele. Seejärel teostati proovidele inkubatsioon 50 °C juures 60 minutit, millele järgnes 70 °C juures 15 minutiline inkubatsioon. Proovid säilitati -20 °C juures.

2.2.4. Uuritavad geenid ja kasutatud praimerid

Käesolevas töös uuriti 16 ISG ekspresioonitasemeid. Ekspresioonitasemete määramiseks disainiti päripidised (*Forward*) ja äraspidised (*Reverse*) praimerid (vt Tabel 3). IFN- α ja IFN- β raja geenide valimisel lähtuti varasemalt testitud geenidest ning IFN- γ raja geenide valimisel tugineti varasemale kirjandusele ja nende potentsiaalsele seosele SLE haigusega.

Praimerite disainimiseks kasutati NCBI PrimerBlasti programmi (Ye *et al.*, 2012) ning praimerid telliti Metabion firmast. Kasutatud praimeritest disainiti praimerid kahele geenile - *CIITA* ja *USP18*. Ülejäänud praimerid olid disainitud teiste molekulaarpatoloogia uurimisgrupi liikmete poolt. Praimerite disainimisel lähtuti järgmistest kvaliteedinäitajate kriteeriumidest:

- PCR produkti miinimum pikkuseks on 70 nukleotiidi ning maksimaalseks suuruseks 150 nukleotiidi.
- Praimerite sulamistemperatuur (T_m) peab jääma 59 °C – 64 °C vahele.
- Praimerite järjestuste vaheline ala peab jääma kahe eksoni piiri peale.

Tabel 3. Töös uuritud geenid ja nende ekspresioonitaseme määramiseks kasutatud praimerite järjestused.

IFN raja geenid	Geen	<i>Forward</i> 5' → 3'	<i>Reverse</i> 3' → 5'
Kodu-hoidja	<i>βACT</i>	CTGGAACGGTGAAGGTGACA	CGGCCACATTGTGAACTTTG
IFN- γ raja geenid	<i>CIITA</i>	CCTTGGA AACCTCAATCTG	CAGTTATTGTACAAGCTTAGCC
	<i>GBP6</i>	AACAAGAGGTGAGTGAGGCA	CCAACCTAGAAGAGCCTGC
	<i>GBP4</i>	CAGTGCCACACCAGGTTAT	ACCACGGGCTGAGAAATCTT
	<i>GBP2</i>	GAAGATGTCAAGCAGGGAACA	AGCACCTCTTTGGCCTGT
	<i>CXCL10</i>	TTCCTGCAAGCCAATTTGT	TTCTTGATGGCCTTCGATTC
	<i>USP18</i>	CGCTTGCATGGCGCTTG	GACAGCACGACTTCACTTCCAG

IFN- α ja IFN- β raja geenid	<i>IRF7</i>	GGCCTTCTCGCCAGCACA	CGTCGCTTCGTGATGCTGC
	<i>ISG15</i>	AGAGGCAGCGAACTCATCTT	AGCATCTTCACCGTCAGGTC
	<i>MX1</i>	AGGCTCGGTGGCTGAGAA	ACCTAGAGCCCCGAGGGAG
	<i>MX2</i>	TGAATGCCTACTTCTTGGAACCA	GAGTCACCATTCTCTCGGAGCA
	<i>IFIH1</i>	ATGGAGCAATATACTAGGACTG	TTGTTCATTCTGTGTCATGG
	<i>IFI44L</i>	GTGGCCTTGCTTACTAAAGTGGATG	CCCGGCTTTGAGAAGTCATAGA
	<i>IFIT1</i>	ATCCACAAGACAGAATAGCCAGATCT	TGTACTCATGGTTGCTGTAAATTAGGC
	<i>OAS2</i>	CACCAGCTCCAATCAGCGAG	TCAGCCATTGCCAGCATATTTTATC
	<i>SIGLEC1</i>	TCACTCTTCTCCAGGTCCG	TGGGACTCCTGTGTGTACCT
	<i>RSAD2</i>	TTCCACACAGCCAAAACATCC	TGAAGAAATGGCTCTCCACC

2.2.5. cDNA amplifitseerimine qPCR-i meetodiga

ISG-de ekspressioonitasemete mõõtmiseks kasutati kvantitatiivset polümeraasi ahelreaktsiooni meetodit. cDNA proovidest tehti 1/10 lahjendused kasutades nukleaasivaba (*Nuclease Free*) vett. Segati kokku F ja R praimerite lahjendused lõppkontsentratsiooniga 5 mM. Seejärel valmistati iga proovi kohta reaktsioonisegu, mis sisaldas 19,8 µL SYBR™ Green PCR Master Mix-i (Applied Biosystems™, USA), 3.3 µL praimerite segu ja 15 µL lahjendatud cDNA-d. Proovid jagati 384-augulisele mikrotiiterplaadile, iga proovi kohta oli kolm paralleeli. Kõikide praimerite puhul kasutati kontrollina nukleaasivaba vett. Seejärel jooksutati plaati kaks tundi qPCR masinas järgmise programmiga: polümeraasi aktivatsioon üks tsükkel 10 minutit 95 °C juures, 45 tsükli denaturatsiooni 15 sek 95 °C juures, praimerite seondumine ning produkti paljundamine üks minut 60 °C juures, üks tsükkel dissotsiatsioonietappi 95 °C juures 15 sek, üks minut 60 °C juures, millele järgnes üks tsükkel sulamiskõvera analüüsi.

2.2.6. Andmete statistiline analüüs

Geeniekspressiooni andmete analüüsiks kasutati võrdlevat Ct meetodit valemiga $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001). Proovid normaliseeriti koduhoidjageeni $\beta-ACT$ ja terve kontrolli suhtes. I tüüpi IFN skoori arvutamiseks kasutati I ja II tüüpi IFN skoori arvutamiseks viie ISG $2^{-\Delta\Delta Ct}$ meetodiga leitud suhtelisi ekspresiooniväärtusi. Geenide suhteliste ekspresioonitasemete normaliseerimiseks võeti esmalt ruutjuur nii kontrollgrupi kui patsientide väärtustest. Seejärel arvutati kontrollgrupis iga geeni keskmine väärtus ning standardhälve. Järgnevalt arvutati nii patsientidele kui ka kontrollproovidele z-skoorid, kasutades järgnevat valemit (Feng *et al.*, 2006):

$$\sum_{i=1}^n = \frac{\text{Geen}_{iSLE} - \bar{X}(\text{Geen}_{iKT})}{SD(\text{Geen}_{iKT})}$$

kus i = IFN-indutseeritud geen, Geen_{iSLE} = iga SLE patsiendi geeniekspressiooni tase, Geen_{iKT} = kontrollide geeniekspressiooni tase, \bar{X} = kontrollproovide keskmine, SD = kontrollproovide standardhälve. IFN skooride leidmiseks summeeriti geenide z-skoorid.

IFN skooride positiivseteks ja negatiivseteks jaotamiseks arvutati skooride *cut-off* väärtused. *Cut-off* väärtuste arvutamiseks liideti kokku kontrollide skooride keskmine väärtus ja 2SD-d. Patsiendid, kelle IFN skoor jäi alla *cut-off* väärtuse, loeti negatiivseteks ning patsiendid, kelle IFN skoor oli üle *cut-off* väärtuse, loeti positiivseteks. SLE positiivsete ja negatiivsete andmeid kasutati kliiniliste sümptomite Hii-ruut testide tegemiseks (leitav: <https://www.socscistatistics.com/tests/chisquare2/default2.aspx>).

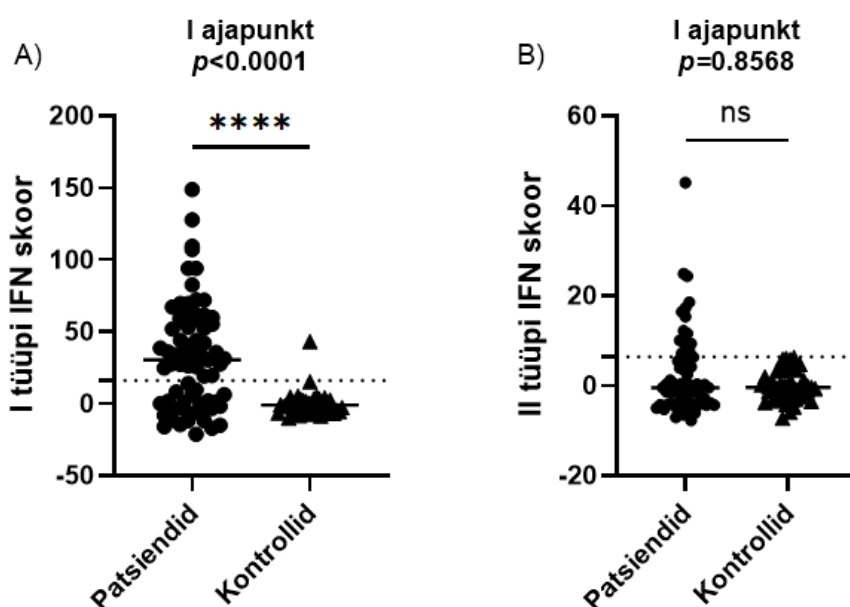
Andmete statistiliseks analüüsiks ja tulemuste graafiliseks näitamiseks kasutati GraphPad Prism 10.2.0 (GraphPad Software Inc, USA) rakendust. Tulemuste interpreteerimiseks kasutati mitteparameetrilist Mann-Whitney U-testi ja Spearmani korrelatsioone. Statistiliselt oluliseks loeti $p < 0,05$ tulemusi. Graafikutel on esitatud gruppide mediaanid ning katkendliku joonega skooride *cut-off* väärtused.

2.3. Tulemused

Käesolevas töös mõõdeti 11 IFN- α , IFN- β raja alla kuuluva geeni ja viie IFN- γ raja alla kuuluva geeni ekspressiooni 71 esimese, 50 teise ajapunkti patsiendi ja 43 kontrolli hulgas. IFN- α , IFN- β ja IFN- γ radade alla kuuluvad geenid ja nende järjestused on märgitud Tabelis 3. Kõik geeniekspressiooni tulemused on normaliseeritud β -ACT koduhoidja geeni suhtes. Tulemustes on välja toodud esimese ajapunkti graafikud. Teise ajapunkti tulemused asuvad lisades. I tüüpi IFN *cut-off* väärtuseks saadi 16,2 ning II tüüpi IFN skooride puhul 6,4.

2.3.1. I tüüpi IFN skoor on kõrgem patsientide grupis

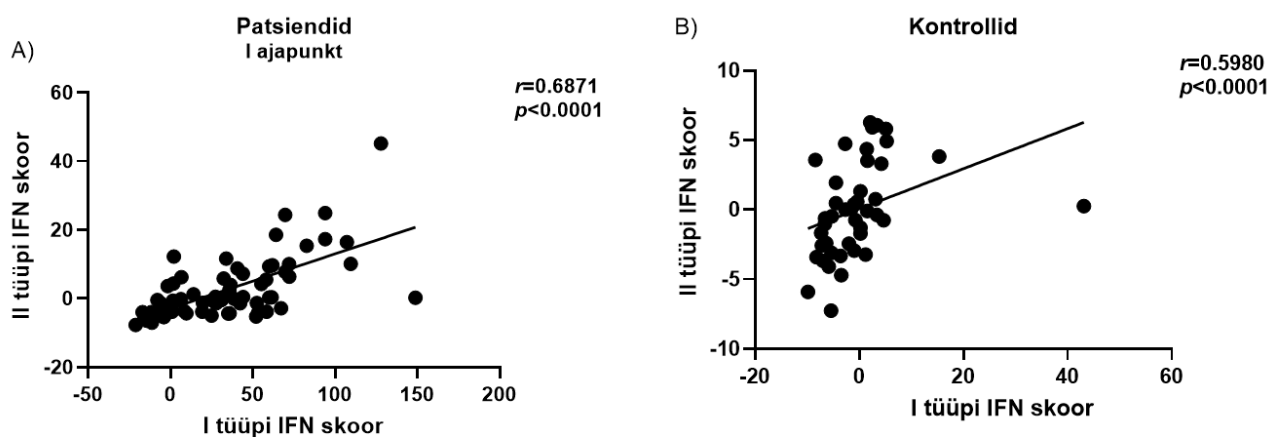
Bakalaureusetöö üheks eesmärgiks oli määrata qPCR-i kaudu I ja II tüüpi interferoonide indutseeritud geenide ekspressioonid ning võrrelda mõõdetud geenide põhjal arvatud I ja II tüüpi IFN skoores nii patsientide kui ka kontrollide seas. SLE patsientide ja kontrollgrupi I ja II tüüpi IFN skooride erinevuste hindamiseks kasutati mitteparameetrilist Mann-Whitney U-testi. SLE patsientide ja kontrollgrupi vahel esines I tüüpi IFN skoori võrdlemisel statistiliselt oluline erinevus ($p < 0,0001$) (vt joonis 4A). I tüüpi IFN skoori mediaan oli oluliselt kõrgem SLE patsientide hulgas võrreldes kontrollgrupi mediaaniga. Patsientide ja kontrollgrupi II tüüpi IFN skoori tulemuste võrdlemisel statistiliselt olulist erinevust ei esinenud (vt Joonis 4B). Statistiliselt oluline erinevus I ja II tüüpi skoori kahe grupi vahel leiti teises ajapunktis (vt Lisa 1).



Joonis 4. I ja II tüüpi IFN skooride võrdlus SLE patsientide ja kontrollgrupi vahel. Patsientide ja kontrollgrupi vaheline erinevus on arvatatud mitteparameetrilise Mann-Whitney

U-testiga, kus ns= mitteoluline (*nonsignificant*); * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ ja **** $p \leq 0,0001$.

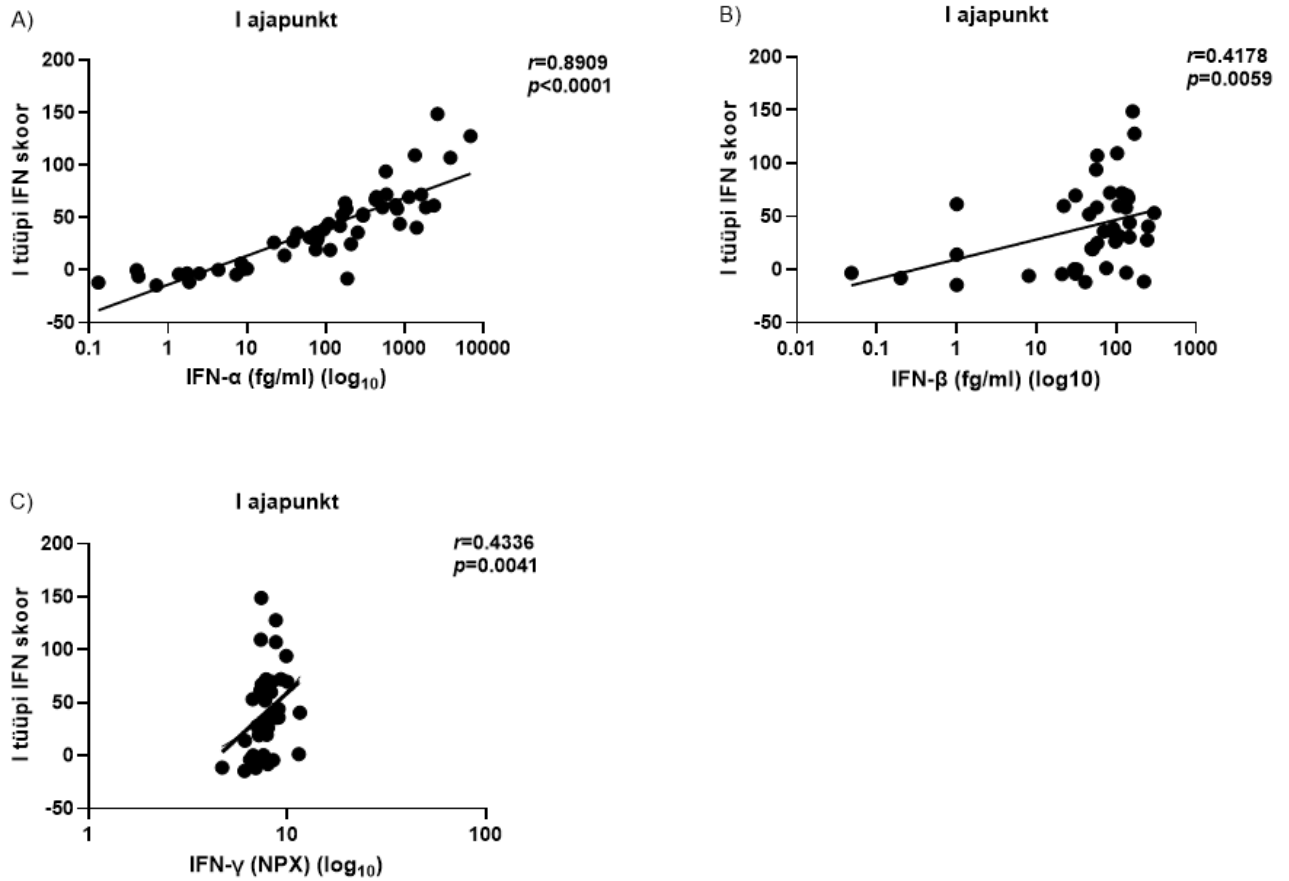
I ja II tüüpi IFN skooride võrdlemiseks korreleeriti skooore omavahel. Analüüsi tulemusena saadud andmed näitavad, et I ja II tüüpi IFN skooride vahel esineb patsientide seas statistiliselt oluline positiivne korrelatsioon ($r=0,6871$; $p < 0,0001$) (vt Joonis 5A) ning tugev positiivne korrelatsioon leiti ka teise ajapunkti I ja II tüüpi skooride vahel (vt Lisa 2). Statistiliselt oluline korrelatsioon I ja II tüüp IFN skooride vahel leiti ka kontrollide hulgas ($r=0,5980$; $p < 0,0001$) (vt joonis 5B).



