

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
BIO- JA SIIRDEMEDITSIINI INSTITUUT
PATOÜSIOLOOGIA OSAKOND

Ekstratsellulaarsed vesiikulid biomarkeritena psoriaasi ja psoriaatilise artriidi korral

Irina Guljavina

30 EAP

Magistritöö

Juhendajad: Freddy Lättekivi, MSc
Artjom Stepanjuk, MSc

TARTU 2021

Ekstratsellulaarsed vesiikulid biomarkeritena psoriaasi ja psoriaatilise artriidi korral

Ekstratsellulaarsetel vesiikulitel (EV) on oluline roll rakkude omavahelise suhtluse vahendajatenä ning neid on seostatud ka patoloogiliste protsessidega organismis. EV-d sisaldavad muuhulgas erinevaid valke ja aminohapete fragmente, mis võivad mõjutada retsipientrakke, ning see teeb neist potentsiaalsed biomarkerid. Psoriaasi ja psoriaatilise artriidi kontekstis on EV-sid ka varem uuritud, kuid psoriaasi- ja psoriaatilise artriidi patsientide EV-de profiili on kõrvutatud väiksemal määral.

Käesoleva töö raames kirjeldati EV-de omadusi psoriaasi-, psoriaatilise artriidi ja tervete inimeste grupil ning võrreldi saadud tulemusi. Erinevus tuvastati kahe EV pinnavalgu ekspressioonis psoriaasipatsientide ja kontrollgrupi vahel.

Märksõnad: ekstratsellulaarsed vesiikulid, psoriaas, psoriaatiline artriit

CERCS: B210 – histoloogia, tsütokeemia, histokeemia, koekultuurid

Extracellular vesicles as biomarkers in psoriasis and psoriatic arthritis

Extracellular vesicles (EVs) play an important role in cell-to-cell communication and have also been associated with various pathological processes. EVs are characterized by a variety of membrane proteins and luminal amino acid fragments that affect recipient cells, which makes them potential biomarkers. EVs have also been studied in the past as markers of psoriasis and psoriatic arthritis, but there have not been many studies comparing EVs of psoriasis patients and patients with psoriatic arthritis.

Here we present and compare the characteristics of EVs in the psoriasis patients, psoriatic arthritis patients and controls. A difference was found in the expression of the two EV proteins between psoriasis patients and the control group.

Keywords: extracellular vesicles, psoriasis, psoriatic arthritis

CERCS: B210 – histology, cytochemistry, histochemistry, tissue culture

Sisukord

Kasutatud lühendid	5
Sissejuhatus.....	7
1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE	8
1.1 Psoriaas.....	8
1.1.1 Psoriaasi geneetika.....	9
1.1.2 Psoriaasi patofüsioloogia	9
1.2 Psoriaasi biomarkerid	10
1.3 Psoriaatiline artriit.....	11
1.3.1 Psoriaatilise artriidi biomarkerid.....	12
1.4 Ekstratsellulaarsed vesiikulid.....	12
1.4.1 Eksosoomid.....	13
1.4.2 Mikrovesiikulid.....	13
1.4.3 Apoptootilised kehad	14
1.5 EVd kui biomarkerid.....	14
2 EKSPERIMENTAALOSA.....	16
2.1 Töö eesmärgid	16
2.2 Materjal ja metoodika.....	16
2.2.1 Patsiendid ja vereseerumi proovid	16
2.2.2 Täisverest seerumi eraldamine.....	16
2.2.3 Katsete töövoog	17
2.2.4 EV-de eraldamine vereseerumist	17
2.2.5 EV-de füüsikaliste omaduste mõõtmine	18
2.2.6 Valgu kontsentratsiooni määramine fraktsioonides.....	18
2.2.7 Western blot analüüs.....	19
2.2.8 EV Array	20
2.2.9 Transmissioonelektronmikroskoopia	21
2.2.10 RNA eraldamine	21

2.2.11	Statistiline analüüs	22
2.3	Tulemused	22
2.3.1	EV-de fraktsioonide iseloomustamine	22
2.3.2	Transmissioonelektronmikroskoopia	24
2.3.3	EV-de omadused erinevates uuringu rühmades	26
2.3.4	Patsientide vanuse ja proovide hoiustamise aja mõju EV-de omadustele	28
2.3.5	EV-de pinnamarkerite kvantiteerimine	28
3	Arutelu	30
	Kokkuvõte	33
	Summary	34
	LISA 1. Patsientide ja proovide andmed, mõõtmiste tulemused.	44
	LISA 2. EV array tulemused	45

Kasutatud lühendid

ApoA1 – apolipoproteiin A1

BSA – ingl k *bovine serum albumin*, veise seerumi albumiin

C3 – komplemendikomponent 3

C4 – komplemendikomponent 4

CD9 – ingl k *cluster of differentiation*, CD-rakkude pinnatunnusteklassifitseerimissüsteem

CD63 – ingl k *cluster of differentiation*, CD-rakkude pinnatunnusteklassifitseerimissüsteem

CD81 – ingl k *cluster of differentiation*, CD-rakkude pinnatunnusteklassifitseerimissüsteem

COMP – ingl k *cartilage oligomeric matrix protein*

CRP – ingl k *C-reactive protein*, C-reaktiivne valk

CXCL10 – C-X-C motiiviga kemokiini ligand 10

Cy5 – tsüaniin 5

DC – dendriitrakk

ESCRT – ingl k *endosomal sorting complexes required for transport*, transpordiks vajalik endosoomi kompleks

EV – ekstratsellulaarne vesiikul

GPx – glutatiooni peroksidaas

HLA-C – ingl k *human leukocyte associated antigen C*, inimese peamise koosobivuskompleksi klass I antigeen C

HSP60 – ingl k *heat shock protein 60*

IFN α – interferoon- α

IFN γ – interferoon- γ

IgG – immunoglobuliin G

IL-1 – interleukiin 1

IL-4 – interleukiin 4

IL-6 – interleukiin 6

IL-10 – interleukiin 10

IL-12 interleukiin 12

IL-17 – interleukiin 17

IL-17A – interleukiin 17A

IL-22 – interleukiin 22

ITG β 5 – integriin- β -5

K1 – keratiin 1

K6 – keratiin 6

K10 – keratiin 10

K16 – keratiin 16

KC – keratinotsüüt

LL37 – antimikroobne peptiid katelitsidiin

MCP-1 – ingl k *monocyte chemoattractant protein 1*

MMP3 – matriksi metalloproteinaas 3

MVB – ingl k *multivesicular body*, multivesikulaarne keha

NTA – ingl k *nanoparticle tracking analysis*

PS – psoriaas

PSA – ingl k *psoriatic arthritis*, psoriaatiline artriit

PSV – ld k *psoriasis vulgaris*, naastuline psoriaas

PVDF – polüvinülideendifluoriid

SEC – ingl k *size exclusion chromatography*, suuruseralduskromatograafia

SDS – naatrium-dodetsüülsulfaat

SNP – ühenukleotiidne polümorfism

SOD – superoksiiddismutaas

sRNA – small-RNA

ZP – zeta-potentsiaal

TEM – transmissioonelektronmikroskoopia

Th1 – T-helperrakk 1

Th17 – T-helperrakk 17

Th22 – T-helperrakk 22

TRM – ingl k *tissue-resident memory T-cell*

Sissejuhatus

Psoriaas on levinud süsteemne nahahaigus, mida esineb 2-4% maailmarahvastikust ning mille kaasuvateks haigusteks on metaboolsed ja kardiovaskulaarsed haigused, psühholoogilised häired ja psoriaatiline artriit. Psoriaasil on mitmeid erinevaid vorme. Neist sagedasema, naastulise psoriaasi tunneb enamasti ära ketendava lööbe järgi. Psoriaasi põdevate patsientide elukvaliteet on oluliselt vähenenud. Lisaks füüsilistele sümptomitele (ketendus, sügelus, valu) esinevad ka psühhosotsiaalsed probleemid (depressioon, ärevus, madal enesehinnang). Psoriaasi diagnoositakse peamiselt dermatoloogi poolt visuaalsel vaatlusel. On leitud ka potentsiaalseid kandidaate biomarkeritel põhinevaks diagnostikaks, kuid need ei ole laialdaselt kliinilisesse praktikasse jõudnud.

Psoriaatiline artriit kujuneb välja kuni kolmandikul psoriaasipatsientidest. Erinevalt psoriaasist on psoriaatilise artriidi sümptomid esialgu sageli ebaselged või puuduvad ja seetõttu on keeruline määrata täpset diagnoosi või hinnata haiguse raskusastet. Arvatavasti 10-15% psoriaasahaigetest on psoriaatiline artriit diagnoosimata. Sarnaselt psoriaasile määratakse diagnoos peamiselt sümptomite hindamise ja meditsiiniliste uuringute tulemusel ning kliiniliselt usaldusväärseid markereid veel leitud ei ole.

Ekstratsellulaarsed vesiikulid on membraansed põiekesed, mida rakk sekreteerib väliskeskkonda. Nad on olulised rakkudevahelises kommunikatsioonis. Vesiikulid sisaldavad enamasti RNA-d, proteiine ja lipiide. Kuna vesiikulite sisaldis varieerub rakutüüpide ja haiguste lõikes, on need head uurimisobjektid võimalike haigusmarkerite otsimiseks ja määramiseks.

Selle töö eesmärk oli uurida psoriaasahaigete ja psoriaatilise artriidiga patsientide vereseerumist pärit ekstratsellulaarsete vesiikulite füüsikalisi omadusi ja pinnamarkereid, selleks et hinnata neid uudsete, potentsiaalsete molekulaarsete biomarkeritena mõlema haiguse puhul.