Joonis 5. I ja II tüüpi IFN skooride omavaheline võrdlus patsientide esimeses ajapunktis ja kontrollides. Korrelatsiooni arvutamiseks kasutati Spearmani korrelatsiooni. Statistiliselt oluliseks loeti $p < 0.05$.

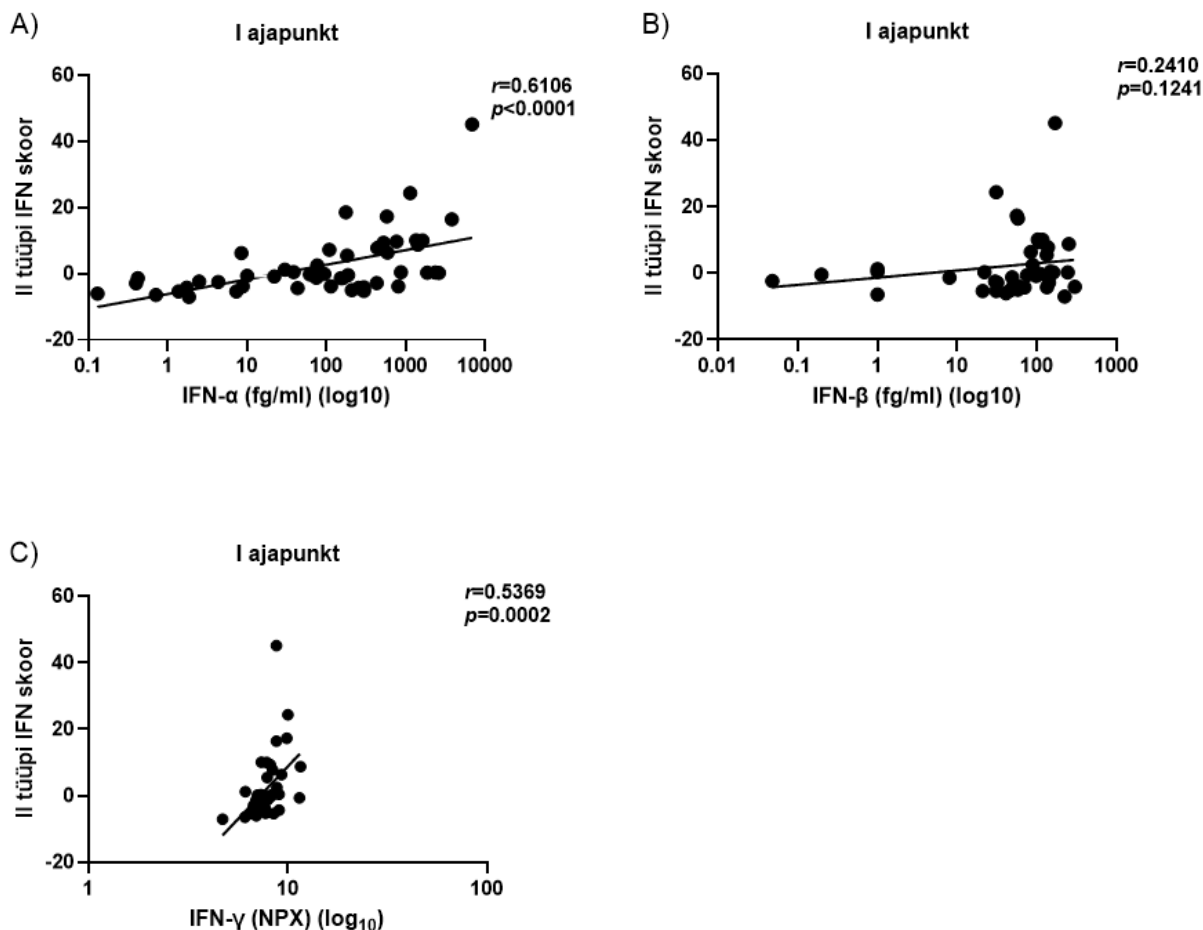
2.3.2. I ja II tüüpi IFN skooride seos IFN- α , IFN- β , IFN- γ kontsentratsioonidega vereseerumis

Töö raames uuriti I ja II tüüpi IFN skooride seost IFN- α , IFN- β ning IFN- γ kontsentratsioonidega SLE patsientide vereseerumis. I tüüpi IFN skoor korreleerus väga tugevalt statistiliselt oluliselt IFN- α (fg/ml) kontsentratsiooniga mõlemas ajapunktis ($r=0,8909$; $p < 0,0001$) (vt Joonis 6A, Lisa 3). Mõnevõrra madalam kontsentratsioon esines IFN- β ($r=0,4178$; $p=0,0059$) (vt Joonis 6B) ja IFN- γ kontsentratsiooniga ($r=0,4336$; $p=0,0041$) (vt Joonis 6C).



Joonis 6. Esimese ajapunkti I tüüpi IFN skoori seos IFN- α , IFN- β , IFN- γ kontsentratsioonidega. Joonisel on esitatud I tüüpi IFN skoori korrelatsioon IFN- α , IFN- β ja IFN- γ kontsentratsioonidega. IFN skoori ja kontsentratsioonide korrelatsiooni leidmiseks kasutati Spearmani korrelatsiooni. Statistiliselt oluliseks loeti $p < 0.05$.

II tüüpi IFN skoori ja IFN- α kontsentratsiooni vahel leiti statistiliselt oluline korrelatsioon mõlemas ajapunktis ($r=0,6106$; $p<0,0001$) (vt Joonis 7A, Lisa 4). IFN- β kontsentratsiooniga statistiliselt oluline seos puudus. II tüüpi IFN skoor ja IFN- γ kontsentratsioon korreleerusid statistiliselt oluliselt ($r=0,5369$; $p=0,0002$) (vt Joonis 7C).



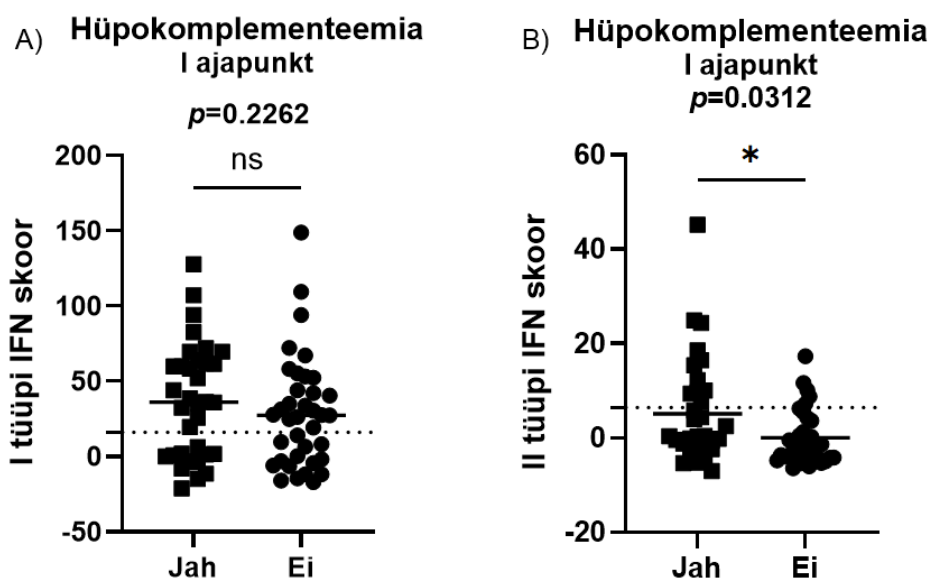
Joonis 7. Esimese ajapunkti II tüüpi IFN skoori seos IFN- α , IFN- β , IFN- γ kontsentratsioonidega. Joonisel on esitatud II tüüpi IFN skooride korrelatsioon IFN- α , IFN- β ja IFN- γ kontsentratsioonidega. IFN skoori ja kontsentratsioonide vaheliste seoste leidmiseks on arvatud Spearmani korrelatsioon. Statistiliselt oluliseks loeti $p < 0.05$.

Vaadati ka esimese ja teise ajapunkti üksikute geenide korrelatioone IFN- α , IFN- β , IFN- γ kontsentratsioonidega. IFN- α kontsentratsioon korreleerus tugevalt kõikide I tüüpi IFN raja geenidega (vt Lisa 9 ja Lisa 10), IFN- β puhul esinesid geenidega madalamad korrelatsioonid (vt Lisa 11 ja Lisa 12) ning IFN- γ kontsentratsioon korreleerus nõrgalt II tüüpi IFN raja alla kuuluvate geenidega (vt Lisa 13 ja Lisa 14).

2.3.3. I ja II tüüpi IFN skooride võrdlus kliiniliste sümptomitega

Käesoleva töö raames analüüsiti kliiniliste sümptomite hulgast I ja II tüüpi IFN skoori rolli hüpokomplementeemia, neeruhaaratuse ja anti-dsDNA antikehade esinemisel. Võrreldi mõlema IFN skoori seost hüpokomplementeemia fenotüübiga, jaotades patsientide grupi kaheks - need, kellel esines hüpokomplementeemia ja need, kellel sümptomid puudusid. Analüüsi eesmärgiks oli leida, kumb IFN skoor mõjutab rohkem hüpokomplementeemia esinemist. Andmed hüpokomplementeemia esinemise kohta saadi kliinilistest andmetest. 34 SLE patsiendil esines hüpokomplementeemia ning 37 patsiendil sümptomeid ei esinenud. II tüüpi IFN skoori ja hüpokomplementeemia vahel leiti statistiliselt oluline erinevus ($p=0,031$), nimelt II tüüpi IFN skoori mediaan oli kõrgem sümptomitega grupis (vt Joonis 8B). I tüüpi IFN skooride ja hüpokomplementeemia gruppide vahel statistilist olulist erinevust ei esinenud. Teise ajapunkti tulemused on välja toodud lisades (vt Lisa 5).

I tüüpi IFN skooride 71-st SLE patsiendist oli SLE positiivseid 44 ja negatiivseid 27, positiivsetest esinesid sümptomid 22-l, 22-l sümptomeid ei esinenud ning negatiivsetest esinesid sümptomid 12-l ja 15-l sümptomeid ei esinenud. II tüüpi IFN skooride 71-st SLE patsiendist oli SLE positiivseid 16 ja negatiivseid 55, positiivsetest 11-l esinesid sümptomid, viiel sümptomeid ei esinenud ning negatiivsetest 23-l esinesid sümptomid ja 32-l sümptomeid ei esinenud. Võrreldes II tüüpi IFN skooride kahte gruppi Hii-ruut testiga, saadi statistiliselt oluline väärtus ($p=0,048$).

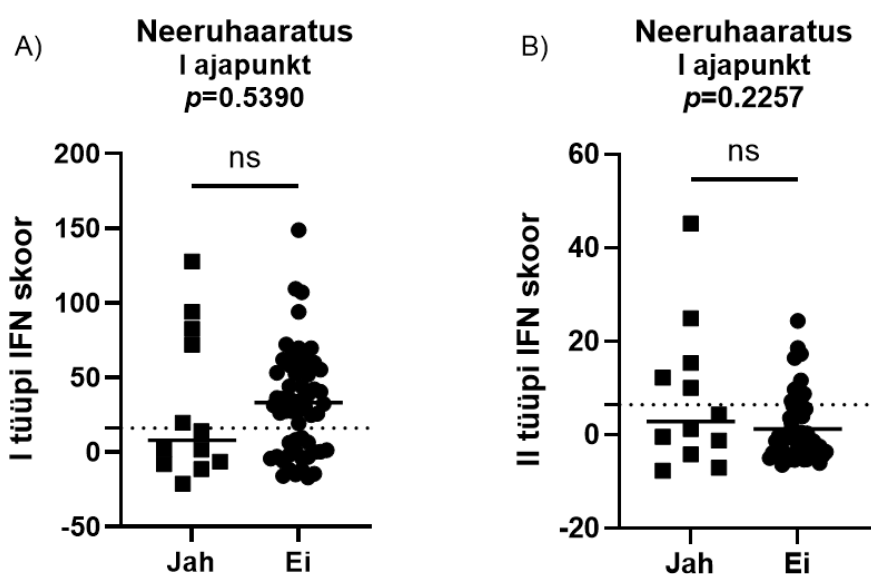


Joonis 8. I ja II tüüpi IFN skoori seos hüpokomplementeemia sümptomite esinemisele SLE patsientide grupis. Graafikul on näidatud hüpokomplementeemiaga SLE patsientide ja

hüpokomplementeemiata patsientide grupi vahelisi IFN skooride erinevusi. Hüpokomplementeemiaga patsientide grupp on tähistatud märkega „Jah” ning hüpokomplementeemiata patsientide grupp on tähistatud märkega „Ei”. Kahe grupi vaheline erinevus on arvutatud mitteparameetrilise Mann-Whitney U-testiga, kus ns= mitteoluline (*nonsignificant*); * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ ja **** $p \leq 0,0001$.

Neeruhaaratuse kliiniliste andmete põhjal esines 12 SLE patsiendil neeruhaaratus ja 59 patsiendil neeruhaaratuse sümptomid puudusid. I tüüpi IFN skoori mediaan oli madalam sümptomitega patsientide grupis, kuid tulemus kahe grupi vahel oli statistiliselt mitteoluline (vt Joonis 9A). II tüüpi IFN skoor näitas kõrgemat mediaani neeruhaaratusega patsientide grupis, ent kahe grupi vaheline erinevus osutus statistiliselt mitteoluliseks (vt Joonis 9B). Teise ajapunkti tulemused on välja toodud lisades (vt Lisa 6).

I tüüpi IFN skooride 71-st SLE patsiendist oli SLE positiivseid 44 ja negatiivseid 27, positiivsetest viiel esinesid sümptomid, 39-l sümptomit ei esinenud ning negatiivsetest seitsmel esinesid sümptomid ja 20-l sümptomit ei esinenud. II tüüpi IFN skooride 71-st SLE patsiendist oli positiivseid 16 ja negatiivseid 55. Positiivsetest viiel esinesid sümptomid, 11-l sümptomit ei esinenud. Negatiivsetest seitsmel esinesid sümptomid ning 48-l sümptomit ei esinenud. Hii-ruut testid statistilist olulisi tulemusi ei andnud.



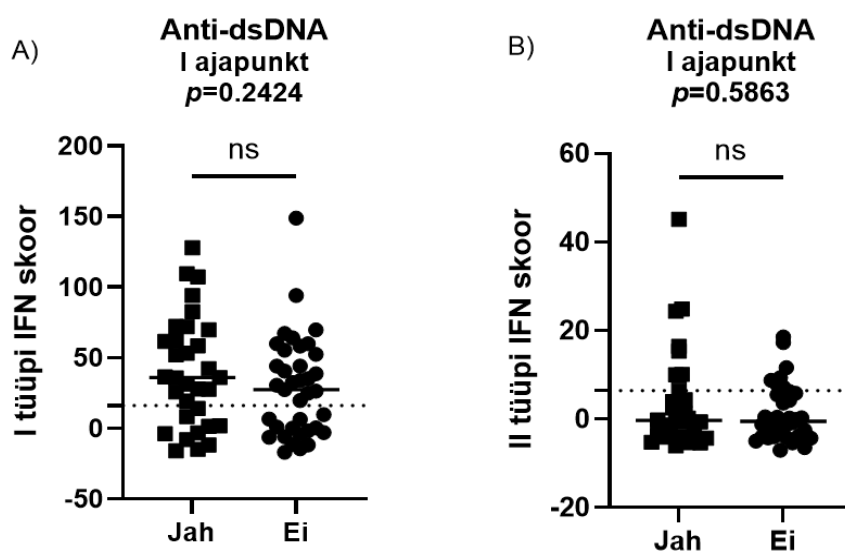
Joonis 9. I ja II tüüpi IFN skoori seos neeruhaaratuse esinemisega SLE patsientide grupis.

Joonisel on kujutatud I ja II tüüpi IFN skooride tasemeid neeruhaaratuses ja neeruhaaratuseta SLE patsientide gruppide vahel. Neeruhaaratuses patsientide grupp on tähistatud märkega

„Jah” ning neeruhaaratuseta patsientide grupp on tähistatud märkega „Ei”. Kahe grupi vaheline erinevus on arvutatud mitteparameetrilise Mann-Whitney U-testiga, kus ns= mitteoluline (*nonsignificant*); * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ ja **** $p \leq 0,0001$.

Anti-dsDNA antikehad esinesid 34 SLE patsiendi vereseerumis ning 37 anti-dsDNA antikehi ei esinenud. Anti-dsDNA positiivsete ja negatiivsete SLE patsientide I ja II tüüpi IFN skooride vahel statistiliselt olulist erinevust ei leitud (vt Joonis 10A ja 10B). I tüüpi IFN skoori puhul on dsDNA positiivsete patsientide skooride mediaan kõrgem võrreldes dsDNA negatiivsete SLE patsientidega, kuid muutus ei ole statistiliselt oluline. Statistiliselt oluline erinevus leiti teise ajapunkti I tüüpi IFN skoori ja anti-dsDNA gruppide vahel ($p=0,0248$) (vt Lisa 7A).