1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Psoriaas

Psoriaas (PS) on põletikuline autoimmuunne krooniline nahahaigus, mis esineb 2-4% elanikkonnast (Parisi *et al.*, 2013). Sealjuures võib PS-i esinemissagedus piirkonniti varieeruda, ulatudes 0,09% kuni 11,4% (Danielsen *et al.*, 2013). PS-il on mitmeid erinevaid vorme: naastuline, peanaha-, tilgakujuline, pustulaarne, erütrodermiline, küüntepsoriaas jt (Raychaudhuri, Maverakis and Raychaudhuri, 2014). Kõige sagedasem vorm on naastuline PS (*psoriasis vulgaris*, PSV), mis moodustab ligikaudu 90% kõigist PS-i juhtumitest (Levine and Gottlieb, 2009). PSV kliinilises pildis on näha selgelt piiritletuid erütreemseid ketendavaid nahalaike, mille suurus ja hulk varieerub sõltuvalt haiguse raskusastmest (Nestle, Kaplan and Barker, 2009) (Joonis 1). Korraga võib esineda mitu PS-i vormi ning üks PS-i vorm võib aja jooksul muunduda ka teiseks (Naldi and Gambini, 2007). Umbes pooltel patsientidel esineb lisaks PSV-le kaasuva haigusena ka küünepsoriaas ning 20% PSV patsientidest esineb lisaks ka pustulaarne vorm, mis võib muutuda aja möödudes domineerivaks (Naldi *et al.*, 2004; Tan, Chong and Tey, 2012). PS-ga on seotud erinevad kaasuvad haigused, millest levinumad on diabeet, südame- ja veresoonkonnahaigused (Henseler and Christophers, 1995) ning psoriaatiline artriit (Gladman, 1991).



Joonis 1. PSV-le omased ketendavad nahalaigud reiel (A), käsivartel ning seljal (B) (Langley, Krueger and Griffiths, 2005).

PS-il on oluline mõju patsientide elukvaliteedile (Sampogna *et al.*, 2006). Sõltuvalt lööbe piirkonnast ja aktiivsusest, pole patsiendid raskemate haigusjuhtude korral võimelised ajutiselt või jäädavalt töötama valu või üldise ebamugavustunde tõttu. Nii võib näiteks palmoplantaarne PS (hõivatud on peopesade ja jalataldade nahk) olla suureks takistuseks töötamisel kuna haigus esineb pidevalt koormust saavatel kehaosadel. Lisaks füüsilistele haigustunnustele võivad PS-st tingituna tekkida ka psühhosotsiaalsed häired. Umbes pooltel

haigetel esinevad ärevushäired ja depressioon (Fried *et al.*, 1995). Sageli patsiendid distantseeruvad sotsiaalselt, kuna tunnevad piinlikkust oma välimuse pärast (Gupta ja Gupta, 1995). Seega on PS-l tugev negatiivne mõju patsiendi füüsilisele ja vaimsele tervisele, mistõttu on oluline haigus võimalikult vara tuvastada ning ravi rakendada.

1.1.1 Psoriaasi geneetika

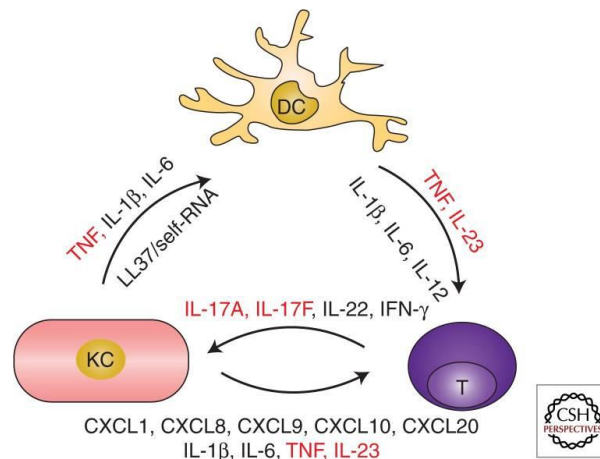
PS on multifaktoriaalne haigus, mis tähendab, et selle tekkepõhjuste seas on nii geneetiline eelsoodumus kui ka mitmete väliskeskkonnategurite kombineeritud mõju. Geneetilise eelsoodumuse osakaalu PS-i kujunemises illustreerivad enim kaksikute uuringud, mis on näidanud, et kui üks kaksikutest põeb PS-i, siis on ühemunakaksikul tõenäosus haigestuda umbes 65%, erimuna kaksikul 35% (Farber, Nall and Watson, 1974).

Geneetiliste uuringute käigus on leitud 424 geeni, mis sisaldavad psoriaasiga assotsieerunud üksiknukleotiidseid polümorfisme (ingl k *single nucleotide polymorphism*, SNP) (Singh *et al.*, 2019). Muutused nendes geenides mõjutavad enamasti immuunsüsteemi ja põletikuliste protsesside signaaliradasid (Singh *et al.*, 2019). Enamik psoriaasiga seotud geene asuvad nn PSORS lookustes (Singh *et al.*, 2019). Varasemad uuringud on näidanud, et PSORS1 lookuse mutatsioonid ja polümorfismid mõjutavad PS väljakujunemist 30-50% ulatuses (Nair *et al.*, 2006; Fan *et al.*, 2008). PSORS1 lookuse keskmeks olevas HLA-C geenis on leitud koguni 31 haigusega seostatud SNP-d (Singh *et al.*, 2019). Muutused selles geenis mõjutavad antigeenide esitlemist CD8⁺ T-rakkudele (Neisig, Melief and Neefjes, 1998; Blais, Dong and Rowland-Jones, 2011). Seega võivad need SNP-d oluliselt mõjutada antud geeni funktsioone ning tõenäoliselt mõjutada interaktsioone CD8⁺ T-rakkudega, sealhulgas hõlbustades autoantigeenide esitamist HLA-C poolt (Capon, 2017). Kaukaaslastest HLA-Cw6 alleeli kandjatel on umbes kümme korda suurem risk PS-i väljakujunemiseks (Guðjónsson *et al.*, 2002). Umbes 60% PS-haigetel esineb HLA-Cw6 alleeli variant (Tiilikainen *et al.*, 1980; Guðjónsson *et al.*, 2002).

1.1.2 Psoriaasi patofüsioloogia

Patofüsioloogilises kontekstis iseloomustab PS-i keratinotsüütide kontrollimatu proliferatsioon, muutused nende diferentseerumises ja mitmed biokeemilised, põletikulised, immunoloogilised ja vaskulaarsed kõrvalekalded (Guðjónsson and Elder, 2007). Haiguse väljakujunemise protsessis omab suurt tähtsust T-rakkude poolt vahendatud autoimmuunvastus (Elder *et al.*, 2010). Kõige paremini on kirjeldatud psoriaatilise põletiku initsiatsiooni mehhanism naha kahjustumise või infektsiooni tagajärjel. Keratinotsüüdid

vabastavad mikroobivastast peptiidi LL37, mis seondub DNA või RNA fragmentidega vigastatud naharakkudest (Ganguly *et al.*, 2009) (Joonis 2). Moodustunud kompleks aktiveerib dendriitrakke, mis infiltreeruvad nahakihtidesse ning esitavad antigeene ja sekreteerivad tsütokiine (TNF, interleukiinid), mis omakorda viib IL-17 tootvate T-rakkude aktiveerumiseni. T-rakud sekreteerivad tsütokiine (IL-17A, INF γ), mis soodustavad keratinotsüütide ebanormaalset diferentseerumist ning kemokiinide tootmist (Ganguly *et al.*, 2009; Di Meglio, Villanova and Nestle, 2014).



Joonis 2. Psoriaatiliste nahalaikude teket moduleerib keratinotsüütide (KC), dendriitrakkude (DC) ja T-rakkude (T) omavahelistest põletikulistest signaalidest tekkinud tsükel (Di Meglio, Villanova and Nestle, 2014).

1.2 Psoriaasi biomarkerid

Biomarker on bioloogilise seisundi kvantitatiivselt mõõdetav tunnus (Strimbu and Tavel, 2010). Kuna PS on põletikulise iseloomuga, siis on täheldatud mitmeid süsteemseid immuunrakkudega seotud muutusi. On leitud, et PS-haigete veres võrreldes tervete inimestega on rohkem Th17, Th22, Th1 rakke ning sellest tulenevalt on tõusnud IL-17A, IFN- γ kontsentratsioon vereseerumis (Kagami *et al.*, 2010). Lisaks on kõrgenenud ka mittespetsiifiliste põletikunäitajate tasemed (CRP, haptoglobiin, fibrinogen, C3, C4) (Rocha-Pereira *et al.*, 2004) ning langenud on antioksidantide tasemed (SOD, GPx) (Gupta *et al.*, 2011).

Nahabiopsiate uuringute põhjal on leitud, et psoriaatilises nahas on diferentseerumiskeratiinid K1 ja K10 allareguleeritud ning hüperprolifereerumiskeratiin K6 ja K16 on ülesreguleeritud. See viitab psoriaatiliste dediferentseerunud keratinotsüütide hüperprolifereerumisele, mis omakorda viib PSV-le omase paksenenud ning ketendavate nahalaikude tekkeni (Piruzian *et al.*, 2010). Kõrgenenud on ka proliferatsiooni soodustavate

p53 ja HSP60 valkude ekspressioon, kuid nende täpne funktsioon psoriaasis pole veel teada (Villanova, Di Meglio and Nestle, 2013). Koes sisalduvatest tsütokiinidest on tõusnud IFN- α , IL-6 ja IL-12 tasemed, mida on seostatud põletikuliste protsessidega psoriaatilises nahas (Di Meglio, Villanova and Nestle, 2014), vähenenud on IL-1, IL-4, IL-10 tasemed (Asadullah *et al.*, 2004; Rashmi, Rao and Basavaraj, 2009).