I tüüpi IFN skooride 71-st SLE patsiendist oli SLE positiivseid 44 ja negatiivseid 27, positiivsetest 22-l esinesid sümptomid, 22-l sümptomid ei esinenud ning negatiivsetest 12-l esinesid sümptomid ja 15-l sümptomeid ei esinenud. Gruppidele teostatud Hii-ruut test statistiliselt olulist seost ei leitud. II tüüpi IFN skooride 71-st patsiendist oli SLE positiivseid 16 ja negatiivseid 55. Positiivsetest üheksal esinesid anti-dsDNA antikehad ning seitsmel sümptomeid ei esinenud. Negatiivsetest 25-l esinesid antikehad ja 30-l ei esinenud. Hii-ruut test statistiliselt olulisi tulemusi ei andnud.

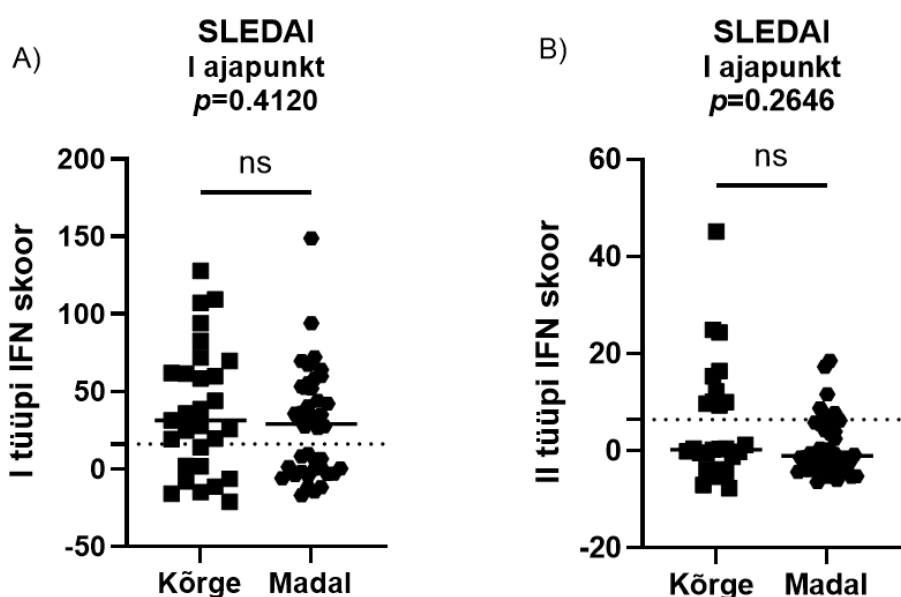


Joonis 10. Anti-dsDNA antikehade esinemise seos SLE patsientide I ja II tüüpi IFN skooridega. Kahe grupi vaheline erinevus on arvutatud mitteparameetrilise Mann-Whitney U-testiga, kus ns= mitteoluline (*nonsignificant*); * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ ja **** $p \leq 0,0001$.

2.3.4. I ja II tüüpi IFN skoori võrdlus kõrge ja madala SLEDAI väärtustega patsientide gruppide vahel

Selleks, et hinnata kas I ja II tüüpi IFN skoor mõjutab SLE haiguse aktiivsust, kasutati SLE haiguse aktiivsust kirjeldavat indeksit SLEDAI (*Systemic Erythematosis Disease Activity Index*). Selle jaoks jagati patsiendid kahte gruppi SLEDAI väärtuste põhjal. Madalasse gruppi kuulusid patsiendid, kelle haiguse aktiivsuse skoor on 0 - 4 ning kõrgesse gruppi kuulusid patsiendid haiguse aktiivsuse skooriga > 4. Nii I kui ka II tüüpi IFN skooride võrdlus kõrge ja madala SLEDAI grupiga ei näita esimeses ajapunktis statistiliselt olulisi tulemusi (vt Joonis 11). Statistiliselt oluline erinevus leiti teise ajapunkti I tüüpi IFN skoori ja SLEDAI kõrge ja madala grupi vahel ($p=0,0001$) (vt Lisa 8).

I tüüpi IFN skooride 71-st SLE patsiendist oli SLE positiivseid 44 ja negatiivseid 27, positiivsetest 20-l oli kõrge, 24-l madal SLEDAI skoor ning negatiivsetest üheksal kõrge ja 18-madal SLEDAI skoor. Gruppidele teostatud Hii-ruut test statistiliselt olulist seost ei leitud. II tüüpi IFN skooride 71-st patsiendist oli SLE positiivseid 16 ja negatiivseid 55. Positiivsetest 10-l oli kõrge ning kuuel madal SLEDAI skoor. Negatiivsetest 19-l oli kõrge ja 36-l madal skoor. Hii-ruut test andis statistiliselt olulise tulemuse ($p=0,045$).



Joonis 11. I ja II tüüpi IFN skooride seos kõrge ja madala SLEDAI aktiivsusega SLE patsientide gruppides. Madalasse gruppi kuuluvad patsiendid, kelle haiguse aktiivsuse skoor on 0 - 4 ning kõrgesse gruppi kuuluvad patsiendid haiguse aktiivsuse skooriga > 4. Kõrge ja

madala grupi vaheline erinevus on arvutatud mitteparameetrilise Mann-Whitney U-testiga, kus ns= mitteoluline (*nonsignificant*); * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ ja **** $p \leq 0,0001$.

2.4. Arutelu

Käesoleva töö eesmärkideks oli mõõta I ja II tüüpi interferooni stimuleeritud geenide ekspressiooni SLE patsientidel ja seeläbi võrrelda saadud geeniekspressioonide põhjal arvutatud skooore patsientide ja kontrollide vahel. IFN skooride arvutamiseks määrati 16 ISG ekspressioonitasemed. Lisaks seati eesmärgiks võrrelda I ja II tüüpi IFN skooore IFN- α , IFN- β ja IFN- γ kontsentratsioonidega SLE patsientide vereseerumis ning kliiniliste sümptomitega ja haigusaktiivsusega. Vaadeldavate kliiniliste sümptomite hulka valiti anti-dsDNA antikehade esinemine vereseerumis, hüpokomplementeemia ning neeruhaaratus.

2.4.1. Interferoon-stimuleeritud geenide ekspressioon

Üheks võimaluseks ISG-de ekspressiooni panust SLE patogeneesis hinnata on I ja II tüüpi IFN skooride kaudu. I tüüpi IFN skoor on SLE uuringute fookuses olnud pikemat aega ning kõrget I tüüpi IFN skoori on leitud ligikaudu 60-80% SLE patsientidel (Shen *et al.*, 2022). Selleks, et koondada IFN stimuleeritud geenide ekspressiooni ja võrrelda neid patsientide, kontrollide ja kliiniliste andmetega, liideti kokku I tüüpi IFN raja alla kuuluvate geenide standardiseeritud suhtelised geeniekspressiooni väärtused ja analüüsiti neid. IFN skoor oli patsientide grupis kõrgem nii I kui ka II tüüpi IFN skoori korral, kuid statistiliselt oluline oli erinevus ainult I tüüpi IFN skoori korral (vt Joonis 4). I tüüpi IFN skoori tulemused patsientide ja kontrollide grupis kattuvad varasemalt Palli ja kolleegide leitud tulemustega (Palli *et al.*, 2019). Liigne I tüüpi IFN produktsiooni indutseerimine põhjustab ISG-de üleekspressiooni ja seeläbi on ka IFN skoor kõrgem, mida seostatakse haiguse progresseerumisega (Barrat *et al.*, 2019; Merrill *et al.*, 2018; Rönnblom & Leonard, 2019). Kuigi peamiselt on uuringud keskendunud I tüüpi interferoonidele ning IFN- α ja selle retseptorite blokeerimisele, on oluline ka uurida ka II tüüpi IFN rolli SLE patogeneesis. I ja II tüüpi interferoonide skoorid korreleerusid statistiliselt oluliselt antud töös nii patsientide kui ka kontrollide seas. Uuringud on näidanud, et IFN- γ võib võimendada II tüüpi IFN-i mõju I tüüpi IFN-ide indutseerimise kaudu (Barkhouse *et al.*, 2015). Samuti võivad II tüüpi IFN-id olla I tüüpi IFN-idele võimendava mõjuga ja/või toimida nendega sünergistlikult (Levy *et al.*, 1990; Schroder *et al.*, 2004).

Lisaks I ja II tüüpi IFN skoori võrdlusele patsientide ja kontrollide seas võrreldi mõlemat skoori ka IFN- α , IFN- β ning IFN- γ kontsentratsioonidega vereseerumis. Saadud tulemused näitasid statistiliselt olulist seost IFN- α , IFN- β ja IFN- γ kontsentratsiooni ja I tüüpi IFN skoori vahel (vt Joonis 6). On leitud, et enam kui pooltel SLE patsientidest on võrreldes tervete kontrollidega IFN skoor oluliselt tõusnud (Lambers *et al.*, 2019) ning I tüüpi IFN skoori tõusuga on

täheldatud IFN- α/β ja IFN- γ kontsentratsiooni suurenemist vereplasmas (Oke *et al.*, 2019). IFN- α kontsentratsiooni on võrreldud ka haiguse aktiivsusega ning on leitud, et IFN- α kontsentratsiooni suurenedes kasvab ka haiguse aktiivsus (Kim *et al.*, 1987). Kuna IFN- α kontsentratsioon korreleerub I tüüpi IFN skooriga, võib I tüüpi IFN skoor olla potentsiaalseks IFN- α kontsentratsiooni ennustajaks ning seeläbi ka haiguse aktiivsuse potentsiaalseks näitajaks.

2.4.2. Interferoonide skooride seos kliiniliste sümptomitega

Anti-dsDNA antikehad on ühed peamised biomarkerid, mis viitavad SLE haiguse esinemisele. Suurenenud anti-dsDNA antikehade olemasolu SLE patsientide hulgas on leitud ligikaudu 70% patsientidel, kes on jäänud ravita ja kellel esineb äge haigusaktiivsus (Pavlovic *et al.*, 2010). Anti-dsDNA antikehade markeerimiseks kasutatakse ANA testi, mille positiivseid tulemusi testitakse ka anti-dsDNA antikehade suhtes (Pavlovic *et al.*, 2010). Samuti esinevad enamuse anti-dsDNA antikehadega SLE patsientidel ka tuumavastased antikehad. On leitud, et SLE patsientidel, kellel leidub seerumis anti-dsDNA antikehi, esineb sageli ka hüpokomplementeemia ning neeruhaaratus (Fu *et al.*, 2015). Käesolevas töös leiti, et anti-dsDNA antikehadega patsientide I tüüpi IFN skoor on kõrgem võrreldes patsientide grupiga, kellel anti-dsDNA antikehi ei esinenud (vt Lisa 7). Tesser ja kolleegid leidsid kõrgema IFN skoori ja normaalsete komplemendi valkude tasemega patsientidel madalamad anti-dsDNA antikehade tiitrid veres (Tesser *et al.*, 2020). Seevastu leiti Kirou *et al.*, (2005) uuringus, et kõrgema IFN- α skooriga patsientidel olid märkimisväärselt kõrgemad anti-dsDNA antikehade tasemed võrreldes madalama IFN skooridega patsientidega ning samuti seostati kõrgemat IFN skoori suurenenud haiguse aktiivsuse ja madalamate komplemendi valkude tasemetega seerumis. Seega võib anti-dsDNA antikehade esinemine ja IFN skoori kasutamine aidata määratleda SLE patsientide alagruppe, neil esinevaid sümptomeid ning haiguse aktiivsuse taset.

Hüpokomplementeemiat iseloomustab madal C3 ja C4 valkude sisaldus veres, mida kasutatakse sageli autoimmuunhaiguste diagnostikaks. Ägeda SLE puhul võib patsiendil esineda madalam C3 ja C4 valkude kontsentratsioon vereplasmas, mistõttu on immuunsüsteem häirunud ning indiviidil võib olla risk teatud infektsioonide ning autoimmuunhaiguste tekkele, nagu näiteks SLE (Wallace & Gladman, 2020). Varasemad tööd on komplementeemia normaalsete väärtuste puhul täheldanud kõrgemat I tüüpi IFN skoori, samas hüpokomplementeemia esinemise korral vastupidi madalamat I tüüpi IFN skoori (Tesser *et al.*, 2020). SLE haiguse esinemine normaalsete komplementeemia väärtuste korral on pigem tavapärane ning seda näitab hüpokomplementeemia madal SLE indiviidide tuvastamise

tundlikkus (Hochberg, 1997). Seevastu näitas Feng *et al.*, (2006) poolt läbi viidud uuring, et hüpokomplementeemiaga patsientidel esines kõrgem I tüüpi IFN skoor võrreldes patsientidega, kellel C3 ja C4 tase oli normi piirides. Käesolevas töös leiti, et hüpokomplementeemia patsientidel esines kõrgem II tüüpi IFN skoor võrreldes patsientidega, kellel hüpokomplementeemiat ei esinenud (vt Joonis 8B). II tüüpi IFN raja geene ja IFN- γ kõrgemaid kontsentratsioone on varasemalt seostatud madalama komplemendi valkude tasemetega (Oke *et al.*, 2019), seega toetab Oke ja kolleegide leid käesolevas töös leitud. Mõlemasuunaliste varasemate tulemuste interpreteerimist raskendab asjaolu, et SLE normokomplementeemia seisundit on kehvasti iseloomustatud, kuna varasemad uuringud on keskendunud rohkem hüpokomplementeemia sümptomitele ning nende seostele SLE haiguse aktiivsuse ja teiste kliiniliste markeritega.

Uuringud on kirjeldanud ka kõrgemat ISG-de ekspressiooni SLE patogeneesis neeruhaaratuse korral. Feng *et al.*, (2006) uuring kirjeldas kõrgemat I tüüpi IFN skoori patsientidel, kellel esines kõrgem neeruhaaratustase võrreldes nendega, kellel haiguse kulg nii aktiivne ei olnud (Feng *et al.*, 2006). Käesoleva töö tulemused näitasid, et neeruhaaratusega patsientide ja kontrollgrupi I ja II tüüpi IFN skooride vahel statistiliselt olulist erinevust ei olnud (vt Joonis 9). Kuigi tulemused ei olnud statistiliselt olulised, oli neeruhaaratusega patsientide grupi I tüüpi IFN skoori mediaanväärtus madalam võrreldes patsientidega, kellel neeruhaaratust ei esinenud. Analüüsi kaasati ka IFN- γ raja geene, et uurida II tüüpi IFN indutseeritud geenide rolli SLE neeruhaaratuse korral, mille tulemused olid samuti statistiliselt mitteolulised. II tüüpi IFN rolli SLE patogeneesis ja kliiniliste fenotüüpide puhul on vähe uuritud, kuid on leitud, et neeruhaaratusega SLE patsientidel esineb kõrgem IFN- γ kontsentratsioon vereplasmas võrreldes neeruhaaratuseta patsientide ja kontrollgrupiga (Bayoumy *et al.*, 2021; Oke *et al.*, 2019), mis võib viidata ka tugevamale II tüüpi ISG-de aktiivsusele neeruhaaratuse korral.

Peale I tüüpi IFN indutseeritud geenide düsregulatsiooni avastamist SLE patsientide patogeneesis on mitmed uuringud keskendunud I tüüpi IFN signatuuri ja haiguse aktiivsuse seoste leidmisele. Käesolevas töös võrreldi I ja II tüüpi IFN skooore kõrge ja madala SLEDAI aktiivsusega patsientide gruppides, et uurida, kas IFN skooridel on seos SLE haiguse aktiivsusega. Leiti, et esimese ajapunkti I ja II tüüpi IFN skooride seos SLEDAI aktiivsusega oli statistiliselt mitteoluline (vt Joonis 11), kuid teises ajapunktis esines I tüüpi IFN skoori puhul kõrgema ja madala haigusaktiivsuse grupi vahel statistiliselt oluline erinevus (vt Lisa 8). Tulemus näitas, et kõrgema haigusaktiivsusega grupis on ka kõrgem IFN skoor ning saadud tulemust toetavad ka varasemad leiud. Varasemad uuringud (Fu *et al.*, 2008; Mai *et al.*, 2021;

Weiden *et al.*, 2023) on leidnud IFN skoori ja SLEDAI vahel statistiliselt olulisi korrelatsioone. Erinevad I tüüpi IFN ja SLE aktiivsusele keskendunud uuringud on kasutanud SLEDAI ja I tüüpi IFN korrelatsioonide analüüsimiseks I tüüpi IFN aktiivsuse markereid, mistõttu on IFN skooriga uuringuid vähe. IFN aktiivsuse uuringud ennustavad kõrgema I tüüpi IFN signatuuri korral ka kõrgemat SLE haiguse aktiivsust tulevikus (Feng *et al.*, 2006; Merrill *et al.*, 2017; Miyachi *et al.*, 2023). II tüüpi IFN reguleeritud geenide ülesregulatsiooni ja II tüüpi IFN skoori on seostatud samuti kõrgema haigusaktiivsusega (Liu *et al.*, 2018; Siddiqi *et al.*, 2021). Sarnaselt käesoleva töö esimese ajapunkti tulemustega ei ole mitmed varasemalt teostatud uuringud leidnud statistiliselt olulisi tulemusi I ja II tüüpi IFN skoori ja SLEDAI väärtuste vahel (Harigai *et al.*, 2008; Northcott *et al.*, 2022; Tesser *et al.*, 2020). Kuigi IFN aktiivsust seostatakse suurenenud haiguse aktiivsusega SLE patsientide seas, ei pruugi seosed olla põhjuslikud. I tüüpi IFN ja SLEDAI seoste uuringud näitavad, et suurenenud IFN aktiivsus võib olla tulevikus potentsiaalseks haiguse aktiivsuse ennustajaks, kuid siiski pole ISG-de ekspressiooni seos haiguse aktiivsuse ja teiste SLE-d iseloomustavate tunnustega täielikult selge.