On leitud, et muutused teatud miRNAde kontsentratsioonides nii kudedes kui ka kehavedelikes võivad viidata organismis toimuvatele patoloogilistele protsessidele (Chang *et al.*, 2012; Ichii *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2015). PSV patsientide puhul on vereplasmas tõusnud näiteks mi-RNA-155 ja miRNA-210 tasemed, mis indutseerivad IL-17 tootmist (Yao *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2014; El-Komy *et al.*, 2020). miRNA-125b taseme langus psoriaatilises nahas aga soodustab keratinotsüütide prolifer eerumist (Xu *et al.*, 2011). Vaatamata vereseerumist ja plasmast mõõdetavate potentsiaalsete biomarkerite suhtelisele rohkusele, pole need siiski haigusspetsiifilised, ning nende mõõdetavad väärtused on sageli sarnased teiste immuunvahendatud põletikulistele haigustele. Seega on uusi biomarkerite kandidaate otsivad uuringud jätkuvalt vajalikud avastamaks spetsiifilisemaid markereid.

1.3 Psoriaatiline artriit

Psoriaatiline artriit (PSA) on reumatoidfaktor-negatiivne põletikuline artriit, mille puhul võivad esineda distaalsete interfalangeaalsete liigeste artriit (haaratud on sõrmede ja varvaste otsmised liigesed), sümmeetriline polüartriit, mutileeriv artriit, spondüliit ja/või ebasümmeetriline artriit (Gudjonsson and Elder, 2007; Elder *et al.*, 2010). Patsiendil võib korraga olla mitu PSA vormi (Jones *et al.*, 1994). PSA esineb 7-26% PS-haigetest ja tekib keskmiselt 10 aastat pärast esmaseid PS-i sümptomeid, kuid võib tekkida ka PS-i ilminguteta (Gladman *et al.*, 2005; Prey *et al.*, 2010). On täheldatud, et umbes 78-83% PSA patsientidest esineb küüne-PS (Salomon, Szepietowski and Proniewicz, 2003; Williamson *et al.*, 2004). PSA-d iseloomustab liigeste sidekoe hävimine ning sellest tingitud paistetus, liigeste moondu mine ning valu liigestes ja liikuvuse kadumine (Moll and Wright, 1973; Mease, 2011). PSA-l puuduvad tihti spetsiifilised sümptomid, mis eristaks seda teist tüüpi artriitidest, näiteks osteoartriidist ja reumatoidartriidist. Psoriaatilised muutused küüneplaadil, tuharatevahelisel nahal ning peanahal võivad olla olulisteks sümptomiteks PSA eristamiseks teistest artriitidest (Moll and Wright, 1973; Villanova, Di Meglio and Nestle, 2013).

Sarnaselt PS patsientidele on PSA patsientide elukvaliteet oluliselt vähenenud. Liigeste moondu mise ja liikuvuse vähenemise tõttu võivad igapäevased tegevused olla häiritud ning on vajalik erihooldus (Husted *et al.*, 2001). Võrreldes reumatoidartriidiga kannatavad PSA

patsiendid tugevamate valude all (Husted *et al.*, 2001). Paljud kaebused on samad, mis PS patsientidel: nahaprobleemidest tingitud elukvaliteedi langus, psühholoogilised probleemid (Mease and Menter, 2006).

1.3.1 Psoriaatilise artriidi biomarkerid

Arvatakse, et 10-15% psoriaasihaigetest võivad põdeda varajast PSA-d enda teadmata, kuna PSA varajaseks diagnoosimiseks puuduvad spetsiifilised diagnostilised vahendid ja biomarkerid (Spelman *et al.*, 2015; Villani *et al.*, 2015). Vereseerumi markerid, mis võiksid viidata PSA esinemisele psoriaasihaigetel, on IL-6, C-reaktiivne valk (CRP), maatriksi metalloproteinaas MMP3, CXCL10, ITGβ5 (Alenius, Eriksson and Rantapää Dahlqvist, 2009; Chandran *et al.*, 2010; Abji *et al.*, 2016; Cretu *et al.*, 2018). Nende valkude kontsentratsioon vereseerumis on PSA korral suurenenud. PSA eristamiseks osteoartriidist võivad sobida vereseerumis resistiini, COMP ja MCP-1 kontsentratsioonid, mis on võrreldes osteoartriidiga suurenenud (Chandran *et al.*, 2019).

Biomarkeri rolli võivad täita ka teatud rakupopulatsioonid, mille esinemist ja suurst võib hinnata erinevates kehavedelikes. Varajase artriidiga (alla 12 kuu) patsientide seas läbiviidud uuring näitas, et varajase PSA puhul on näha Tc17 (IL-17 tootvad CD8⁺ T-rakud) ja TRM (ingl k *tissue-resident memory T-cells*) rakkude arvu tõusu sünoviaalvedelikus, mida ei täheldatud teiste varajaste artriidivormide puhul (Hughes *et al.*, 2020). Mõlemat rakupopulatsiooni on varasemalt kirjeldatud autoimmuunsete haiguste põletikulistes protsessides (Liang, Pan and Ye, 2015; Wu *et al.*, 2018). Need on seni uuritustest markeritest kõige täpsemad, kuid sünoviaalvedeliku proovide võtmine on invasiivne protseduur, mille tagajärjel võivad tekkida komplikatsioonid. Suurema kliinilise rakendamise potentsiaaliga oleks seega PSA-le spetsiifilised veremarkered, mida oleks võimalik määrata vähem invasiivsete meetoditega.

1.4 Ekstratsellulaarsed vesiikulid

Elutegevuse käigus vabanevad rakkude sisemusest või pinnalt membraansed vesiikulid, mida ühiselt nimetatakse ekstratsellulaarseteks või rakuvälisteks vesiikuliteks (EV) (Keller *et al.*, 2006; Ratajczak *et al.*, 2006; Kalra, Drummen and Mathivanan, 2016). EV-d sisaldavad erinevaid proteiine, nukleiinhappeid ja lipiide ning on moodustavad olulise osa rakkude omavahelisest suhtlusest (Baj-Krzyworzeka *et al.*, 2006; Valadi *et al.*, 2007; Skog *et al.*, 2008; Raposo and Stoorvogel, 2013). Üldiselt jaotatakse EVd kolme suuremasse rühma: eksosoomid, mikrovesiikulid ning apoptootilised kehad (Kalra, Drummen and Mathivanan,

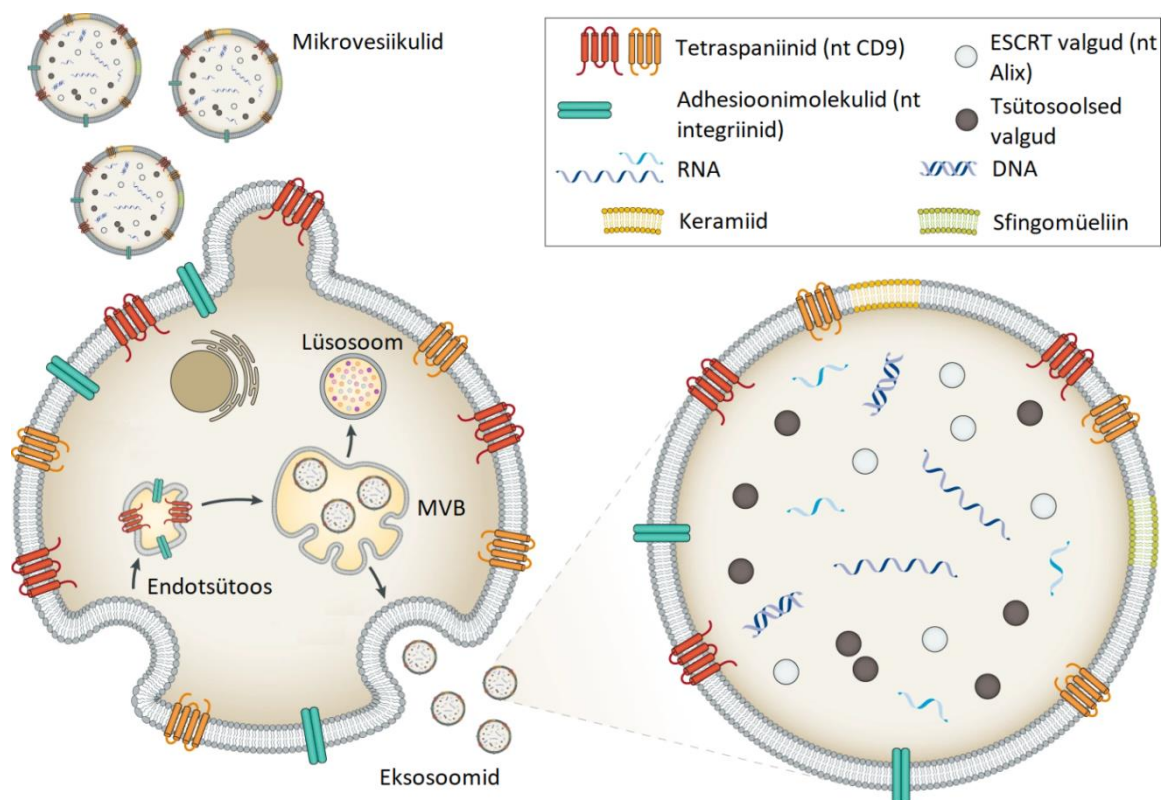
2016). Nende päritolu on võimalik määrata pinnamarkerite ja sisaldise järgi (Pant, Hilton and Burczynski, 2012). EVdel on oluline roll rakkudevahelises suhtluses. Nad viivad retsipient-rakku funktsionaalseid valke, nii translatsiooniks sobivat mRNA-d kui ka miRNA-d ja siRNA-d geenivaigistamiseks (Valadi *et al.*, 2007; Alvarez-Erviti *et al.*, 2011; Montecalvo *et al.*, 2012). EV-sid on leitud kõikidest kehavedelikest: verest, uriinist, süljest, rinnapiimast, amnionivedelikust, sapist ja spermast (Colombo, Raposo and Théry, 2014). Erinevate patoloogiliste protsesside käigus rakkudest eraldunud EV-d erinevad oma sisaldise ja pinnamarkerite poolest võrreldes füsioloogilise normiga (Belov *et al.*, 2016; Mangino *et al.*, 2019). Näiteks on leitud, et EV-d võivad edendada vähkkasvajate metastaseerumist kandes endas vähirakkudele spetsiifilisi signaalmolekule (Luga *et al.*, 2012). Sünoviaalvedeliku EV-d sisaldavad deimineeritud valke (nt fibriini β -ahel, fibrinogeen D fragment), mis võivad käituda autoantigeenidena reumatoidartriidi tekkes (Skriner *et al.*, 2006). IL-17A-ga stimuleeritud keratinotsüütidest vabanenud EVd soodustasid retsipientrakkudes psoriaatilise mRNA sünteesi (Mangino *et al.*, 2019).

1.4.1 Eksosoomid

Eksosoomid on raku valkude lagundamise ja sorteerimise endosomaalse raja derivaadid (Scott, Vacca and Gruenberg, 2014; Palmulli and Van Niel, 2018). Eksosoomid tekivad rakus multivesikulaarsete kehade (ingl k *multivesicular bodies*, MVB) luumenis, ning MVB membraani ühinemisel rakumembraaniga vabanevad eksosoomid rakuvahe ruumi (McBride, Rodriguez-Menocal and Badiavas, 2017) (Joonis 3A). MVB-de tekkemehhanism pole veel täpselt teada, kuid on leitud, et selles osalevad teatud kasvufaktorid ning ESCRT valgud osalevad eksosoomide sisaldise laadimisel ja sortimisel (Wollert and Hurley, 2010; Borges *et al.*, 2013). Eksosoomide läbimõõt jääb vahemikku 30-150 nm ning nende pinnal on rohkelt ekspresseerunud teatud tetraspaniinid, näiteks CD63, CD81 ja CD9 (Raposo and Stoorvogel, 2013).

1.4.2 Mikrovesiikulid

Mikrovesiikulid on suuremad, 50-1500 nm läbimõõduga EV-d ning tekivad rakust väljasopistumise teel (Raposo and Stoorvogel, 2013) (Joonis 3B). Erinevalt eksosoomide biogeneesist, on sellisel teel tekkinud vesiikuli sisu määratud raku perifeerse tsütoplasma koostise poolt (McBride, Rodriguez-Menocal and Badiavas, 2017). Sarnaselt eksosoomidele on ka mikrovesiikulites leitud ESCRT valke, mis vastutavad vesiikulite tekke eest nõordumise teel (Juan and Fürthauer, 2018; Vietri, Radulovic and Stenmark, 2020).



Joonis 3. Eksosoomide ja mikrovesiikulite teke (Linxweiler and Junker, 2020, kohandatud).

1.4.3 Apoptootilised kehad

Apoptootilised kehad on raku apoptoosi käigus tekkinud 1000-5000 nm läbimõõduga suured vesiikulid (Riazifar *et al.*, 2017). Enamasti hävitavad fagotsüüdid need vesiikulid üsna kiiresti, kuid sellele vaatamata jõuavad osad apoptootilised kehad interakteeruda teiste rakkudega (Raposo and Stoorvogel, 2013; Pitt, Kroemer and Zitvogel, 2016). Arvatakse, et apoptootilises kehas sisalduvad nukleiinhapped ja transkriptsioonifaktorid on võimelised mõjutama retsipient-rakus toimuvaid protsesse (Ryoo and Bergmann, 2012).

1.5 EVd kui biomarkerid

EV-d on olulised rakkudevahelise suhtluse vahendajad ning seega on neil oma roll erinevate haiguste väljakujunemisel ja haiguskulu mõjutamisel. Mitmete uuringute tulemusena on alust arvata, et EV-de uurimine võimaldab leida uusi biomarkereid erinevate bioloogiliste protsesside ja haiguste puhul (Deng *et al.*, 2020; Sun and Lerman, 2020; Amintas *et al.*, 2021). Näiteks vähiuuringute käigus on leitud, et vähirakud sekreteerivad eksosoomi vähemalt 10 korda rohkem kui normaalsed rakud (Li *et al.*, 2017), mis viitab nende potentsiaalsele rollile pahaloomuliste kasvaja arenemise protsessis. Ühtlasi on näidatud, et eksosoomides võib sisalduda vähkkasvajatele spetsiifilist mittekodeerivat RNA-d

(Fan *et al.*, 2018) ja valke (Runz *et al.*, 2007). Vähispetsiifiliste EV-de hulk ning neile omaste markerite kontsentratsioon võib aidata määrata kasvaja invasiivsust ning jälgida selle arengut (Li *et al.*, 2009; Meehan and Vella, 2016).

Märkimisväärne on EV-de võimekus vahendada rakkudevahelist suhtlust terve organismi ulatuses, jäädes seejuures spetsiifiliseks retsipient-rakkude suhtes. Näiteks eesnäärmevähi korral on leitud, et kasvaja poolt eritatud EV-d soodustavad metastaaside teket, sisaldades RNA-sid, mis moduleerivad osteoblastide geenide ekspressiooni ja seeläbi valmistavad ette eemal asuva luukoe metastaaside vastuvõtmiseks (Probert *et al.*, 2019).

EV-de kui rakkudevahelise suhtluse vahendajate tähtsusele PS ja PSA kontekstis viitab Martoni jt artikkel (Marton *et al.*, 2017). Antud artikli autorid uurisid reumatoidartriidi ja PSA patsientide vereseerumist saadud vesiikulite mõju tervetele osteoklastidele ning leidsid, et osteoklastide aktiivsus langeb, kui neid mõjutada reumatoidartriitsetelt patsientidelt saadud EV-dega, kuid PSA EV-de mõjul osteoklastide aktiivsus tõuseb. Veres leiduvaid EV-sid PS ja PSA biomarkeritena on uurinud Pasquali jt (Pasquali *et al.*, 2020). Autorid leidsid, et PS ja PSA patsientide vereplasmas ringlevates EV-des olevate miRNAde suhteline hulk erineb 19 kirjeldatud miRNA puhul.

PS kontekstis leidub näited ka EV-de lokaalsemast rollist nahkkoos. *In vitro* on näidatud, et hiirte keratinotsüütidest eraldatud eksosoomid olid võimelised stimuleerima dendriitrakkude küpsemist ning indutseerima mittespetsiifilist immuunvastust läbi suurenenud CD40 ekspressiooni ning IL-6, IL-10 ja IL-12 sekreteerimise (Kotzerke *et al.*, 2013). Inimese keratinotsüütide puhul on aga näidatud, et nende poolt eritatud EV-de hulk, suurus ja miRNA-de sisaldis muutub, kui neid on *in vitro* põletikuliste tsütokiinidega stimuleeritud; esineb suuremalt hulgal PS-ga seotud miRNA-sid (Mangino *et al.*, 2019). EV-de rolli rakkudevahelises suhtluses psoriaatilises nahas avab veel enam Cheung *et al.* uuring, mille tulemusena näidati, et psoriaatilised nuumrakud eritavad fosfolipaaas A₂ sisaldavaid eksosoomi, mis indutseerivad dendriitrakkudes neolipiidsete antigeenide tootmist ja presenteerimist, mida omakorda tunnevad ära CD1a-reaktiivsed T-rakud. See protsess viib T-rakkude aktiveerumiseni ning suurenenud IL-17A ja IL-22 sekreteerimiseni, mis on tüüpilised psoriaasile iseloomulikud tsütokiinid (Cheung *et al.*, 2016).

2 EKSPERIMENTAALOSA

2.1 Töö eesmärgid

EV-d on olulised rakkudevahelise suhtluse vahendajad. Varasemate uuringute tulemusena on leitud, et nii EV-de füüsikalised omadused kui ka nende poolt kantavad biomolekulid võivad oluliselt muutuda erinevate patoloogiate kontekstis. EV-sid kui võimalikke biomarkereid PSV ja PSA puhul on seni aga vähe uuritud. Selle töö eesmärgid olid järgnevad:

- uurida PSV ja PSV+PSA patsientide vereseerumist eraldatud EV-de füüsikalisi omadusi (kontsentratsioon, suurus ja zeta-potentsiaal) ning võrrelda neid mittepõletikuliste kontrollidega;
- profileerida vereseerumi proovid valitud EV-de pinnamarkerite osas, et leida potentsiaalseid erinevusi PSV ja PSV+PSA patsientide ning mittepõletikuliste kontrollide vahel;
- eraldada EV-de proovidest sRNA, mida oleks võimalik järgnevalt kasutada sisendiks II põlvkonna sekveneerimismeetodile.

2.2 Materjal ja metoodika

2.2.1 Patsiendid ja vereseerumi proovid

Käesolevas magistritöös kasutati Tartu Ülikooli nahahaiguste kliiniku patsientide jääkverest eraldatud seerumi proove. Seerumi proovid olid kogutud eelneva viie aasta jooksul Tartu Ülikooli nahahaiguste kliiniku biopanka. Proovide kogumine ning uuringud on heaks kiidetud Tartu Ülikooli inimuuringute eetika komitee poolt (protokolli number: 265/T-21).

Kokku kasutati töös 36 patsiendi vereseerumi proove: 12 PSV patsienti, 12 PSV + PSA patsienti ning 12 mittepõletikulist kontrollgrupi patsienti. Patsientide gruppide moodustamisel jälgiti, et need oleksid patsientide soo ja vanuse poolest üksteisega vastavuses. Keskmise vanuse gruppides oli kontrollgrupis 51.6 ± 11.49 aastat, PS grupis 50.58 ± 10.03 aastat ning PSA grupis 50.08 ± 10.15 aastat. Igas grupis oli 2 naispatsienti ning 10 meespatsienti (Lisa 1).