2.4.3. Uurimuse piirangud ja edasised uurimissuunad

Käesolev bakalaureusetöö lähtus SLE patogeneesimarkerite uurimisel I ja II tüüpi IFN skooridega, mida võrreldi patsientide ja kontrollide vahel ning lisaks ka kliiniliste andmetega. IFN skooride kasutamine SLE diagnoosimisel ning haiguse kirjeldamisel võib muutuda levinumaks parameetriks, kuna üha enam leitakse seoseid IFN skooride ning kliiniliste sümptomite vahel. Siiski esineb IFN skooride kasutamisel nii haiguse kliiniliste sümptomite kui ka aktiivsuse uurimises puudujääke. Näiteks puudub IFN skoori kvantifitseerimiseks ühtne ideaalne standard, mille kaudu skoori arvutada - käesoleval ajal kasutatakse erinevaid meetodeid ISG skooride arvutamiseks ning samuti võivad erinevad IFN skoorid sisaldada erinevat arvu gene, mida skoori iseloomustamiseks kasutatakse. Samuti ei ole kõigi SLE patogeneesiga seostatud ISG-de mehhanismid täielikult teada (Shen *et al.*, 2022).

Käesoleva töö puhul tuleb uurimistulemuste tõlgendamisel arvesse võtta erinevaid puudujääke. Esiteks olid analüüsitud patsiendid kaukaaslased, mistõttu ei pruugi tulemused olla kohaldatavad teiste etniliste gruppide puhul. Samuti on töös uuritud valim üsna väike, mistõttu võib see olla ka põhjuseks, miks kliiniliste sümptomite puhul statistiliselt olulisi seoseid eriti ei esine. Nagu eelnevalt mainitud, kasutatakse IFN skooride arvutamiseks väga varieeruvaid geenikomplekte ja ka skooride arvutusviise, mistõttu võivad tulemused võrreldes teiste

varasemate uurimistulemustega varieeruda. Seetõttu tasuks edasistes uuringutes katsetada veel erinevaid geenide komplekte skooride arvutamiseks, eelkõige just II tüüpi IFN skoori puhul. Tähelepanu tuleks pöörata võimalikult spetsiifilise ja täpse II tüüpi skoori leidmisele, kuna I ja II tüüpi IFN raja ekspresseeritavad geenid on suures osas kattuvad (Platanias *et al.*, 2005). Edasised uuringud võiksid keskenduda ka I ja II tüüpi IFN rolli uurimisele just erinevate kliiniliste sümptomite seisukohalt, et kirjeldada võimalikult spetsiifilisi IFN skooore, mis aitaks patsiente jaotada erinevatesse alagruppidesse, ennustada sümptomite ja haiguse aktiivsuse ägenemist ning tagada täpsemat ravi igale patsiendile. Käesoleva töö tulemuste põhjal tasuks teha edasisi uuringuid hüpokomplementeemia ja neeruhaaratuse puhul, kuna varasemad uuringud näitavad ebaühtlaseid tulemusi.

KOKKUVÕTE

I ja II tüüpi interferoonide rolli on kirjeldatud mitmete autoimmuunhaiguste patogeneesis ning nende üleliigne produktsioon on seotud mitmete kliiniliste sümptomite teketega, sh organite haaratusega. Käesolevas bakalaureusetöös keskenduti I ja II tüüpi interferoonide rollile süsteemse erütematoosse luupuse patsientide vererakkudes, kuna SLE patsientidel esineb ülemäärane I ja II tüüpi interferoonide produktsioon, mida seostatakse iseloomulike kliiniliste sümptomite tekke ja haiguse aktiivsuse kasvuga.

Käesoleva bakalaureusetöö raames hinnati, kuidas erinevad I ja II tüüpi IFN skoorid SLE patsientide ja kontrollgrupi vahel. Leiti, et I tüüpi IFN skoorid erinesid patsientide ja tervete kontrollide vahel oluliselt, mis näitab, et I tüüpi IFN skoor on märkimisväärselt kõrgem patsientide grupis. I ja II tüüpi interferoonide seost hinnati ka IFN- α , β ja γ kontsentratsioonidega ning leiti, et I tüüpi interferooni skoori suurenedes tõuseb IFN- α , IFN- β ja IFN- γ kontsentratsioon vereseerumis. Uurides II tüüpi interferooni skooride seotust erinevate IFN kontsentratsioonidega, leiti samuti, et II tüüpi interferooni skoori tõustes suureneb ka IFN- α ja IFN- γ kontsentratsioon vereseerumis. Saadud I ja II tüüpi IFN skooride seostati SLE patogeneesile iseloomulike kliiniliste sümptomitega, mille hulka valiti anti-dsDNA antikehade esinemine vereseerumis, hüpokomplementeemia, mis iseloomustab madalat C3 ja C4 komplemendi valkude taset seerumis ning neeruhaaratus. Antud töös leiti kliiniliste andmetega statistiliselt olulisi seoseid II tüüpi IFN skoori ja hüpokomplementeemia ning I tüüpi IFN skoori ja anti-dsDNA antikehade esinemise vahel. Neeruhaaratuse puhul olid tulemused I tüüpi IFN mediaani skoori korral gruppide vahel võrreldavad, kuid II tüüpi IFN skooride mediaan oli kõrgem patsientidel, kellel esines neeruhaaratus, olgugi, et tulemus ei olnud statistiliselt oluline, mis võib viidata II tüüpi IFN potentsiaalsele rollile luupusnefriidi kujunemisel. Haiguse aktiivsust ennustas statistiliselt oluliselt teise ajapunkti I tüüpi IFN skoor, mis näitab, et I tüüpi IFN skoor võib olla potentsiaalne haigusaktiivsuse ennustaja.

Bakalaureusetöö tulemused näitavad, et SLE patsientidel on I tüüpi IFN-id võrreldes tervete kontrollidega oluliselt kõrgemalt ekspresseerunud ning kõrgem ISG-de ekspressioon võib olla iseloomulik erinevate kliiniliste sümptomite tekkel ja ennustada SLE haiguse aktiivsust. Lähtuvalt käesoleva töö tulemustest tuleks edasistes uuringutes jätkata eelkõige II tüüpi IFN-ide mõju uurimist erinevate kliiniliste sümptomite, eelkõige neeruhaaratuse ja hüpokomplementeemia puhul.

The role of type I and II interferons in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus

Marcella Laura Polverino

SUMMARY

Interferons are cytokines involved in the regulation of the immune response. Interferons have mainly antiviral mechanisms, the production of which is mainly induced by microbial nucleic acids. The goal of interferon induction is to stimulate genes involved in the inhibition of viral replication. Dysregulation of type I and II interferons has been described in the pathogenesis of several autoimmune diseases and their overproduction is associated with the development of several clinical symptoms, including targeting several different body organs. This bachelor thesis focused on the role of type I and II interferons in the blood cells of patients with systemic lupus erythematosus, because SLE patients have an excessive production of type I and II interferons, which is associated with the development of clinical symptoms characteristic of SLE pathogenesis and an increase in disease activity.

The aim of this bachelor's thesis was to evaluate the differences in type I and II IFN scores between SLE patients and the control group. In this work we found that type I IFN scores differed between patients and healthy controls, indicating that type I IFN scores are significantly higher in the patients' group. The association of type I and II interferons with sera concentrations of IFN- α , β , and γ was also evaluated and it was found that as the score of type I interferon increases, the concentration of IFN- α , IFN- β , and IFN- γ also increases. The study also focused on the association of type II interferon scores with different IFN concentrations and found that as the type II interferon score increases, the concentration of IFN- α and IFN- γ in the blood serum also tends to increase. Differences between calculated type I and II IFN scores were associated with clinical symptoms characteristic of SLE pathogenesis, including the presence of anti-dsDNA antibodies in blood serum, hypocomplementemia, characterized by low levels of C3 and C4 complement proteins in serum, and renal involvement. In this work, statistically significant associations were found between type II IFN score and hypocomplementemia and type I IFN score and the presence of anti-dsDNA antibodies. For renal involvement, results were comparable between groups in case of type I IFN scores, but type II IFN scores were slightly higher in patients with renal involvement, although the result was not statistically significant, suggesting a potential role for type II IFN in the development of lupus nephritis. Disease activity was statistically significantly higher for the type I IFN score

at the second time point, indicating that the type I IFN score may be a potential predictor of disease activity.

The results of the bachelor's thesis show that type I IFNs are significantly more expressed in SLE patients compared to healthy controls and higher expression of ISGs can be characteristic to various clinical symptoms and predict SLE disease activity. Based on the results of this work, further studies should continue to investigate the effect of type II IFNs in various clinical symptoms, especially renal involvement and hypocomplementemia.

TÄNUSÕNAD

Soovin tänada käesoleva töö juhendajaid Liis Haljasmäge ja Kai Kisandit, kes tegid juhendamisel suurepäraseid töid. Eriti soovin tänada imetlusväärset juhendajat Liisi, kes katsete tegemisel ja töö kirjutamisel alati aitas ja väga põhjalikku tagasisidet andis. Samuti kaasjuhendajat Tõnis Orgi ning kõiki teisi uurimisgrupi liikmeid toetuse ja abi eest.

KIRJANDUSE LOETELU

A) Artiklid

- Andreakos, E., Zanoni, I., & Galani, I. E. (2019). Lambda interferons come to light: Dual function cytokines mediating antiviral immunity and damage control. *Current Opinion in Immunology*, *56*, 67–75.
- Baccala, R., Hoebe, K., Kono, D. H., Beutler, B., & Theofilopoulos, A. N. (2007). TLR-dependent and TLR-independent pathways of type I interferon induction in systemic autoimmunity. *Nature Medicine*, *13*(5), 543–551.
- Barkhouse, D. A., Garcia, S. A., Bongiorno, E. K., Lebrun, A., Faber, M., & Hooper, D. C. (2015). Expression of interferon gamma by a recombinant rabies virus strongly attenuates the pathogenicity of the virus via induction of type I interferon. *Journal of Virology*, *89*(1), 312–322.
- Barrat, F. J., Crow, M. K., & Ivashkiv, L. B. (2019). Interferon target-gene expression and epigenomic signatures in health and disease. *Nature Immunology*, *20*(12), 1574–1583.
- Barrat, F. J., Elkon, K. B., & Fitzgerald, K. A. (2016). Importance of nucleic acid recognition in inflammation and autoimmunity. *Annual Review of Medicine*, *67*, 323–336.
- Bayoumy, A. N., Shalaby, M., Eldahan, M., Abdelaziz, A., & Metwaly, I. (2021). Assessment of serum level of interferon gamma in patients of lupus nephritis and without nephritis. *Al-Azhar International Medical Journal*, *2*(1), 1–6.
- Berns, S. A., Isakova, J. A., & Pekhtereva, P. I. (2022). Therapeutic potential of interferon-gamma in tuberculosis. *ADMET and DMPK*, *10*(1), 63–73.
- Blanco, J. C., Contursi, C., Salkowski, C. A., DeWitt, D. L., Ozato, K., & Vogel, S. N. (2000). Interferon Regulatory Factor (Irf)-1 and Irf-2 Regulate Interferon γ -Dependent Cyclooxygenase 2 Expression. *The Journal of Experimental Medicine*, *191*(12), 2131–2144.
- Blasius, A. L., & Beutler, B. (2010). Intracellular toll-like receptors. *Immunity*, *32*(3), 305–315.

- Blomberg, J., Nived, O., Pipkorn, R., Bengtsson, A., Erlinge, D., & Sturfelt, G. (1994). Increased antiretroviral antibody reactivity in sera from a defined population of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*, *37*(1), 57–66.
- Bouts, Y. M., Wolthuis, D. F., Dirkx, M. F., Pieterse, E., Simons, E. M., Van Boekel, A. M., Dieker, J. W., & Van Der Vlag, J. (2012). Apoptosis and NET formation in the pathogenesis of SLE. *Autoimmunity*, *45*(8), 597–601.
- Burger, R. A., Torres, A. R., Warren, R. P., Caldwell, V. D., & Hughes, B. G. (1997). Echinacea-induced cytokine production by human macrophages. *International Journal of Immunopharmacology*, *19*(7), 371–379.
- Chang, C.-H., Fontes, J. D., Peterlin, M., & Flavell, R. A. (1994). Class II transactivator (CIITA) is sufficient for the inducible expression of major histocompatibility complex class II genes. *The Journal of Experimental Medicine*, *180*(4), 1367–1374.
- Chiche, L., Jourde-Chiche, N., Pascual, V., & Chaussabel, D. (2013). Current perspectives on systems immunology approaches to rheumatic diseases. *Arthritis Rheum*, *65*(1407), 17.
- Choubey, D., & Moudgil, K. D. (2011). Interferons in autoimmune and inflammatory diseases: Regulation and roles. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, *31*(12), 857–865.
- Cojocaru, M., Cojocaru, I. M., Silosi, I., & Vrabie, C. D. (2011). Manifestations of systemic lupus erythematosus. *Maedica*, *6*(4), 330.
- Cole, J. L. (2007). Activation of PKR: an open and shut case? *Trends in Biochemical Sciences*, *32*(2), 57–62.
- Cooper, G. S., & Parks, C. G. (2004). Occupational and environmental exposures as risk factors for systemic lupus erythematosus. *Current Rheumatology Reports*, *6*(5), 367–374.
- Crowe, W., Allsopp, P. J., Watson, G. E., Magee, P. J., Strain, J., Armstrong, D. J., Ball, E., & McSorley, E. M. (2017). Mercury as an environmental stimulus in the development of autoimmunity—a systematic review. *Autoimmunity Reviews*, *16*(1), 72–80.

- Crowl, J. T., Gray, E. E., Pestal, K., Volkman, H. E., & Stetson, D. B. (2017). Intracellular nucleic acid detection in autoimmunity. *Annual Review of Immunology*, *35*, 313–336.
- Der, S. D., Zhou, A., Williams, B. R., & Silverman, R. H. (1998). Identification of genes differentially regulated by interferon α , β , or γ using oligonucleotide arrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *95*(26), 15623–15628.
- Drappier, M., & Michiels, T. (2015). Inhibition of the OAS/RNase L pathway by viruses. *Current Opinion in Virology*, *15*, 19–26.
- Ede, K., Hwang, K.-K., Wu, C.-C., Wu, M., Yang, Y.-H., Lin, W.-S., Chien, D., Chen, P.-C., Tsao, B. P., McCurdy, D. K., & others. (2009). Plasmin immunization preferentially induces IgG-anticardiolipin antibodies that are potentially prothrombotic in MRL/MpJ mice. *Arthritis and Rheumatism*, *60*(10), 3108.
- Elkon, K. B., & Stone, V. V. (2011). Type I interferon and systemic lupus erythematosus. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, *31*(11), 803–812.
- El-Sherbiny, Y., Psarras, A., Md Yusof, M., Hensor, E., Tooze, R., Doody, G., Mohamed, A. A., McGonagle, D., Wittmann, M., Emery, P., & others. (2018). A novel two-score system for interferon status segregates autoimmune diseases and correlates with clinical features. *Scientific Reports*, *8*(1), 5793.
- Em, T. (1982). The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.*, *25*, 1271–1277.
- England, N. (2023). Clinical Commissioning Policy Rituximab for refractory Systemic Lupus Erythematosus (SLE) in adults and post-pubescent children [200402P]. Commissioning Position July 2020 [Internet]. URL: [https://www.England.Nhs.Uk/Publication/Rituximab-for-Refractory-Systemic-Lupus-Erythematosus-Sle-in-Adultsand-Post-Pubescent-Children](https://www.england.nhs.uk/publication/rituximab-for-refractory-systemic-lupus-erythematosus-sle-in-adults-and-post-pubescent-children).
- Feng, X., Wu, H., Grossman, J. M., Hanvivadhanakul, P., FitzGerald, J. D., Park, G. S., Dong, X., Chen, W., Kim, M. H., Weng, H. H., & others. (2006a). Association of increased

- interferon-inducible gene expression with disease activity and lupus nephritis in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism*, 54(9), 2951–2962.
- Fernandez-Ruiz, R., & Niewold, T. B. (2022). Type I interferons in autoimmunity. *Journal of Investigative Dermatology*, 142(3), 793–803.
- Fischer-Betz, R., Herzer, P., & Schneider, M. (2005). Systemischer Lupus erythematosus. *DMW-Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 130(43), 2451–2458.
- Fu, Q., Chen, X., Cui, H., Guo, Y., Chen, J., Shen, N., & Bao, C. (2008). Association of elevated transcript levels of interferon-inducible chemokines with disease activity and organ damage in systemic lupus erythematosus patients. *Arthritis Research & Therapy*, 10, 1–10.
- Fu, S. M., Dai, C., Zhao, Z., & Gaskin, F. (2015). Anti-dsDNA Antibodies are one of the many autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *F1000Research*, 4(F1000 Faculty Rev).
- Gauthier, A. E., Rotjan, R. D., & Kagan, J. C. (2022). Lipopolysaccharide detection by the innate immune system may be an uncommon defence strategy used in nature. *Open Biology*, 12(10), 220146.
- Gelinas, J.-F., Gill, D. R., & Hyde, S. C. (2018). Multiple inhibitory factors act in the late phase of HIV-1 replication: A systematic review of the literature. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 82(1), 10–1128.
- Generali, E., Ceribelli, A., Stazi, M. A., & Selmi, C. (2017). Lessons learned from twins in autoimmune and chronic inflammatory diseases. *Journal of Autoimmunity*, 83, 51–61.
- Ghodke-Puranik, Y., & Niewold, T. B. (2015). Immunogenetics of systemic lupus erythematosus: A comprehensive review. *Journal of Autoimmunity*, 64, 125–136.
- Gołab, J., Zagożdżon, R., Stokłosal, T., Kamiński, R., Kozar, K., & Jakóbsiak, M. (2000). Direct stimulation of macrophages by IL-12 and IL-18—A bridge too far? *Immunology Letters*, 72(3), 153–157.