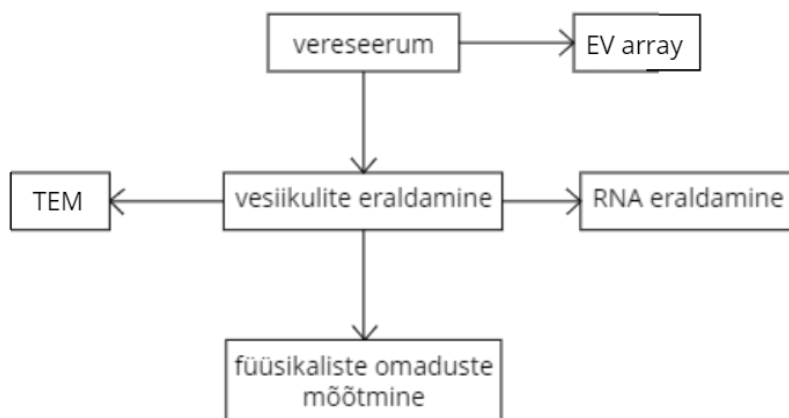
2.2.2 Täisverest seerumi eraldamine

Vereproovid koguti Z serum Clot Activator vaakumkatsutitesse (Greiner Bio-One, Austria). Kogutud verel lasti kerge segamise järel seista toatemperatuuril 30-60 minutit ning

seejärel tsentrifuugiti proove 1300 x g juures 10 minutit. Seejärel pipeteeriti seerum 1.5 ml katsutitesse ning hoiustati -80°C juures. Vereproovid koguti Tartu Ülikooli nahahaiguste kliiniku meditsiinitöötajate poolt ning seerumi eraldamine teostati Tartu Ülikooli Kliinikumi ühendlaboris.

2.2.3 Katsete töövoog

Uuritavate proovide korral oli algmaterjaliks 1.2 ml vereseerumit, millest 100 µl eraldati EV Array analüüsiks (pinnamarkerite profileerimine). 1.1 ml seerumit tsentrifuugiti järjestikku kasvavatel kiirustel ning Izon qEV kolonnil (Izon Science, Uus-Meremaa) puhastati 1ml tsentrifuugitud seerumit uuritava proovi kohta, kahe 500µl alikvoodina (optimaalne kolonni sisendi maht). Esimese etapina selgitati välja, millised Izon qEV kolonnist kogutud fraktsioonid on optimaalsed EV proovide kogumiseks. Nendele tulemustele tuginedes koguti edaspidi EV proovide saamiseks fraktsioonid 7-10, kokku 4 ml. Saadud proovidest eraldati 200µl EV-de lahust ZetaView® NTA (Particle Metrix, Saksamaa) mõõtmiste tarbeks (nanopartiklite kontsentratsioon, suurus ja zetapotentsiaal) ning transmissioonelektronmikroskoopia (TEM) jaoks, ülejäänud maht kontsentreeriti Amicon® Ultra-2 10K Unit tsentrifugaalfiltritega (Merck Millipore, Ameerika Ühendriigid) ligikaudu 20 korda RNA eraldamiseks (joonis 4).



Joonis 4. EV-de omaduste uurimise töövoog skeem.

2.2.4 EV-de eraldamine vereseerumist

EV-de eraldamiseks kasutati 1ml vereseerumit patsiendi kohta. Võimalike purunenud rakkude jääkidest ja apoptootilistest kehadest vabanemiseks tsentrifuugiti kõigepealt vereseerumit järjestikku kasvavatel kiirustel. Esimesena tsentrifuugiti vereseerumit 400 x g juures 10 minutit. Seejärel tsentrifuugiti saadud supernatanti 10 minutit 2000 x g juures ja

järgnevalt 10 minutit 10,000 x g juures. EV-d puhastati suuruseralduskromatograafial (ingl k *size exclusion chromatography*, SEC) põhineval meetodil, kasutades selleks qEV original - 70nm kolonne (Izon Science, Uus-Meremaa) vastavalt tootja juhiste. Kolonnide voolutamiseks kasutati 1x PBS (Merck/MilliporeSigma, USA) puhvrit ning väljund koguti 500 µl fraktsioonide kaupa. Kogutud proovide kontsentreerimiseks kasutati Amicon® Ultra-2 10K Unit tsentrifugaalfiltreid. Filtreid tsentrifuugiti *swing-bucket* tüüpi rootoril 3000 x g juures 4°C juures.

2.2.5 EV-de füüsikaliste omaduste mõõtmine

EV-de kontsentratsiooni, suurust ja zeta-potentsiaali (ZP) mõõdeti kasutades nanopartiklite liikumisanalüüsi (ingl k *nanoparticle tracking analysis*, NTA) seadet ZetaView®. EV proovide nanopartiklite kontsentratsiooni ja nende suuruse mõõtmiseks lahjendati proovid esmalt ligikaudse kontsentratsioonini $10^6 - 10^7$ partiklit/ml kasutades selleks 1x PBS puhvrit, et saavutada optimaalne kontsentratsioon ZetaView® NTA seadmega töötamiseks. Masin mõõtis suuruse mõõtmise režiimis partiklite suurust ja kontsentratsiooni kolmes tsükli ja 11 kaamerapositsioonis, igas positsioonis 15 kaadrit. Lisaks kasutati järgnevaid seadistusi: tundlikkus: 85, säriaeg: 70, temperatuur: 22°C.

ZP on nanopartiklite pinnalaengu ja vahetult partiklit ümbritseva lahuse vahel tekkiv elektriline potentsiaal ning see kirjeldab nanopartiklite kolloidset stabiilsust lahustes (Hiemenz and Rajagopalan, 1997). EV-de kontekstis mõjutab ZP väärtust membraani kompositsioon, mis annab kaudselt kirjeldada pinnaalkude summaarset laengut (Akagi *et al.*, 2015). EV-de ZP mõõtmiseks lahjendati proovid 0.1x PBS-i kasutades kontsentratsioonini 10^{10} partiklit/ml ning saadud lahjenduste pH korregeeriti väärtuseni 7.0 lisades vastavalt 0.1M NaOH või HCl. Kirjeldatud proovide eeltöötlemine teostati vastavalt tootja juhiste, mis tagab ZetaView® NTA seadme optimaalse töö. Mõõtmisel jäid masina seadistused samaks, kuid kasutati ZP mõõtmise režiimi ning kahte kaamerapositsiooni.

2.2.6 Valgu kontsentratsiooni määramine fraktsioonides

Proovide valgu kontsentratsiooni määrati Bradfordi meetodil, kasutades Quick Start™ Bradford Protein Assay (Bio-Rad, Ameerika Ühendriigid) komplekti. Kalibratsioonikõvera tegemiseks kasutati BSA (veise seerumi albumiin, ingl k *bovine serum albumin*) lahjenduste seeriat 1; 0.5; 0.25; 0.125 mg/ml. Lahjenduste tegemiseks kasutati 1x PBS-i. Taustaneeldumise mõõtmiseks kasutati samuti 1x PBS-i. 96-kaevuga plaadile pipeteeriti proovid ja kalibratsioonikõvera jaoks lahjendused kolmes tehnilises korduses mahuga 5 µl,

millele lisati 95 µl Bradfordi reagenti. Proovidega plaat inkubeeriti pimedas 10min ning seejärel mõõdeti valguse neelduvust 620 nm lainepikkuse juures. Lahjenduste seeria mõõtmistulemuste alusel koostati kalibratsioonikõver ning selle põhjal arvutati proovide valgukontsentratsioonid. Nii kalibratsioonikõvera koostamisel kui ka proovide kontsentratsiooni arvutamisel kasutati kolme tehnilise replikaadi aritmeetilist keskmist.

2.2.7 Western blot analüüs

Western bloti puhul kasutati sisendina eelnevalt töötlemata EV proove, millele lisati 6x mitteredutseerivat Laemmli puhvrit, nii et puhvri lõppkontsentratsioon lahuses oli 1x, ning kuumutati 5 min temperatuuril 95°C. Proovid lahutati geelelektroforeesil 12 %-SDS (naatriumdodetsüülsulfaat, ingl k *sodium dodecyl sulfate*)-polüakrüülamiidgeelis ja kanti üle PVDF membraanile (Thermo Scientific, USA). Ülekanne toimus BIO-RAD (Bio-Rad Laboratories, Philadelphia, PA, USA) aparaadiga 25 min jooksul konstantsel pingel (25V). Pärast ülekannet blokeeriti membraani 5 % lõssipulbri või 5 % BSA lahusega PBST puhvril (0,05% Tween-20 1xPBS-is) 1 tund toatemperatuuril ning seejärel inkubeeriti membraane primaarsete antikehadega (Tabel 1) 5 % lõssi-PBST või 5 % BSA-PBST lahuses. Inkubatsioon antikehadega toimus üleöö temperatuuril 4°C. Järgnevalt pesti membraani PBST lahuses 3 korda 5 min vältel. Pärast pesu inkubeeriti membraane mädarõika peroksidaasiga märgistatud sekundaarsete antikehadega (Tabel 1) 5% lõssi-PBST või 5 % BSA-PBST lahuses 1 tund toatemperatuuril. Inkubatsiooni järel pesti membraane PBST lahuses 3 korda 5 min. Valkude detekteerimiseks kasutati ECL Select Western Blotting Detection Reagent-i (GE Healthcare, Ühendkuningriik), järgides tootja protokollit ning pildid tehti ImageQuant™ RT ECL Imager (GE Healthcare, UK) aparaadiga.