- Gordon, M. A., Jack, D. L., Dockrell, D. H., Lee, M. E., & Read, R. C. (2005). Gamma interferon enhances internalization and early nonoxidative killing of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by human macrophages and modifies cytokine responses. *Infection and Immunity*, *73*(6), Article 6.
- Gross, J. A., Johnston, J., Mudri, S., Enselman, R., Dillon, S. R., Madden, K., Xu, W., Parrish-Novak, J., Foster, D., Lofton-Day, C., & others. (2000). TACI and BCMA are receptors for a TNF homologue implicated in B-cell autoimmune disease. *Nature*, *404*(6781), 995–999.
- Hakim, A., Fürnrohr, B. G., Amann, K., Laube, B., Abed, U. A., Brinkmann, V., Herrmann, M., Voll, R. E., & Zychlinsky, A. (2010). Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(21), 9813–9818.
- Harigai, M., Kawamoto, M., Hara, M., Kubota, T., Kamatani, N., & Miyasaka, N. (2008). Excessive production of IFN- γ in patients with systemic lupus erythematosus and its contribution to induction of B lymphocyte stimulator/B cell-activating factor/TNF ligand superfamily-13B. *The Journal of Immunology*, *181*(3), 2211–2219.
- Hiraki, L. T., Benseler, S. M., Tyrrell, P. N., Hebert, D., Harvey, E., & Silverman, E. D. (2008). Clinical and laboratory characteristics and long-term outcome of pediatric systemic lupus erythematosus: A longitudinal study. *The Journal of Pediatrics*, *152*(4), 550–556.
- Hochberg, M. C. (1997). Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis and Rheumatism*, *40*(9), 1725–1725.
- Horisberger, M., Staeheli, P., & Haller, O. (1983). Interferon induces a unique protein in mouse cells bearing a gene for resistance to influenza virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *80*(7), 1910–1914.

- Jang, J.-S., Lee, J.-H., Jung, N.-C., Choi, S.-Y., Park, S.-Y., Yoo, J.-Y., Song, J.-Y., Seo, H. G., Lee, H. S., & Lim, D.-S. (2018). Rsad2 is necessary for mouse dendritic cell maturation via the IRF7-mediated signaling pathway. *Cell Death & Disease*, 9(8), 823.
- JC, C. (2010). Pathogenesis of human systemic lupus erythematosus: Recent advances. *Trends Mol Med*, 16, 47–57.
- Kak, G., Raza, M., & Tiwari, B. K. (2018). Interferon-gamma (IFN- γ): Exploring its implications in infectious diseases. *Biomolecular Concepts*, 9(1), 64–79.
- Kanda, N., Shimizu, T., Tada, Y., & Watanabe, S. (2007). IL-18 enhances IFN- γ -induced production of CXCL9, CXCL10, and CXCL11 in human keratinocytes. *European Journal of Immunology*, 37(2), 338–350.
- Kane, M., Yadav, S. S., Bitzegeio, J., Kutluay, S. B., Zang, T., Wilson, S. J., Schoggins, J. W., Rice, C. M., Yamashita, M., Hatzioannou, T., & others. (2013). MX2 is an interferon-induced inhibitor of HIV-1 infection. *Nature*, 502(7472), 563–566.
- Kang, R., & Tang, D. (2012). PKR-dependent inflammatory signals. *Science Signaling*, 5(247), pe47–pe47.
- Katarzyna, P.-B., Wiktor, S., & Ewa, D. (2023). Current treatment of systemic lupus erythematosus: A clinician's perspective. *Rheumatology International*, 43(8), 1395–1407.
- Kim, T., Kanayama, Y., Negoro, N., Okamura, M., Takeda, T., & Inoue, T. (1987). Serum levels of interferons in patients with systemic lupus erythematosus. *Clinical and Experimental Immunology*, 70(3), 562.
- Kirou, K. A., Lee, C., George, S., Louca, K., Peterson, M. G., & Crow, M. K. (2005). Activation of the interferon- α pathway identifies a subgroup of systemic lupus erythematosus patients with distinct serologic features and active disease. *Arthritis & Rheumatism*, 52(5), 1491–1503.

- Kline, J. N., & Kitagaki, K. (2006). INTERFERONS. In G. J. Laurent & S. D. Shapiro (Eds.), *Encyclopedia of Respiratory Medicine* (pp. 346–350). Academic Press.
<https://doi.org/10.1016/B0-12-370879-6/00190-3>
- Korant, B., Blomstrom, D. C., Jonak, G. J., & Knight Jr, E. (1984). Interferon-induced proteins. Purification and characterization of a 15,000-dalton protein from human and bovine cells induced by interferon. *Journal of Biological Chemistry*, *259*(23), 14835–14839.
- Krug, R. M., Shaw, M., Broni, B., Shapiro, G., & Haller, O. (1985). Inhibition of influenza viral mRNA synthesis in cells expressing the interferon-induced Mx gene product. *Journal of Virology*, *56*(1), 201–206.
- Lambers, W. M., de Leeuw, K., Doornbos-van Der Meer, B., Diercks, G. F., Bootsma, H., & Westra, J. (2019). Interferon score is increased in incomplete systemic lupus erythematosus and correlates with myxovirus-resistance protein A in blood and skin. *Arthritis Research & Therapy*, *21*(1), 260.
- Larner, A., Chaudhuri, A., & Darnell Jr, J. (1986). Transcriptional induction by interferon. New protein (s) determine the extent and length of the induction. *Journal of Biological Chemistry*, *261*(1), 453–459.
- Larner, A., Jonak, G., Cheng, Y., Korant, B., Knight, E., & Darnell Jr, J. (1984). Transcriptional induction of two genes in human cells by beta interferon. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *81*(21), 6733–6737.
- Lazear, H. M., Daniels, B. P., Pinto, A. K., Huang, A. C., Vick, S. C., Doyle, S. E., Gale Jr, M., Klein, R. S., & Diamond, M. S. (2015). Interferon- λ restricts West Nile virus neuroinvasion by tightening the blood-brain barrier. *Science Translational Medicine*, *7*(284), 284ra59-284ra59.
- Lazear, H. M., Schoggins, J. W., & Diamond, M. S. (2019). Shared and distinct functions of type I and type III interferons. *Immunity*, *50*(4), 907–923.

- Lee, A. J., & Ashkar, A. A. (2018). The dual nature of type I and type II interferons. *Frontiers in Immunology*, 2061.
- Lee, E. Y., Lee, Z.-H., & Song, Y. W. (2009). CXCL10 and autoimmune diseases. *Autoimmunity Reviews*, 8(5), 379–383.
- Levy, D., Lew, D., Decker, T., Kessler, D., & Darnell Jr, J. (1990). Synergistic interaction between interferon-alpha and interferon-gamma through induced synthesis of one subunit of the transcription factor ISGF3. *The EMBO Journal*, 9(4), 1105–1111.
- Lin, R., Heylbroeck, C., Pitha, P. M., & Hiscott, J. (1998). Virus-dependent phosphorylation of the IRF-3 transcription factor regulates nuclear translocation, transactivation potential, and proteasome-mediated degradation. *Molecular and Cellular Biology*.
- Liu, M., Liu, J., Hao, S., Wu, P., Zhang, X., Xiao, Y., Jiang, G., & Huang, X. (2018). Higher activation of the interferon-gamma signaling pathway in systemic lupus erythematosus patients with a high type I IFN score: Relation to disease activity. *Clinical Rheumatology*, 37, 2675–2684.
- Liu, S.-Y., Sanchez, D. J., Aliyari, R., Lu, S., & Cheng, G. (2012). Systematic identification of type I and type II interferon-induced antiviral factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(11), 4239–4244.
- Liu, W., & Wang, J. (2022). IFN- γ , should not be ignored in SLE. *Frontiers in Immunology*, 13, 954706.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25(4), 402–408.
- Luo, S., Wu, R., Li, Q., Zhang, G., & others. (2022). Epigenetic regulation of IFI44L expression in monocytes affects the functions of monocyte-derived dendritic cells in systemic lupus erythematosus. *Journal of Immunology Research*, 2022.
- Mai, L., Asaduzzaman, A., Noamani, B., Fortin, P. R., Gladman, D. D., Touma, Z., Urowitz, M. B., & Wither, J. (2021). The baseline interferon signature predicts disease severity over

- the subsequent 5 years in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Research & Therapy*, 23, 1–9.
- Manivasagam, S., & Klein, R. S. (2021). Type III interferons: Emerging roles in autoimmunity. *Frontiers in Immunology*, 12, 764062.
- Marshak-Rothstein, A. (2006). Toll-like receptors in systemic autoimmune disease. *Nature Reviews Immunology*, 6(11), 823–835.
- Mee, J. B., Johnson, C. M., Morar, N., Burslem, F., & Groves, R. W. (2007). The psoriatic transcriptome closely resembles that induced by interleukin-1 in cultured keratinocytes: Dominance of innate immune responses in psoriasis. *The American Journal of Pathology*, 171(1), 32–42.
- Merrill, J. T., Furie, R., Werth, V. P., Khamashta, M., Drappa, J., Wang, L., Illei, G., & Tummala, R. (2018). Anifrolumab effects on rash and arthritis: Impact of the type I interferon gene signature in the phase IIb MUSE study in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus Science & Medicine*, 5(1), e000284.
- Merrill, J. T., Immermann, F., Whitley, M., Zhou, T., Hill, A., O’Toole, M., Reddy, P., Honczarenko, M., Thanou, A., Rawdon, J., & others. (2017). The biomarkers of lupus disease study: A bold approach may mitigate interference of background immunosuppressants in clinical trials. *Arthritis & Rheumatology*, 69(6), 1257–1266.
- Mertowska, P., Smolak, K., Mertowski, S., & Grywalska, E. (2023). Immunomodulatory role of interferons in viral and bacterial infections. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(12), 10115.
- Miyachi, K., Iwamoto, T., Kojima, S., Ida, T., Suzuki, J., Yamamoto, T., Mimura, N., Sugiyama, T., Tanaka, S., Furuta, S., & others. (2023). Relationship of systemic type I interferon activity with clinical phenotypes, disease activity, and damage accrual in systemic lupus erythematosus in treatment-naïve patients: A retrospective longitudinal analysis. *Arthritis Research & Therapy*, 25(1), 26.

- Northcott, M., Jones, S., Koelmeyer, R., Bonin, J., Vincent, F., Kandane-Rathnayake, R., Hoi, A., & Morand, E. (2022). Type 1 interferon status in systemic lupus erythematosus: A longitudinal analysis. *Lupus Science & Medicine*, *9*(1), e000625.
- Oke, V., Gunnarsson, I., Dorschner, J., Eketjäll, S., Zickert, A., Niewold, T. B., & Svenungsson, E. (2019). High levels of circulating interferons type I, type II and type III associate with distinct clinical features of active systemic lupus erythematosus. *Arthritis Research & Therapy*, *21*, 1–11.
- Palli, E., Kravvariti, E., & Tektonidou, M. G. (2019). Type I interferon signature in primary antiphospholipid syndrome: Clinical and laboratory associations. *Frontiers in Immunology*, *10*, 430220.
- Pascual, V., Chaussabel, D., & Banchereau, J. (2009). A genomic approach to human autoimmune diseases. *Annual Review of Immunology*, *28*, 535–571.
- Pavlovic, M., Kats, A., Cavallo, M., Chen, R., Hartmann, J. X., Shoenfeld, Y., & others. (2010). Pathogenic and epiphenomenal anti-DNA antibodies in SLE. *Autoimmune Diseases*, *2010*.
- Perng, Y.-C., & Lenschow, D. J. (2018). ISG15 in antiviral immunity and beyond. *Nature Reviews Microbiology*, *16*(7), 423–439.
- Pestka, S., Krause, C. D., & Walter, M. R. (2004). Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunological Reviews*, *202*(1), 8–32.
- Petri, M. (2002). Epidemiology of systemic lupus erythematosus. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, *16*(5), 847–858.
- Petri, M., & Allbritton, J. (1992). Antibiotic allergy in systemic lupus erythematosus: A case-control study. *The Journal of Rheumatology*, *19*(2), 265–269.
- Platanias, L. C. (2005). Mechanisms of type-I-and type-II-interferon-mediated signalling. *Nature Reviews Immunology*, *5*(5), 375–386.

- Ramsey-Goldman, R., Li, J., Dervieux, T., & Alexander, R. V. (2017). Cell-bound complement activation products in SLE. *Lupus Science & Medicine*, 4(1), e000236.
- Rao, X., Huang, X., Zhou, Z., & Lin, X. (2013). An improvement of the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostatistics, Bioinformatics and Biomathematics*, 3(3), 71.
- Reizis, B. (2019). Plasmacytoid dendritic cells: Development, regulation, and function. *Immunity*, 50(1), 37–50.
- Riggs, J. M., Hanna, R. N., Rajan, B., Zerrouki, K., Karnell, J. L., Sagar, D., Vainshtein, I., Farmer, E., Rosenthal, K., Morehouse, C., & others. (2018). Characterisation of anifrolumab, a fully human anti-interferon receptor antagonist antibody for the treatment of systemic lupus erythematosus. *Lupus Science & Medicine*, 5(1), e000261.
- Rivera-Serrano, E. E., Gizzi, A. S., Arnold, J. J., Grove, T. L., Almo, S. C., & Cameron, C. E. (2020). Viperin reveals its true function. *Annual Review of Virology*, 7, 421–446.
- Roberts, A. L., Malspeis, S., Kubzansky, L. D., Feldman, C. H., Chang, S.-C., Koenen, K. C., & Costenbader, K. H. (2017). Association of trauma and posttraumatic stress disorder with incident systemic lupus erythematosus in a longitudinal cohort of women. *Arthritis & Rheumatology*, 69(11), 2162–2169.
- Rönblom, L., & Leonard, D. (2019). Interferon pathway in SLE: one key to unlocking the mystery of the disease. *Lupus Science & Medicine*, 6(1), e000270.
- Rothfuchs, A. G., Trumstedt, C., Wigzell, H., & Rottenberg, M. E. (2004). Intracellular bacterial infection-induced IFN- γ is critically but not solely dependent on Toll-like receptor 4-myeloid differentiation factor 88-IFN- α -STAT1 signaling. *The Journal of Immunology*, 172(10), 6345–6353.
- Rubinstein, M. (1987). Multiple interferon subtypes: The phenomenon and its relevance. *Journal of Interferon Research*, 7(5), 545–551.