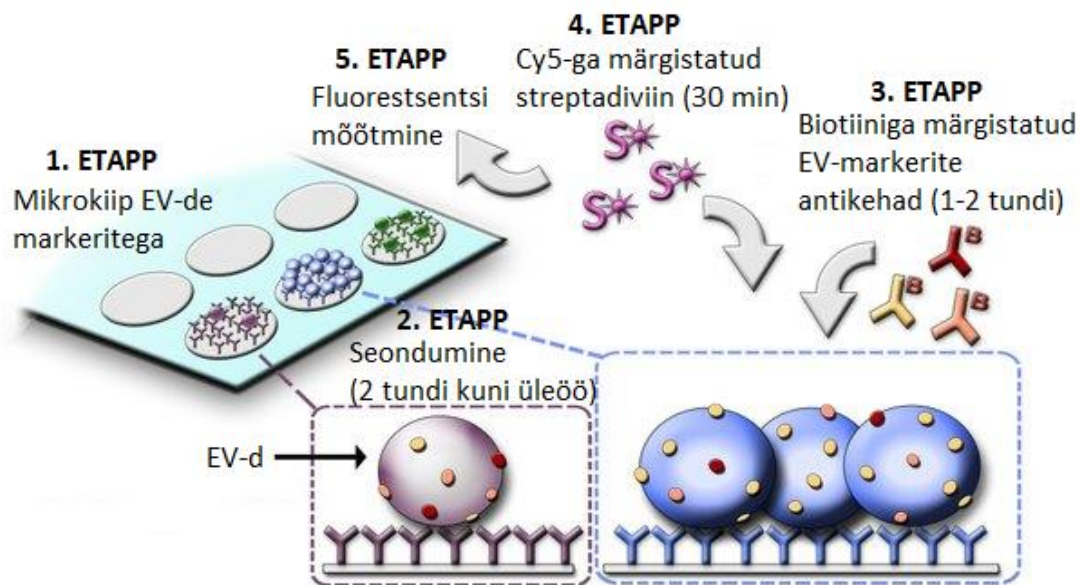
Tabel 1. Western blot-is kasutatud antikehad

Primaarne antikeha	Lahjendus	Blokeerimis-lahus	Peremees-loom	Tootja	Kataloogi number
CD9	1:250	Lõss	Hiir	Santa Cruz Biotechnology, USA	sc-59140
CD63	1:1000	Lõss	Hiir	BD Biosciences, USA	556019
CD81	1:500	Lõss	Hiir	BD Biosciences, USA	555675
ApoA1	1:100	Lõss	Hiir	Santa Cruz Biotechnology, USA	sc-376818

Albumiin	1:10 000	Lõss	Küülik	ProteinTech Group, USA	16475-1-AP
Sekundaarne antikeha	Lahjendus	Blokeerimis- lahus	Peremees- loom	Tootja	Kataloogi number
Goat anti-Mouse IgG	1:10 000	Lõss	Kits	Thermo Fischer Scientific, USA	G21040
Goat anti-Rabbit IgG	1:2000	BSA	Kits	GE Healthcare Life Sciences, Ühendkuningriik	NIF824

2.2.8 EV Array

EV-de pinnamarkerite uurimiseks kasutati mikrokiip-tehnoloogiat (Jørgensen *et al.*, 2013). EV Array mikrokiibi analüüsid teostati koostööpartnerite poolt Aalborgi Ülikooli Haiglas, Taanis. Vereseerumi proovid transporditi Aalborgi Ülikooli kuival jääl 24 tunni jooksul. Lühidalt kirjeldatuna on EV array tööpõhimõte järgmine (Joonis 5). Mikrokiibile on prinditud tüüpiliste EV markerite (CD9, CD63 ja CD81) vastased antikehad, mille abil seotatakse proovis olevad EV-d. Ülejäänud materjal pestakse kiibilt maha. Järgnevalt voolutatakse kiipi detekteeritavate markerite vastaste antikehadega, mis on konjugeeritud biotiiniga. Mikrokiip on jagatud seksioonideks ning igat seksiooni voolutatakse erineva markeri vastase antikehaga. Seejärel voolutatakse kiipi streptavidiiniga konjugeeritud tsüaniinvärviga (Cy5) ning mõõdetakse fluorestsentssignaali tugevust, mis võimaldab hinnata vastava EV pinnamarkeri suhtelist hulka kõikide kiibiga seotud EV-de seas. Tulemusi esitatakse Cy5 fluorestsentssignaali suhtelise intensiivsuse negatiivse kontrolli suhtes.



Joonis 5. EV Array tööpõhimõte ((EV Array, 2017), kohandatud).

2.2.9 Transmissioonelektronmikroskoopia

EV proovide fikseerimiseks segati need 1:1 vahekorras kokku 4 % paraformaldehüüdi lahusega (4 % paraformaldehüüd 1x PBS-s). Transmissioon-elektronmikroskoopia (TEM) teostati koostööpartnerite poolt Poola Teaduste Akadeemia hormonaalsete toimemehhanismide töörühmast. Fikseeritud proovide transport teostati 24 tunni vältel ligikaudu 4°C temperatuuriga keskkonnas.

Tilk EV-de proovi asetati formovarvaigu ja süsinikuga kaetud võrkudele elektronmikroskoopia jaoks (200 mesh grids) (Agar Scientific, Stansted, UK) ning lasti sellel imenduda 20 minuti jooksul. Seejärel fikseeriti nanopartiklid Karnovski fiksaatoriga (2 % paraformaldehüüd, 1 % glutaaraldehüüd; Sigma-Aldrich, Saksamaa; Polysciences, USA), ning kontrasteeriti uranüüloksalaadiga (4 % uranüülatsetaat (Polysciences, USA), 0.15 M oksaalhape (Sigma-Aldrich, Saksamaa). Partiklid kaeti metüülselluloosi (Sigma-Aldrich, Saksamaa) ja uranüülatsetaadi seguga. EV-sid vaadeldi JEM 1400 transmissioon-elektronmikroskoobiga (JEOL Ltd., Jaapan) ning jäädvustati digitaalkaameraga (Moradaq TEM CCD Camera, Olympus, Saksamaa).

2.2.10 RNA eraldamine

RNA eraldati kasutades miRNeasy Micro Kit'i (Qiagen, Saksamaa) vastavalt modifitseeritud protokollile (Helwa *et al.*, 2017). EV proovile (~200 µl) lisati 5 osa QIAzol lüüsireagenti, segati ja inkubeeriti toatemperatuuril 5 min. Seejärel lisati kloroformi prooviga samas mahus, segati korralikult ja inkubeeriti toatemperatuuril 3 min. Saadud segu

tsentrifuugiti kiirusel 12,000 x g 15 min temperatuuril 4°C. Seejärel eemaldati tekkinud vesifaas ning sellele lisati 100 % etanooli 1.5 kordses mahus. Saadud lahus pipeteeriti RNeasy MinElute spin kolonnile ning tsentrifuugiti 8000 x g 15 sekundit toatemperatuuril. Eelnevat protsessi korrati 700 µl kaupa kuni kogu lahus oli kolonnist läbi voolutatud. Seejärel voolutati kolonni järjestikku Buffer RWT, Buffer RPE ja 80% etanooli lahustega, et pesta membraanile seondunud RNA-d (8000 x g, 15 sekundit toatemperatuuril). Pärast membraani kuivatamist elueeriti RNA kasutades 25 µl nukleasivaba vett tsentrifuugides kiirusega 21,000 x g 1min jooksul toatemperatuuril.

RNA profiil määrati ja kontsentratsiooni mõõdeti Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Ameerika Ühendriigid) automaatelektroforeesi aparaadiga kasutades Agilent RNA 6000 Pico Kit'i. Lisaks kasutati RNA kontsentratsiooni mõõtmiseks ka Qubit® 2.0 fluoromeetrit, mille tarbeks töödeldi proove Qubit™ RNA HS Assay Kit'ga sarnaselt Li *et al.* modifitseeritud protokollile (Li *et al.*, 2015). 0.5 ng/µl ja 0 ng/µl referentslahused valmistati vastavalt tootja juhiste, kuid mõõdetavatele proovidele lisati 5 ng *spike-in* RNA-d (2.5 ng/µl referentslahus), et lõplik RNA kontsentratsioon oleks Qubit® 2.0 fluoromeetriga mõõdetavas vahemikus. Esialgse RNA kontsentratsiooni arvutamiseks mõõdeti nii uuritavate proovide (*spike-in* RNA-ga) kui ka *spike-in* lahuse kontsentratsioon, ning uuritavate proovide tulemusest lahutati *spike-in* proovi tulemus.

2.2.11 Statistiline analüüs

Saadud andmete analüüsi teostati kasutades „R Studio“ ja „Microsoft Excel“ tarkvara. Füüsikaliste omaduste uurimiseks ning antikehade, füüsikaliste omaduste ja patsientide vanuste omavaheliste korrelatsioonide leidmiseks ning regressioonikõverate tegemiseks kasutati „R Studiot“, dispersioonianalüüsi (ANOVA) ja t-testi jaoks kasutati MS Excelit. Tulemusi peeti statistiliselt oluliseks $p \leq 0.05$ korral.

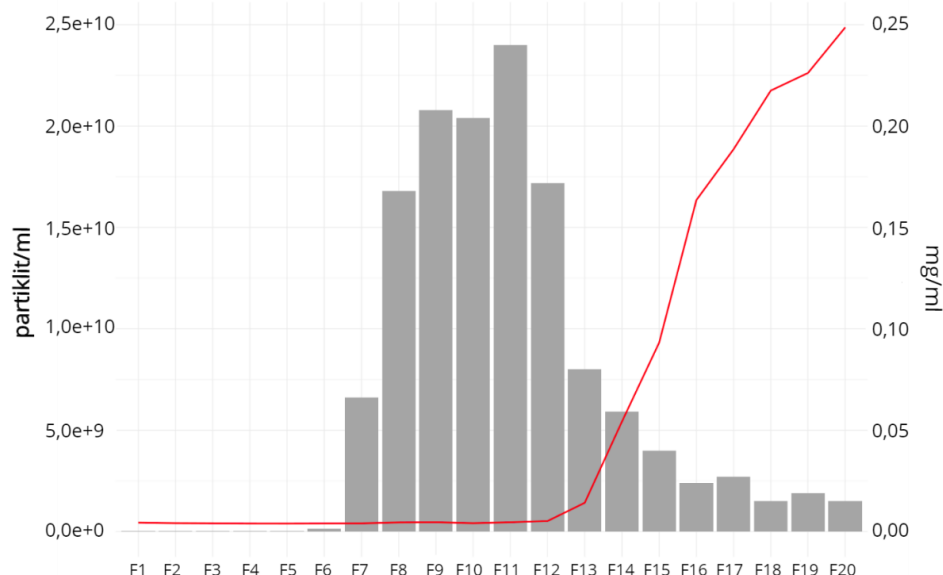
2.3 Tulemused

2.3.1 EV-de fraktsioonide iseloomustamine

2.3.1.1 EV-de suuruste jaotus fraktsioonides

EV-proovide jaoks optimaalsete fraktsioonide leidmiseks tehtud partiklite ja valgu kontsentratsiooni mõõtmised fraktsioonide lõikes näitasid, et enim partikleid leidis fraktsioonides 8-12, valgukontsentratsioon hakkas tõusma 13. fraktsioonist (Joonis 6).

Nanopartiklid leidsid alates 6. fraktsioonist viimase fraktsioonini välja ning selle põhjal võib arvata, et lisaks vesiikulitele esines proovis veel teisigi partikleid nagu lipoproteiinid, suuremad valgud ja valguagregaadid. Lähtudes saadud tulemustest uuriti western blot analüüsi kasutades põhjalikumalt fraktsioone 7-13.

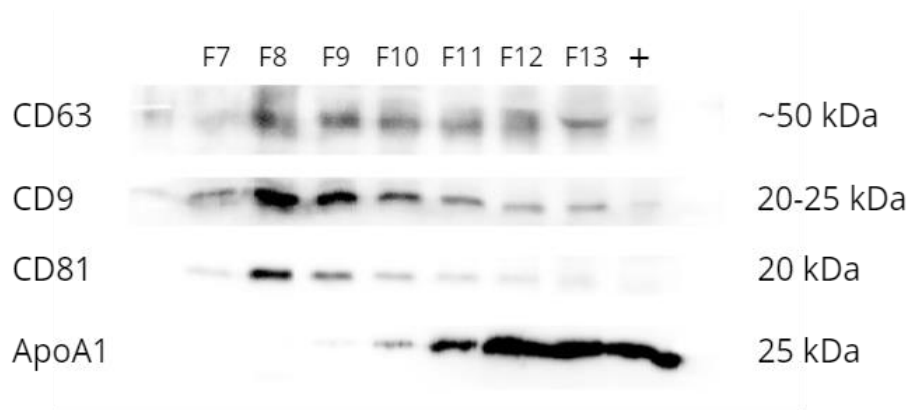


Joonis 6. Partiklite ja valgukontsentratsioon fraktsioonide lõikes. Graafiku tulpdiaagramm näitab partiklite kontsentratsiooni fraktsioonides (F1 kuni F20) ning punane kõver tähistab valgukontsentratsiooni fraktsioonides.

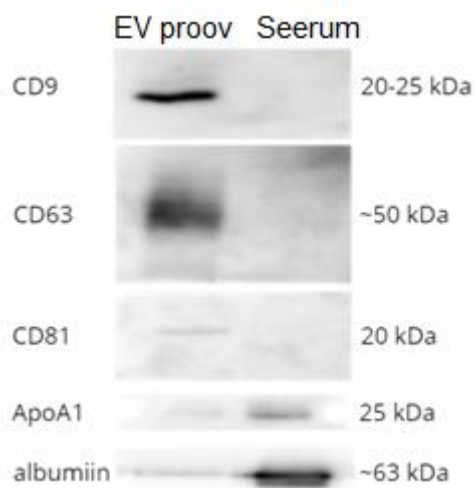
2.3.1.2 EV-markerite jaotus fraktsioonides

EV pinnamarkerite uurimisel fraktsioonide lõikes selgus, et tugevamad pinnamarkerite signaalid olid fraktsioonidel 8 (CD81 ja CD9) ning 9-11 (CD63) (Joonis 7). Selgelt eristusid ka HDL-rikkad fraktsioonid. Alates 11. fraktsioonist on tugevalt näha ApoA1 signaal. Nende tulemuste alusel valiti järgnevateks uuringuteks fraktsioonid 7-10.

EV proovide ehk kokkusegatud fraktsioonide 7-10 võrdluses vereserumiga on näha, et EV-proovides on võrdlemisi väiksemas koguses ApoA1 ja veres levinud valku albumiini, kuid EV pinnamarkereid (CD9 ja CD63) on rohkem. Vereseerumis oli valgusignaalide jaotus vastupidine – ApoA1 ja albumiinil oli signaal tugevam ning EV pinnamarkerite signaal polnud tuvastatav (Joonis 8). Võrdlus näitas meile, et eelnevalt kirjeldatud EV-de eraldamine oli efektiivne.



Joonis 7. Western blot'i tulemused fraktsioonide lõikes. Fraktsioonidele 7 kuni 13 (F7 – F13) teostatud western blot analüüsi tulemustel on näha EV-de pinnamarkerite (CD63, CD9, CD81) tugev signaal fraktsioonides 8 kuni 11 (F8-F10), ning HDL markeri ApoA1 tugev signaal alates 11. fraktsioonist (F11).

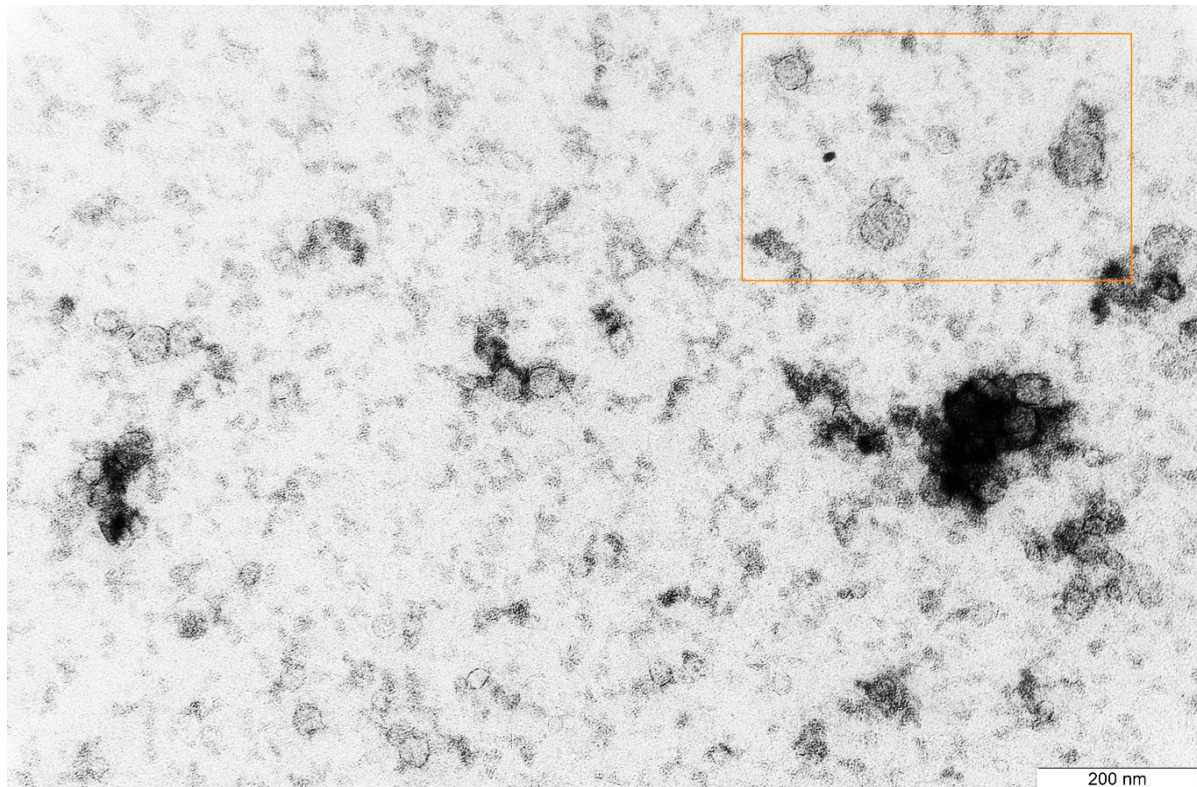


Joonis 8. EV proovis (vasakul) oli EV pinnamarkerite signaal tugevam kui vereseerumis (paremal). Vereseerumis leiduvate valkude ApoA1 ja albumiini signaalid olid puhastatud EV proovides nõrgad võrreldes vereseerumiga.