- Sancho-Shimizu, V., de Diego, R. P., Jouanguy, E., Zhang, S.-Y., & Casanova, J.-L. (2011). Inborn errors of anti-viral interferon immunity in humans. *Current Opinion in Virology*, *1*(6), 487–496.
- Sanda, C., Weitzel, P., Tsukahara, T., Schaley, J., Edenberg, H. J., Stephens, M. A., McClintick, J. N., Blatt, L. M., Li, L., Brodsky, L., & others. (2006). Differential gene induction by type I and type II interferons and their combination. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, *26*(7), 462–472.
- Sarkar, M. H., Yagi, R., Endo, Y., Koyama-Nasu, R., Wang, Y., Hasegawa, I., Ito, T., Junttila, I. S., Zhu, J., Kimura, M. Y., & others. (2021). IFN γ suppresses the expression of GF11 and thereby inhibits Th2 cell proliferation. *Plos One*, *16*(11), e0260204.
- Sarkar, M. K., Hile, G. A., Tsoi, L. C., Xing, X., Liu, J., Liang, Y., Berthier, C. C., Swindell, W. R., Patrick, M. T., Shao, S., & others. (2018). Photosensitivity and type I IFN responses in cutaneous lupus are driven by epidermal-derived interferon kappa. *Annals of the Rheumatic Diseases*, *77*(11), 1653–1664.
- Schneider, W. M., Chevillotte, M. D., & Rice, C. M. (2014). Interferon-stimulated genes: A complex web of host defenses. *Annual Review of Immunology*, *32*, 513–545.
- Schoggins, J. W. (2014). Interferon-stimulated genes: Roles in viral pathogenesis. *Current Opinion in Virology*, *6*, 40–46.
- Schoggins, J. W. (2019). Interferon-stimulated genes: What do they all do? *Annual Review of Virology*, *6*, 567–584.
- Schroder, K., Hertzog, P., Ravasi, T., & Hume, D. (2004). Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA Interferon-: An overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* *75*: 163-189. *Journal of Leukocyte Biology*, *75*, 163–189. <https://doi.org/10.1189/jlb.0603252>

- Shen, M., Duan, C., Xie, C., Wang, H., Li, Z., Li, B., & Wang, T. (2022). Identification of key interferon-stimulated genes for indicating the condition of patients with systemic lupus erythematosus. *Frontiers in Immunology*, *13*, 962393.
- Siddiqi, K. Z., Wilhelm, T. R., Ulf-Møller, C. J., & Jacobsen, S. (2021). Cluster of highly expressed interferon-stimulated genes associate more with African ancestry than disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. A systematic review of cross-sectional studies. *Translational Research*, *238*, 63–75.
- Sim, T. M., Ong, S. J., Mak, A., & Tay, S. H. (2022). Type I interferons in systemic lupus erythematosus: A journey from bench to bedside. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(5), 2505.
- Sommereyns, C., Paul, S., Staeheli, P., & Michiels, T. (2008). IFN-lambda (IFN- λ) is expressed in a tissue-dependent fashion and primarily acts on epithelial cells in vivo. *PLoS Pathogens*, *4*(3), e1000017.
- Song, H., Fang, F., Tomasson, G., Arnberg, F. K., Mataix-Cols, D., de la Cruz, L. F., Almqvist, C., Fall, K., & Valdimarsdóttir, U. A. (2018). Association of stress-related disorders with subsequent autoimmune disease. *Jama*, *319*(23), 2388–2400.
- Spelman, K., Burns, J., Nichols, D., Winters, N., Ottersberg, S., Tenborg, M., & others. (2006). Modulation of cytokine expression by traditional medicines: A review of herbal immunomodulators. *Alternative Medicine Review*, *11*(2), 128.
- Stark, G. R., & Darnell, J. E. (2012). The JAK-STAT pathway at twenty. *Immunity*, *36*(4), 503–514.
- Steen, H. C., & Gamero, A. M. (2013). STAT2 phosphorylation and signaling. *Jak-Stat*, *2*(4), e25790.
- Świątek, B., Januszkiewicz, D., Rembowska, J., Bereszyńska, I., Kowala-Piaskowska, A., Mozer-Lisewska, I., Wysocki, J., & Nowak, J. (2014). Expression of Mx1, OAS1, PKR

- (EIF2AK2) and TP53 genes during treatment of chronic HCV patients. *International Journal of Infectious Diseases*, 21, 313.
- Taylor, M. W. (2014). Interferons. In *Viruses and Man: A History of Interactions* (pp. 101–119). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-07758-1_7
- Taylor, M. W., & Taylor, M. W. (2014). Interferons. *Viruses and Man: A History of Interactions*, 101–119.
- Tesser, A., de Carvalho, L. M., Sandrin-Garcia, P., Pin, A., Pastore, S., Taddio, A., Roberti, L. R., de Paula Queiroz, R. G., Ferriani, V. P. L., Crovella, S., & others. (2020). Higher interferon score and normal complement levels may identify a distinct clinical subset in children with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Research & Therapy*, 22, 1–12.
- Tough, D. F. (2004). Type I interferon as a link between innate and adaptive immunity through dendritic cell stimulation. *Leukemia & Lymphoma*, 45(2), 257–264.
- Tsokos, G. C., & Kammer, G. M. (2000). Molecular aberrations in human systemic lupus erythematosus. *Molecular Medicine Today*, 6(11), 418–424.
- Tsokos, G. C., Lo, M. S., Reis, P. C., & Sullivan, K. E. (2016). New insights into the immunopathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Nature Reviews Rheumatology*, 12(12), 716–730.
- Verhelst, J., Parthoens, E., Schepens, B., Fiers, W., & Saelens, X. (2012). Interferon-inducible protein Mx1 inhibits influenza virus by interfering with functional viral ribonucleoprotein complex assembly. *Journal of Virology*, 86(24), 13445–13455.
- Wallace, D. J., & Gladman, D. D. (2020). Clinical manifestations and diagnosis of systemic lupus erythematosus in adults. *UpToDate*. Waltham.
- Wang, Y.-X., Niklasch, M., Liu, T., Wang, Y., Shi, B., Yuan, W., Baumert, T. F., Yuan, Z., Tong, S., Nassal, M., & others. (2020). Interferon-inducible MX2 is a host restriction factor of hepatitis B virus replication. *Journal of Hepatology*, 72(5), 865–876.

- Weiden, C., Saers, M., Schwarz, T., Hinze, T., Wittkowski, H., Kessel, C., Masjosthusmann, K., Mohr, M., Evers, G., Oesingmann-Weirich, S., & others. (2023). Type 1 Interferon-Stimulated Gene Expression and Disease Activity in Pediatric Rheumatic Diseases: No Composite Scores Needed? *ACR Open Rheumatology*, *5*(12), 652–662.
- Wells, A. I., & Coyne, C. B. (2018). Type III interferons in antiviral defenses at barrier surfaces. *Trends in Immunology*, *39*(10), 848–858.
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, *13*, 1–11.
- Yu, H., Nagafuchi, Y., & Fujio, K. (2021). Clinical and immunological biomarkers for systemic lupus erythematosus. *Biomolecules*, *11*(7), 928.
- Yu, L., & Liu, P. (2021). Cytosolic DNA sensing by cGAS: regulation, function, and human diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *6*(1), 170.
- Zahn, S., Rehkämper, C., Kümmerer, B. M., Ferring-Schmidt, S., Bieber, T., Tüting, T., & Wenzel, J. (2011). Evidence for a pathophysiological role of keratinocyte-derived type III interferon (IFN λ) in cutaneous lupus erythematosus. *Journal of Investigative Dermatology*, *131*(1), 133–140.
- Zhao, X., Li, J., Winkler, C. A., An, P., & Guo, J.-T. (2019). IFITM genes, variants, and their roles in the control and pathogenesis of viral infections. *Frontiers in Microbiology*, *9*, 3228.
- Zhu, H., Zheng, J., Zhou, Y., Wu, T., & Zhu, T. (2021). Knockdown of RSAD2 attenuates B cell hyperactivity in patients with primary Sjögren's syndrome (pSS) via suppressing NF- κ b signaling pathway. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *476*, 2029–2037.

B) Raamat

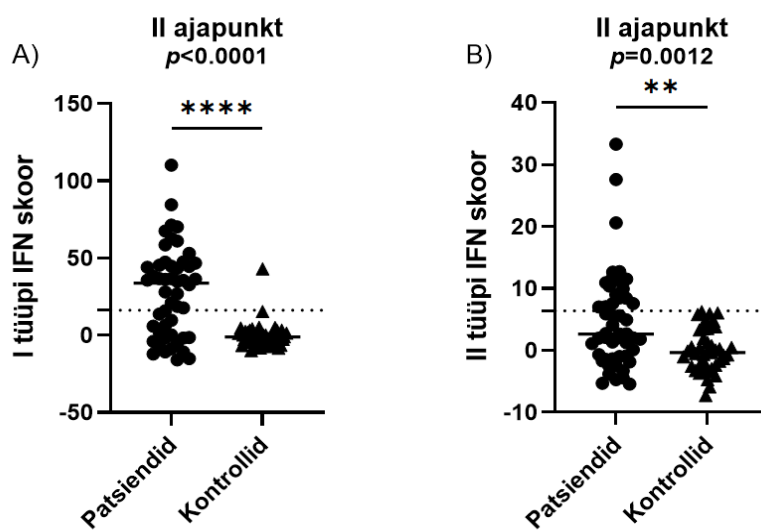
Uibo, R., Kisand, K., Peterson, P., Reimand, K. (2015). *Immunoloogia*. Tartu: Tartu Ülikooli Kirjastus

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

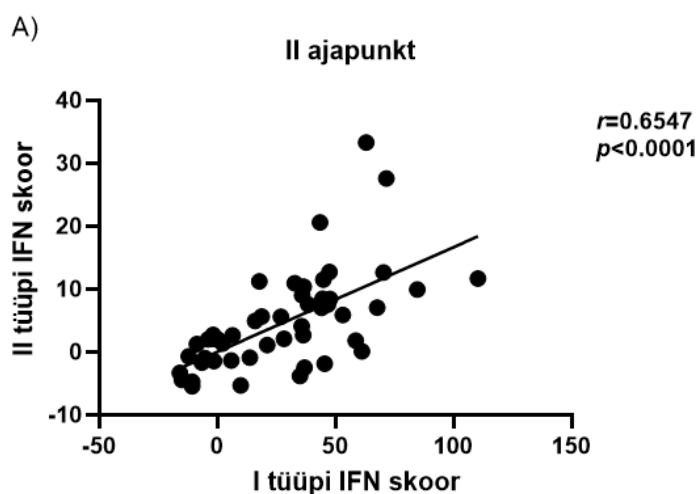
1. <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/lupus/diagnosis-treatment/drc-20365790> (21.01.2024)
2. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10298684/> (01.04.2024 kell 14:05)
3. https://www.physio-pedia.com/Systemic_Lupus_Erythematosus (05.01.2024 kell 10:00)
4. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352396421004357> (22.02.2024 kell 17:13)

LISAD

Lisa 1. I ja II tüüpi IFN skooride võrdlus patsientide ja kontrollgrupi vahel. Patsientide ja kontrollgrupi vaheline erinevus on arvatud mitteparameetrilise Mann-Whitney U-testiga, kus * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ ja **** $p \leq 0,0001$.

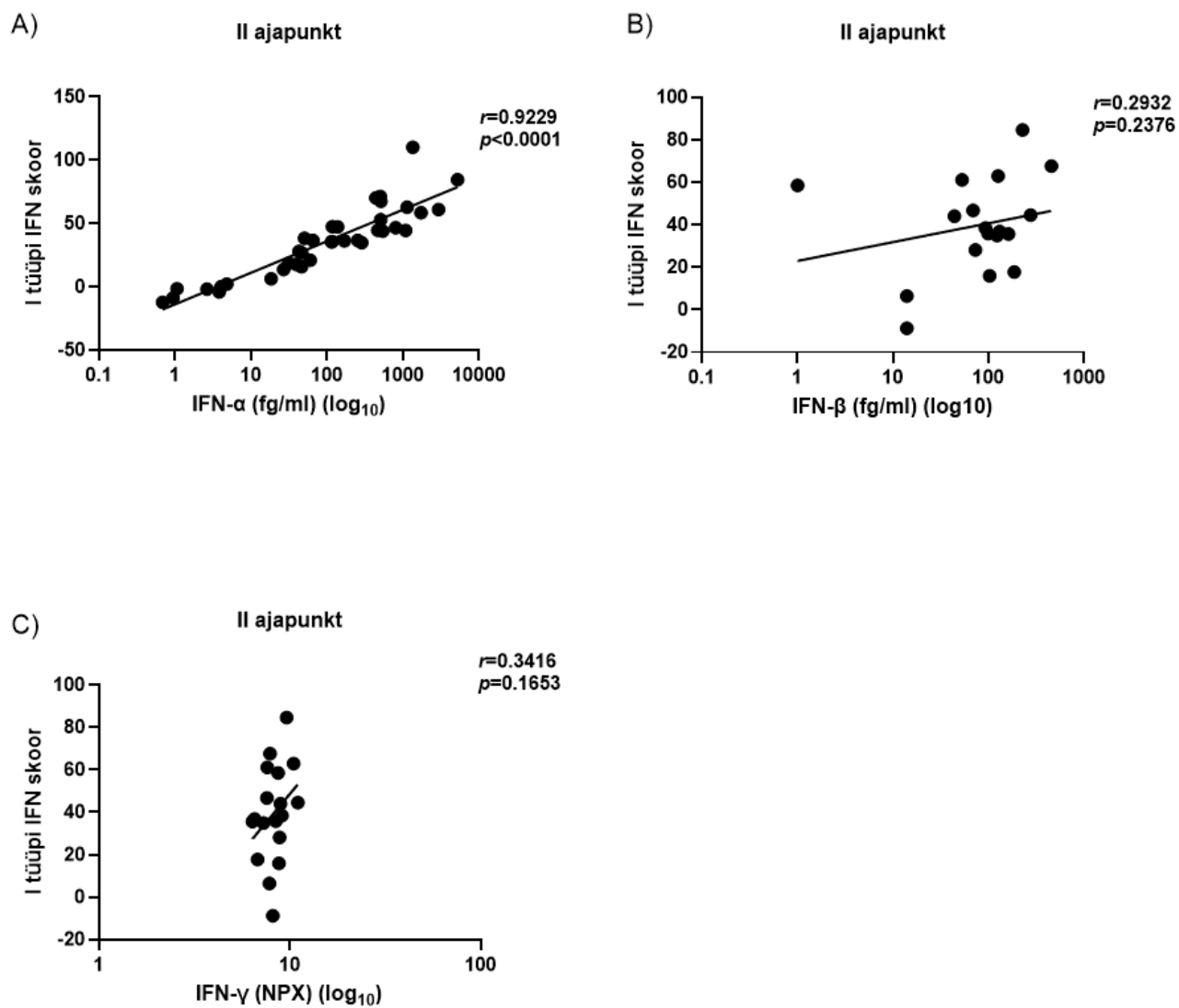


Lisa 2. I ja II tüüpi IFN skooride korrelatsioon patsientide teise ajapunkti seas. Arvutamiseks kasutati Spearmani korrelatsiooni. Statistiliselt oluliseks loeti $p < 0.05$.



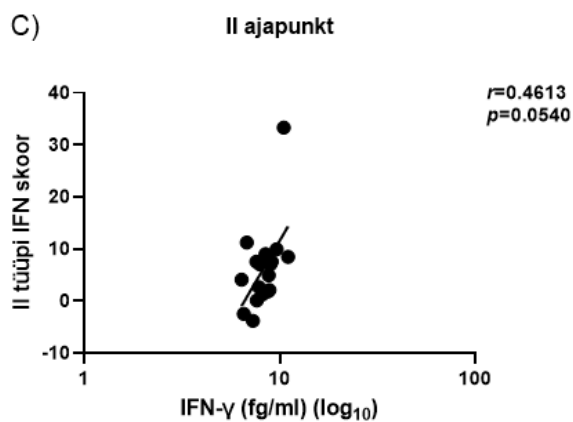
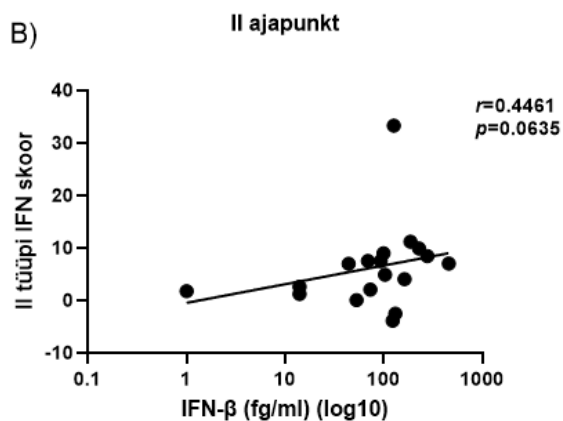
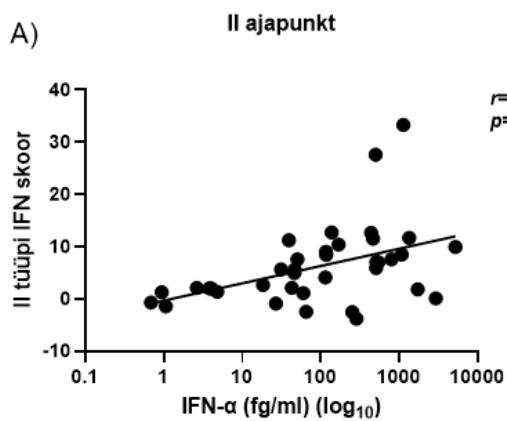
Lisa 3. Teise ajapunkti I tüüpi IFN skooride korrelatsioonid kontsentratsioonidega.

Arvutamiseks kasutati Spearmani korrelatsiooni. Statistiliselt oluliseks loeti $p < 0.05$.

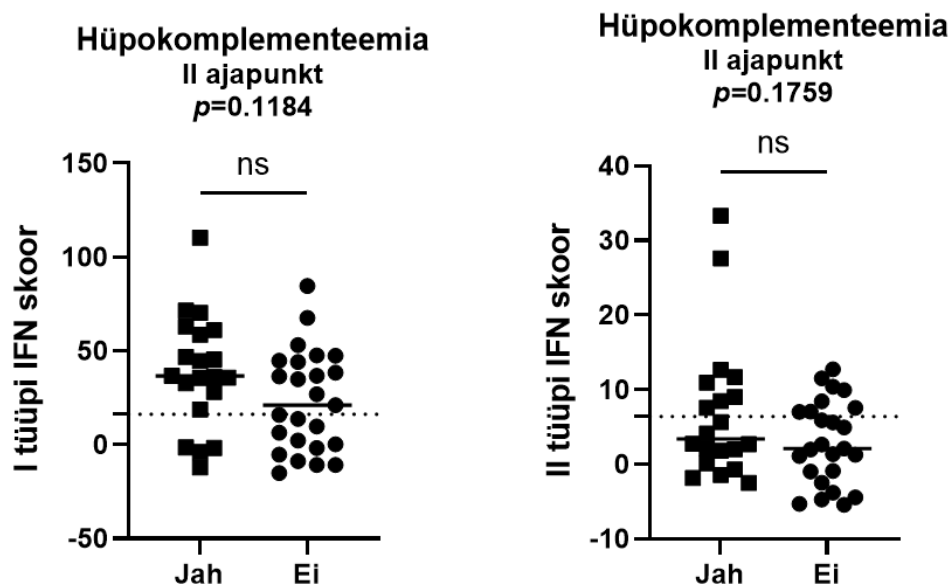


Lisa 4. Teise ajapunkti II tüüpi IFN skooride korrelatsioonid kontsentratsioonidega.

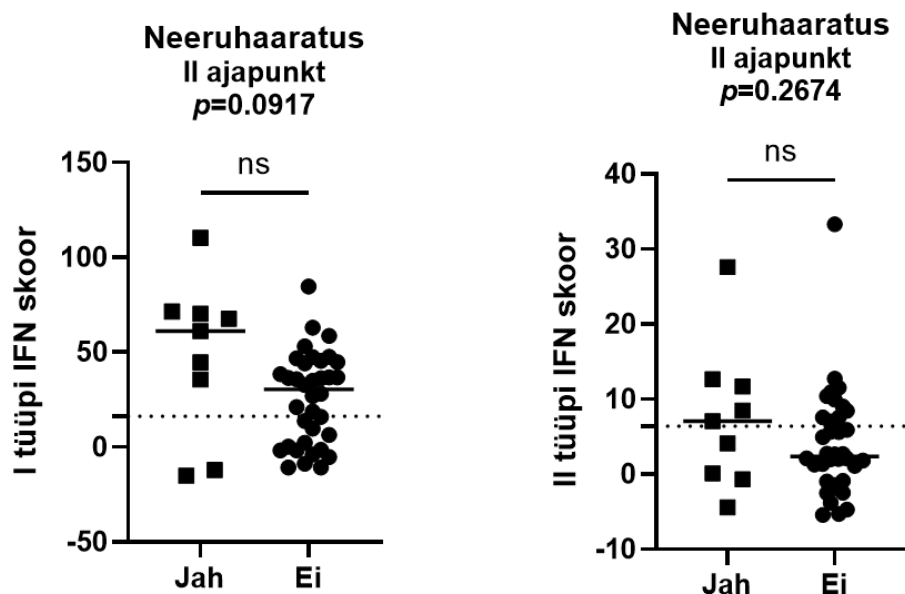
Arvutamiseks kasutati Spearmani korrelatsiooni. Statistiliselt oluliseks loeti $p < 0.05$.



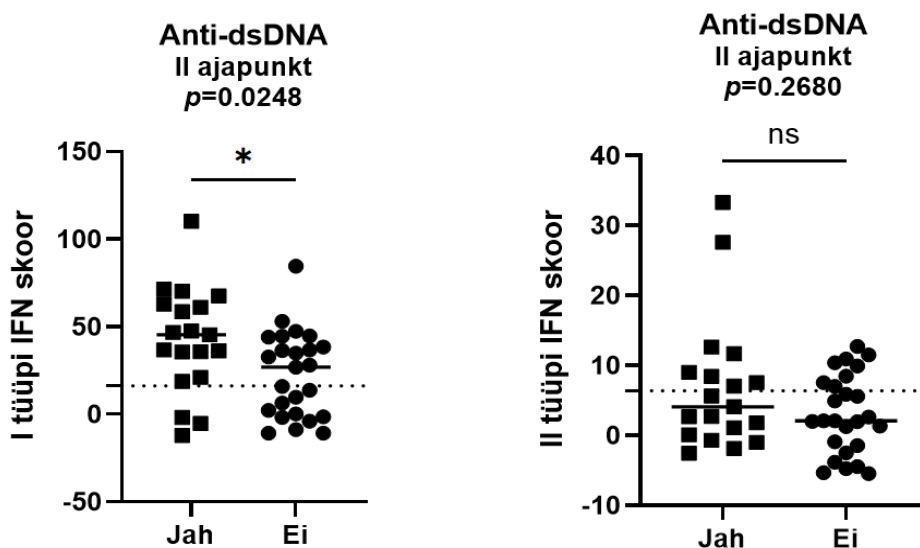
Lisa 5. I ja II tüüpi IFN skoori võrdlus hüpokomplementeemiaga ja hüpokomplementeemiata SLE patsientide vahel. Kahe grupi vaheline erinevus on arvatatud mitteparameetrilise Mann-Whitney U-testiga, kus ns= mitteoluline (*nonsignificant*); * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ ja **** $p \leq 0,0001$. I tüüpi IFN skooride 45-st SLE patsiendist oli SLE positiivseid 29 ja negatiivseid 16, positiivsetest 16-l esinesid sümptomid, 13-l sümptomeid ei esinenud ning negatiivsetest neljal esinesid sümptomid ja 12-l sümptomeid ei esinenud. II tüüpi IFN skooride 45-st patsiendist oli SLE positiivseid 16 ja negatiivseid 29. Positiivsetest kaheksal esines hüpokomplementeemia ning kaheksal hüpokomplementeemiat ei esinenud. Negatiivsetest 12-l esines hüpokomplementeemia ja 17-l ei esinenud. Hii-ruut testid gruppide vahel statistiliselt olulisi tulemusi ei andnud.



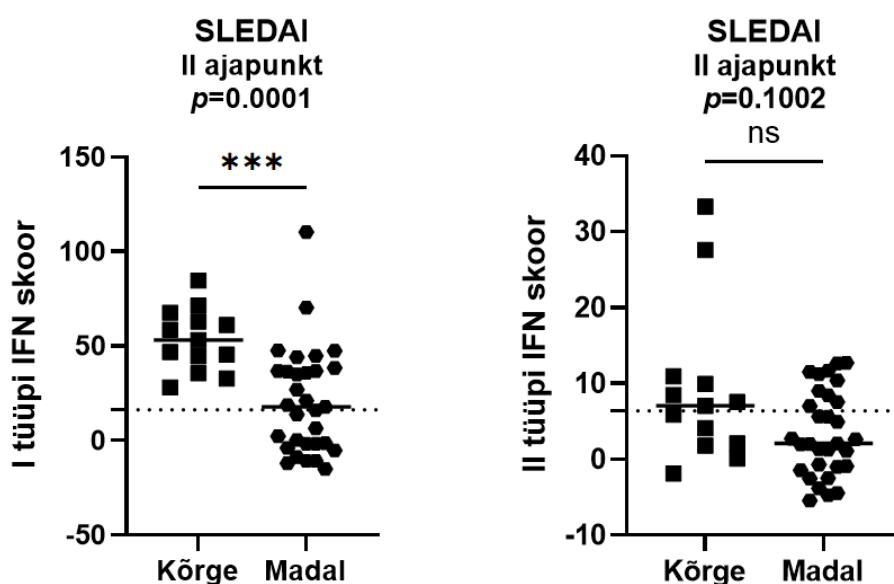
Lisa 6. I ja II tüüpi IFN skoori võrdlus neeruhaaratusega ja neeruhaaratuseta SLE patsientide vahel. Kahe grupi vaheline erinevus on arvatatud mitteparameetrilise Mann-Whitney U-testiga, kus ns= mitteoluline (*nonsignificant*); * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ ja **** $p \leq 0,0001$. I tüüpi IFN skooride 45-st SLE patsiendist oli positiivseid 29 ja negatiivseid 16, positiivsetest seitsmel esinesid sümptomid, 22-l sümptomeid ei esinenud ning negatiivsetest esinesid sümptomid kahel patsiendil ja 14-l sümptomeid ei esinenud. II tüüpi IFN skooride 45-st patsiendist oli SLE positiivseid 16 ja negatiivseid 29. Positiivsetest viiel esines neeruhaaratus ning 11-l ei esinenud. Negatiivsetest neljal esines neeruhaaratus ja 25-l ei esinenud. Hii-ruut testid gruppide vahel statistiliselt olulisi tulemusi ei andnud.



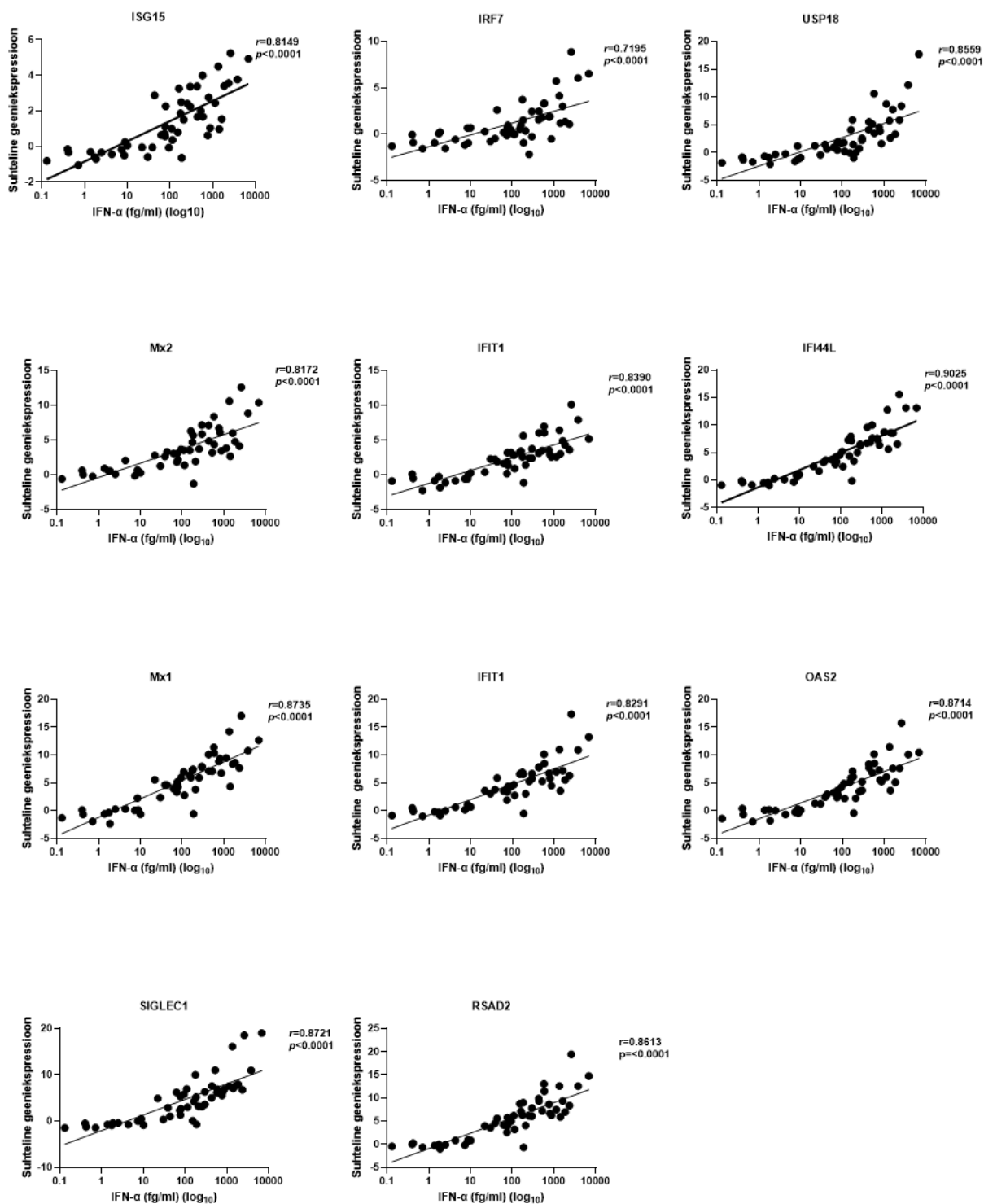
Lisa 7. I ja II tüüpi IFN skoori võrdlus anti-dsDNA-ga ja anti-dsDNA-ta SLE patsientide vahel. Kahe grupi vaheline erinevus on arvatatud mitteparameetrilise Mann-Whitney U-testiga, kus ns= mitteoluline (*nonsignificant*); * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ ja **** $p \leq 0,0001$. I tüüpi IFN skooride 45 patsiendist oli SLE positiivseid 29 ja 16 negatiivseid. Positiivsetest 16-l esinesid anti-dsDNA antikehad ja 13 ei esinenud, negatiivsetest 3 esinesid antikehad ja 13 antikehi ei esinenud. Kahe grupi võrdluses leiti statistiliselt oluline seos nii Mann-Whitney U-testiga ($p=0,0248$) kui ka Hii-ruut testiga ($p=0,017$). II tüüpi IFN skooride 45-st patsiendist oli SLE positiivseid 16 ja negatiivseid 29. Positiivsetest kaheksal esinesid antikehad ning kaheksal ei esinenud. Negatiivsetest 11-l esines neeruhaaratus ja 18-l ei esinenud. Hii-ruut test gruppide vahel statistiliselt olulisi tulemusi ei andnud.



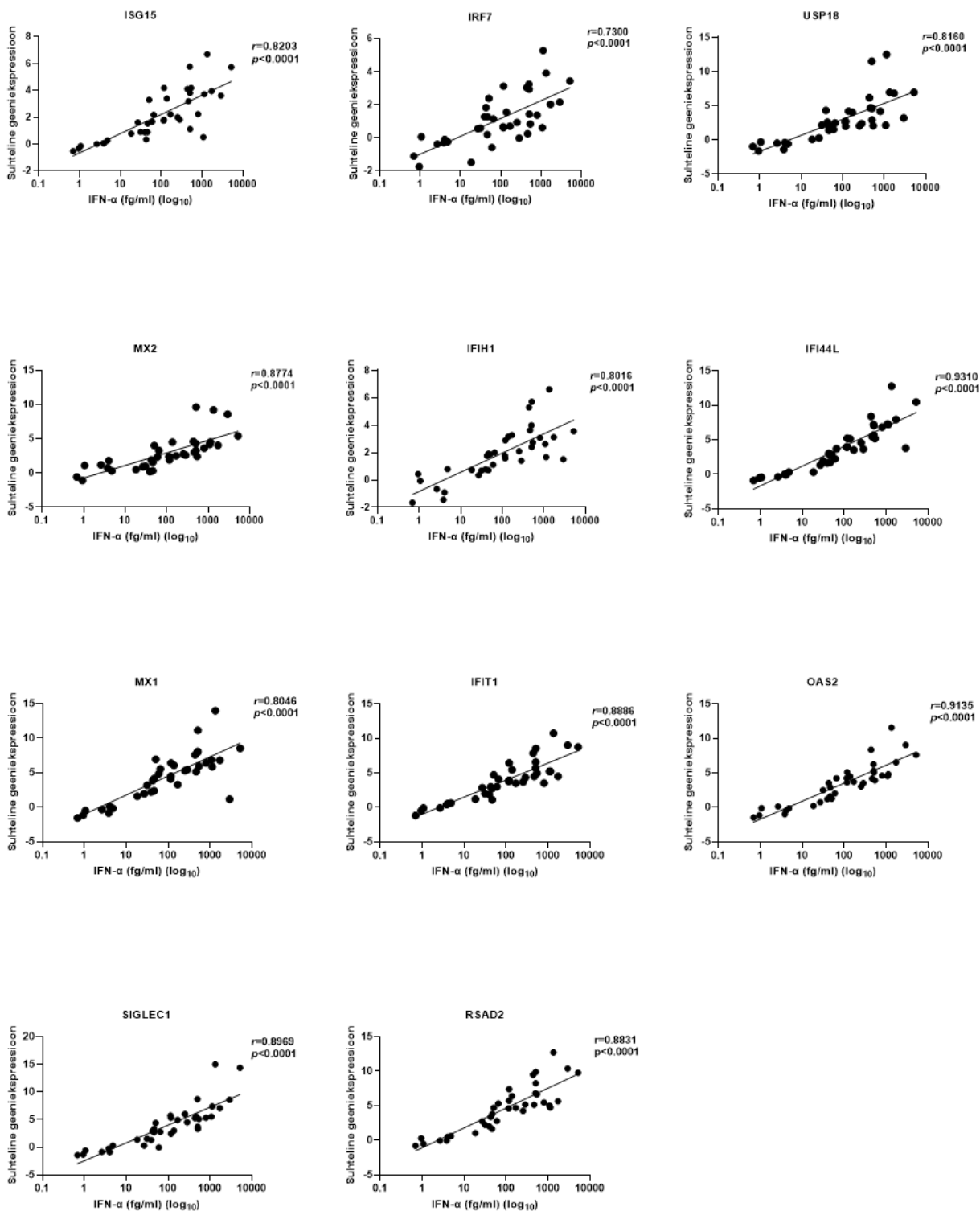
Lisa 8. I ja II tüüpi IFN skoori võrdlus kõrge ja madala SLEDAI skooriga patsientide vahel. Kahe grupi vaheline erinevus on arvutatud mitteparameetrilise Mann-Whitney U-testiga, kus ns= mitteoluline (*nonsignificant*); * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ ja **** $p \leq 0,0001$. I tüüpi IFN skooride 46-st SLE patsiendist oli SLE positiivseid 30 ja negatiivseid 16, positiivsetest 13-l oli kõrge, 17-l madal SLEDAI skoor ning negatiivsetest ei olnud ühelgi patsiendil kõrge skoor ja 16-l oli madal SLEDAI skoor. II tüüpi IFN skooride 46-st patsiendist oli SLE positiivseid 17 ja negatiivseid 29. Positiivsetest seitsmel oli kõrge ning kümnel madal SLEDAI skoor. Negatiivsetest kuuel oli kõrge ja 23-l madal skoor. Hii-ruut test statistiliselt olulist tulemust ei andnud.



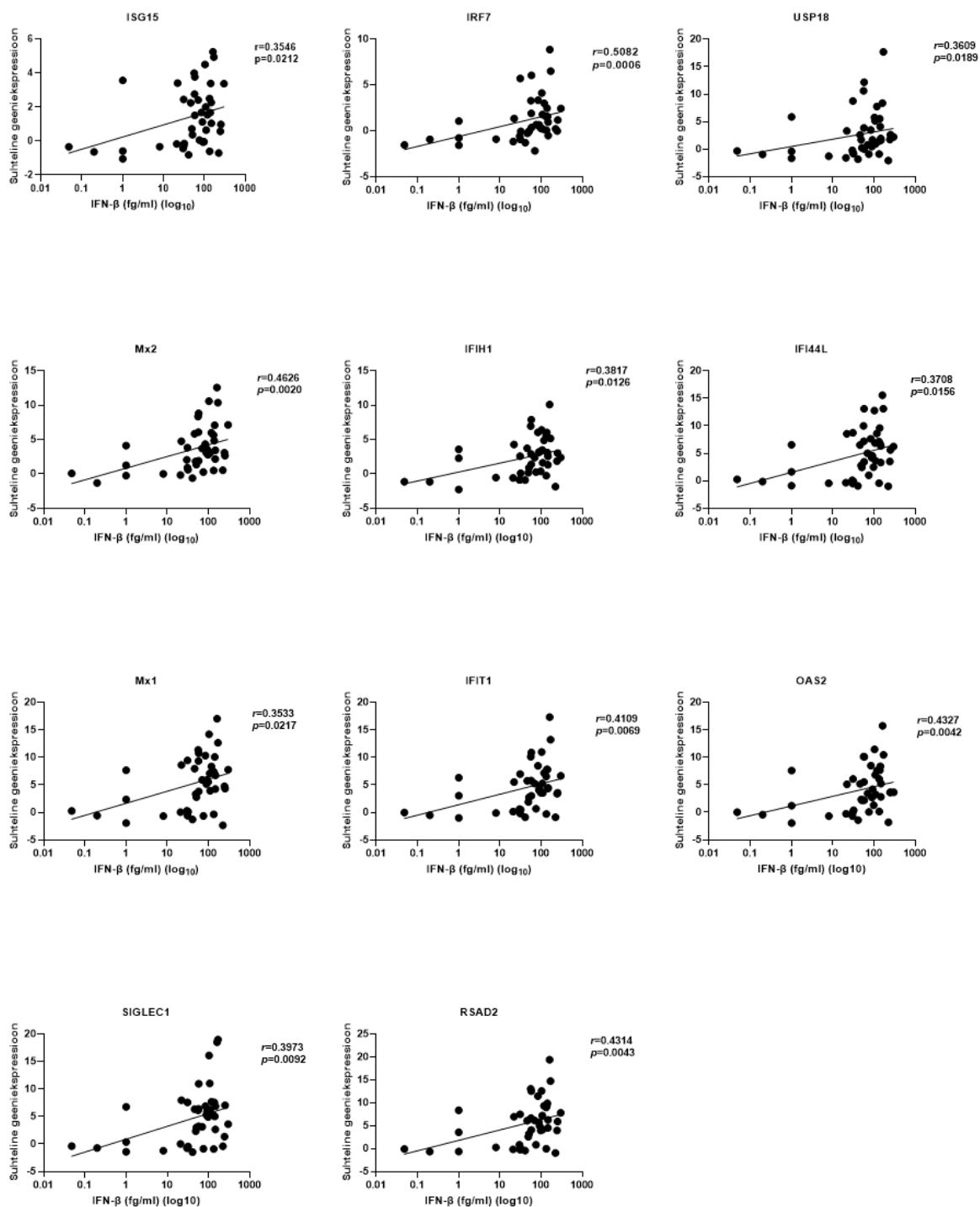
Lisa 9. Esimese ajapunkti I tüüpi IFN raja alla kuuluvate geenide suhteliste geeniekspressioonide korrelatsioonid IFN- α kontsentratsioonidega. IFN skoori ja kontsentratsioonide vaheliste seoste leidmiseks on arvutatud Spearmani korrelatsioon. Statistiliselt oluliseks loeti $p < 0.05$.



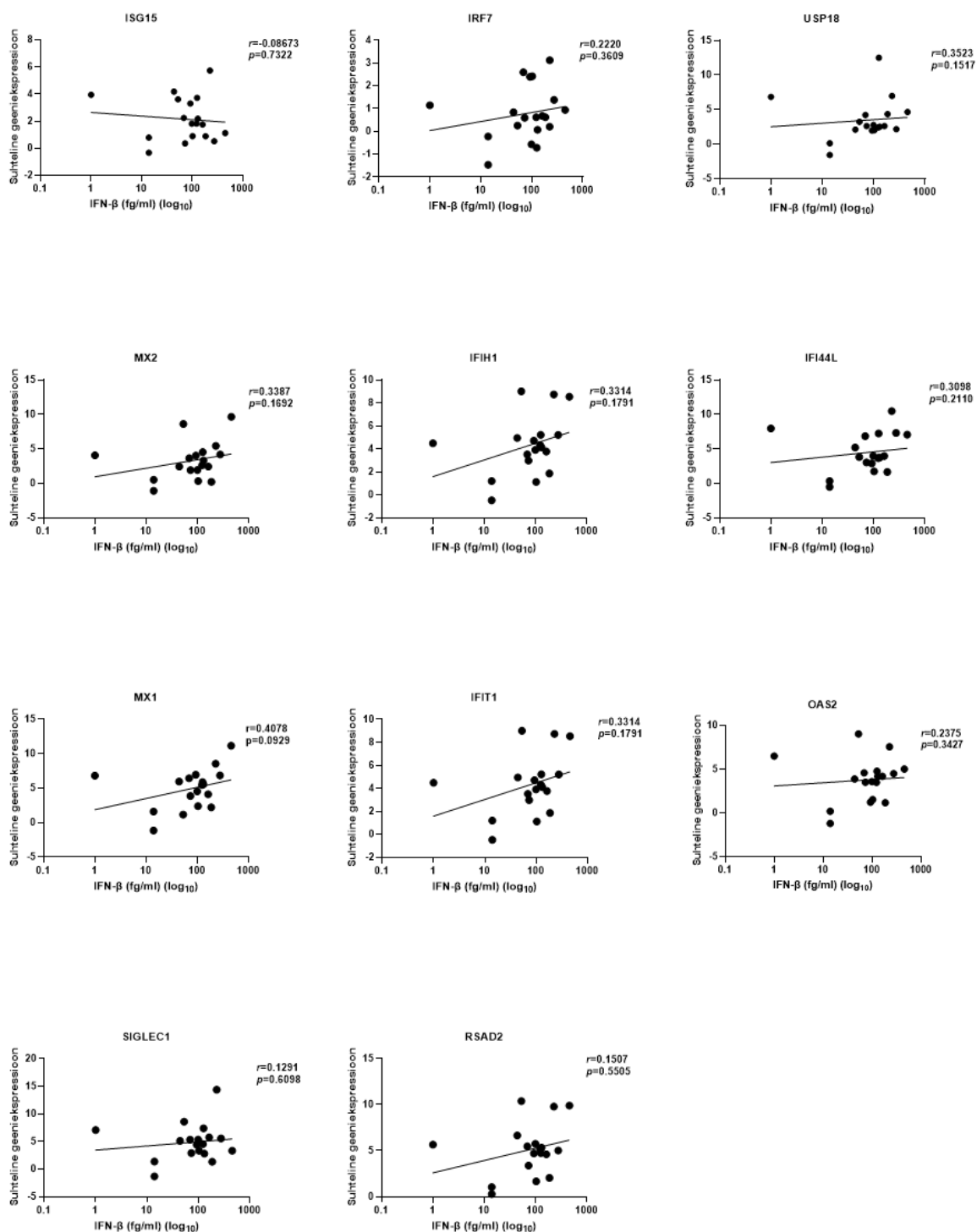
Lisa 10. Teise ajapunkti ajapunkti I tüüpi IFN raja alla kuuluvate geenide suhteliste geeniekspressioonide korrelatsioonid IFN- α kontsentratsioonidega. IFN skoori ja kontsentratsioonide vaheliste seoste leidmiseks on arvatud Spearmani korrelatsioon. Statistiliselt oluliseks loeti $p < 0.05$.



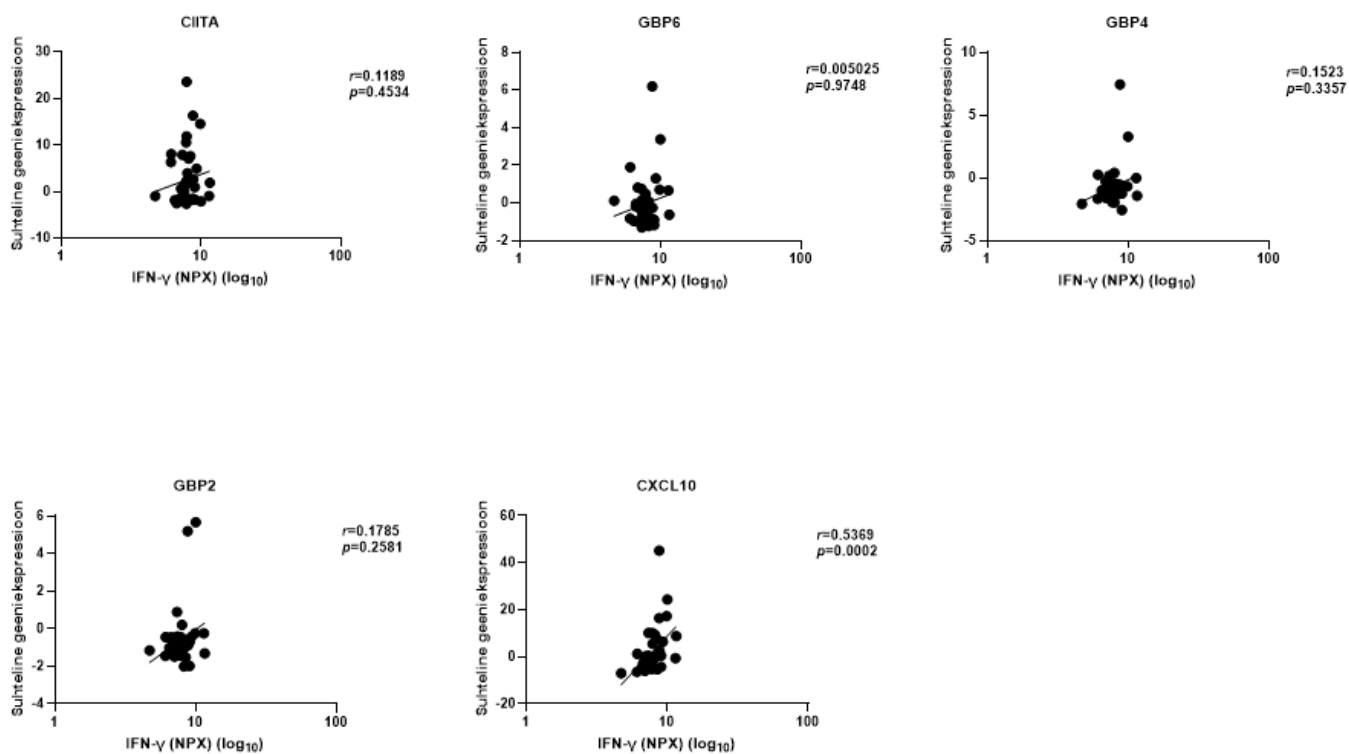
Lisa 11. Esimese ajapunkti ajapunkti I tüüpi IFN raja alla kuuluvate geenide suhtelise geeniekspressioonide korrelatsioonid IFN- β kontsentratsioonidega. IFN skoori kontsentratsioonide vaheliste seoste leidmiseks on arvatud Spearmani korrelatsioon. Statistiliselt oluliseks loeti $p < 0.05$.



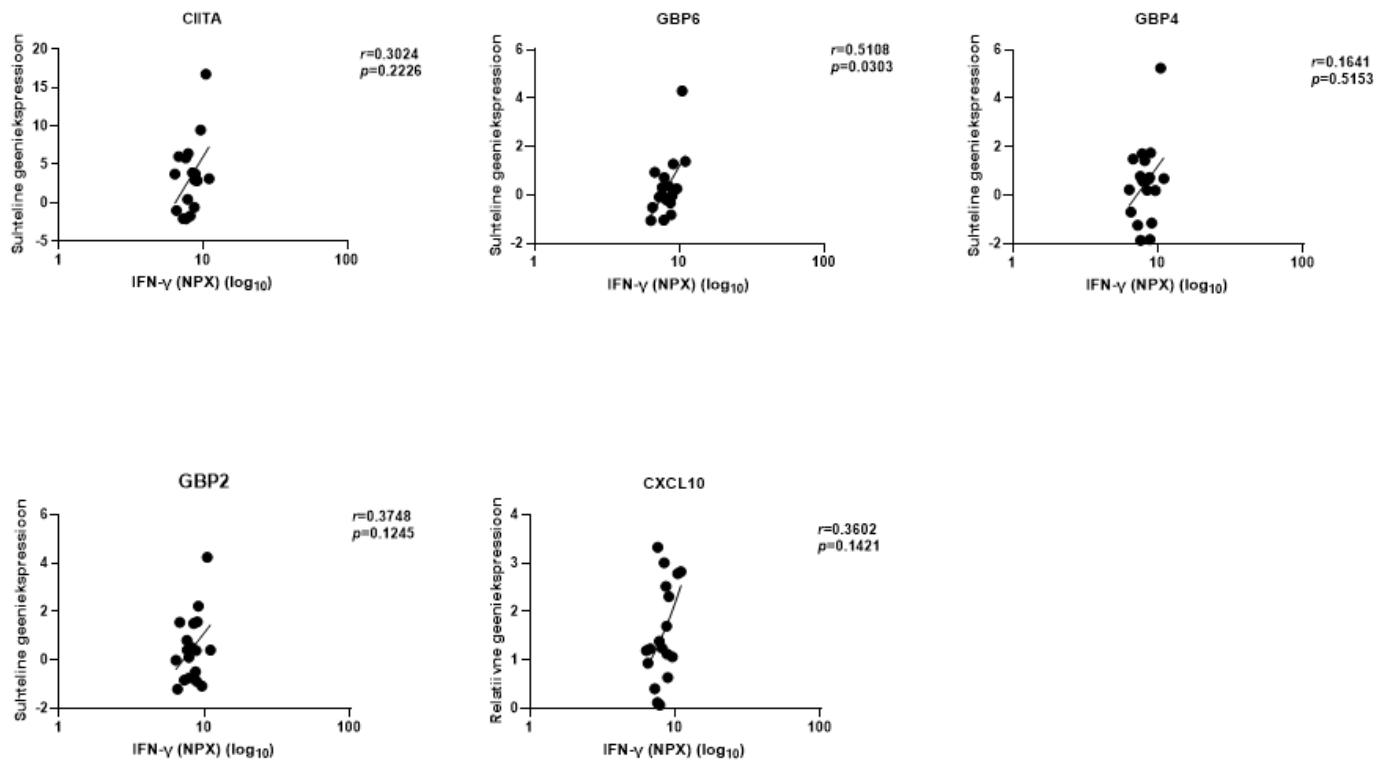
Lisa 12. Teise ajapunkti ajapunkti I tüüpi IFN raja alla kuuluvate geenide suhteliste geeniekspressioonide korrelatsioonid IFN- β kontsentratsioonidega. IFN skoori kontsentratsioonide vaheliste seoste leidmiseks on arvutatud Spearmani korrelatsioon. Statistiliselt oluliseks loeti $p < 0.05$.



Lisa 13. Esimese ajapunkti II tüüpi IFN raja alla kuuluvate geenide suhteliste geeniekspressioonide korrelatsioonid IFN- γ kontsentratsioonidega. IFN skoori ja kontsentratsioonide vaheliste seoste leidmiseks on arvatud Spearmani korrelatsioon. Statistiliselt oluliseks loeti $p < 0.05$.



Lisa 14. Teise ajapunkti II tüüpi IFN raja alla kuuluvate geenide suhteliste geeniekspressioonide korrelatsioonid IFN- γ kontsentratsioonidega. IFN skoori ja kontsentratsioonide vaheliste seoste leidmiseks on arvatatud Spearmani korrelatsioon. Statistiliselt oluliseks loeti $p < 0.05$.



Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Marcella Laura Polverino

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose
„I ja II tüüpi interferoonide roll süsteemse erütematoosse luupuse patogeneesis”,

mille juhendajad on Liis Haljasmägi, Kai Kisand ja Tõnis Org

- 1.1. Reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
- 1.2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
2. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Marcella Laura Polverino

27.05.2024