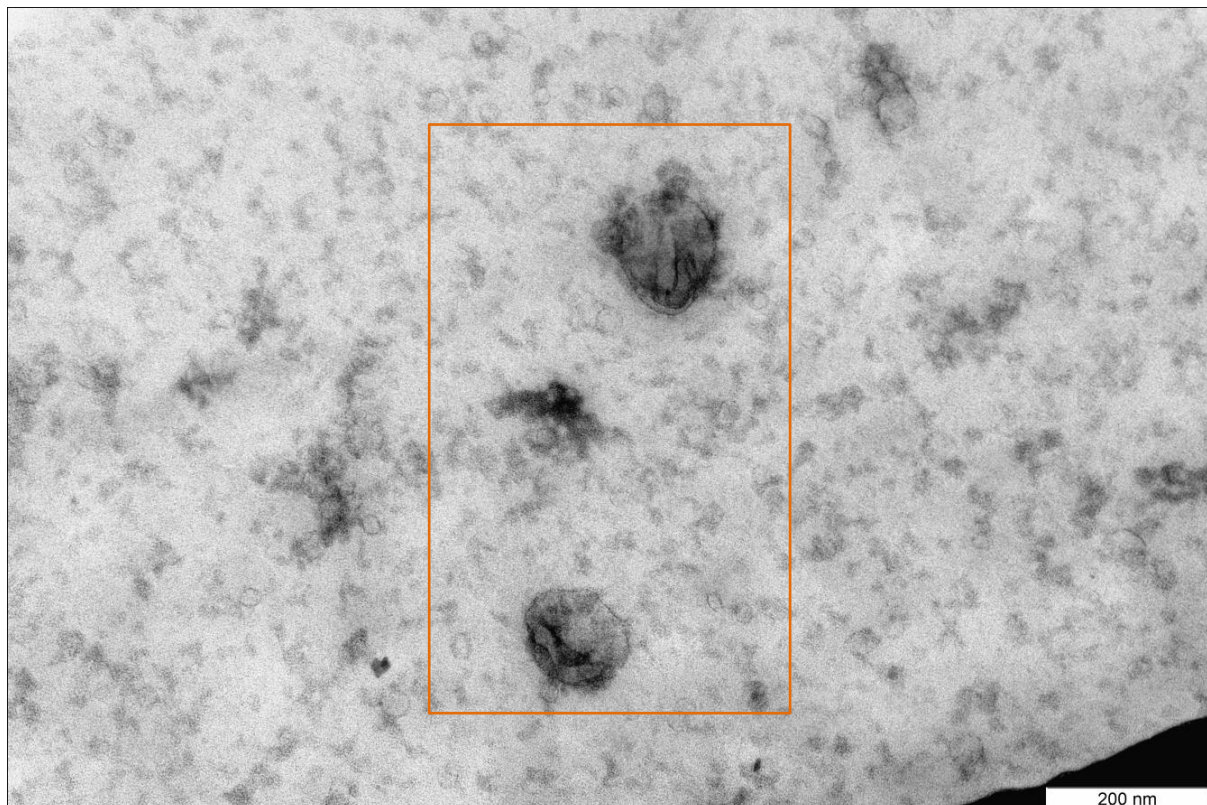
2.3.2 Transmissioonelektronmikroskoopia

Transmissioonelektronmikroskoopiasse saadeti puhastatud EV-proovidest fraktsioonidest 100 µl. TEM-i piltidel on EV-d nähtavad taustast kontrastsema servaga korrapäraste ümarate struktuuridena. Sageli tekib EV-desse eelneva töötamise tõttu nõgu, mida on võimalik näha ka TEM piltidel (Wu, Deng and Klinke, 2015). Proovidest saadud transmissioonelektronmikroskoopia piltidel on näha ligikaudu 50-100 nm läbimõõduga

tumede äärtega ümarad struktuurid, millest osa on ka nõgusad (Joonis 10). Lisaks EV-dele on võimalik näha pildidel ka erinevate soolade ja valkude agregate (Joonis 9, Joonis 10).



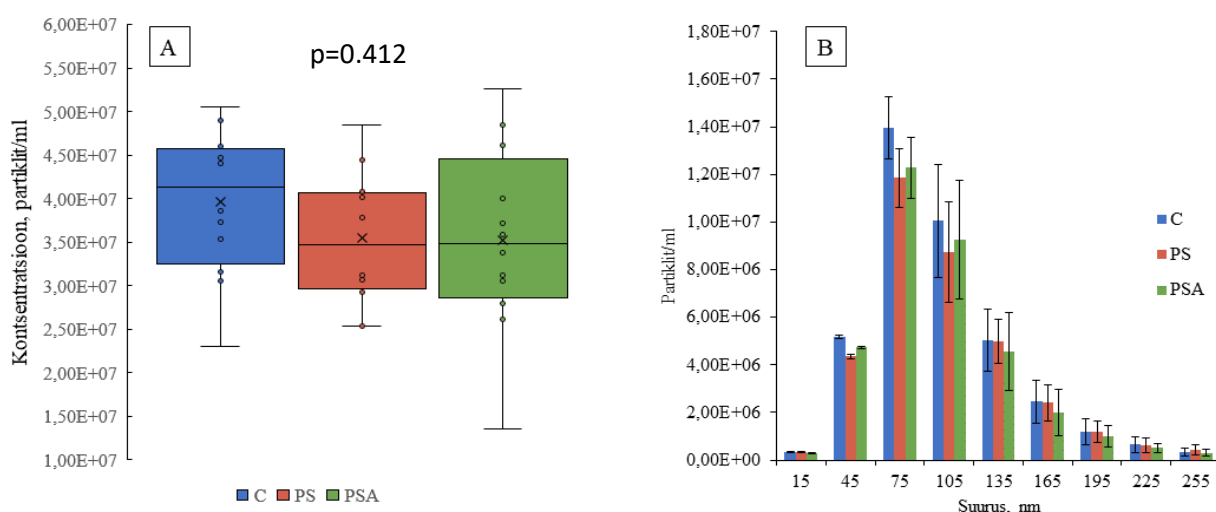
Joonis 9. TEM pildil on näha umbes 50-70 nm läbimõõduga EV-d (punases ristkülikus). Saadud kujutisel on selgelt näha kontrastsema servaga korrapärase kujuga ümarad struktuurid. Eristuvad ka tumedad ebakorrapärsed kogumikud, mis on soolade või valkude agregaadid.



Joonis 10. Pildil on näha kaks kontrastse servaga nõgusat EV-d (punases ristkülikus), mille läbimõõt on ligikaudu 100 nm. Näha on ka soolade või valkude ebakorrapäraseid agregate.

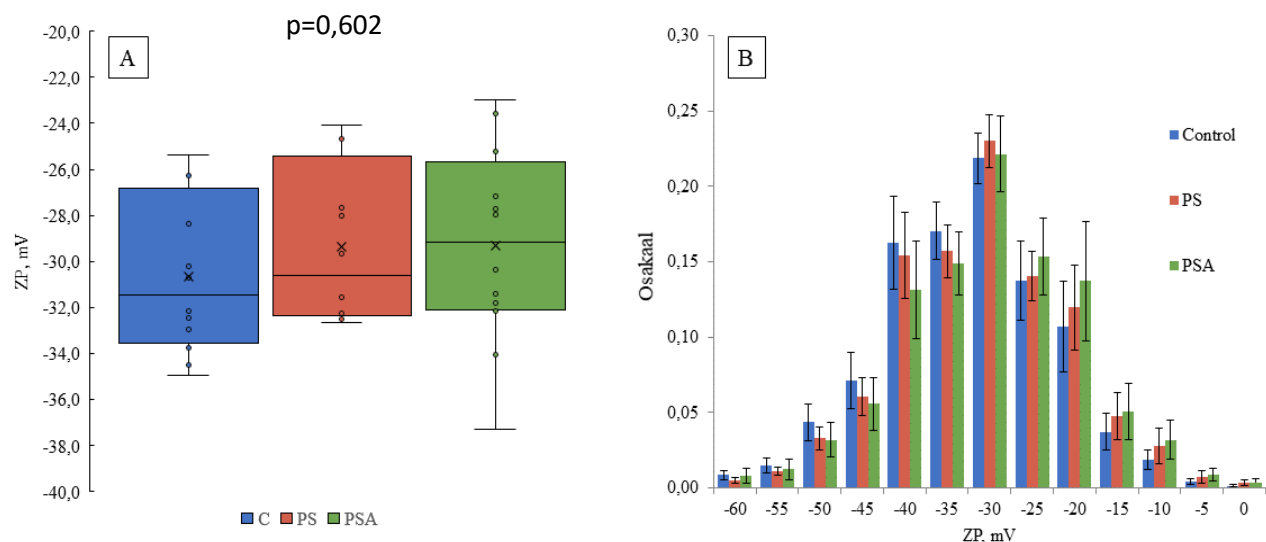
2.3.3 EV-de omadused erinevates uuringu rühmades

EV-de kontsentratsiooni ning suuruse ja ZP jaotuse analüüs põhines NTA mõõtmiste tulemustel (Lisa 1). Partiklite kontsentratsioon varieerus suuresti nii rühmasiseselt kui ka rühmade vahel, mis võis olla tingitud nii patsientide füsioloogilistest eripäradest kui ka EV-de puhastamise protsessi tehnilisest variatsioonist. PS, PSA ja kontrollrühma keskmised kontsentratsioonid olid võrdelimi sarnased, vastavalt: $3.54 \times 10^7 \pm 4.28 \times 10^6$, $3.52 \times 10^7 \pm 6.07 \times 10^6$ ning $3.96 \times 10^7 \pm 4.73 \times 10^6$ partiklit/ml (Joonis 11A). Teostatud dispersioonanalüüs ei näidanud statistiliselt olulisi erinevusi rühmade vahel ($p=0.412$). EV-de suuruse jaotuse analüüs põhines partiklite kontsentratsiooni mõõtmiste tulemustel, mis olid jaotatud 30 nm vahemikeks (Joonis 11B). Partiklite suuruse jaotuses ei esinenud samuti olulisi erinevusi rühmade vahel. Sarnaselt suuruse jaotusele võrreldi ka proovide keskmist ZP-d ning erinevate ZP väärtustega partiklite suhtelist osakaalu proovides. (Joonis 12A-B). PS, PSA ja kontrollrühma keskmised ($\pm 95\%$ usaldusintervall) ZP väärtused olid vastavalt -30.67 ± 1.91 mV, -29.34 ± 1.94 mV ning -29.31 ± 2.44 mV. Lisaks võrreldi ka EV proovidest eraldatud RNA saagist. Sarnaselt partiklite kontsentratsioonile, varieerus RNA kontsentratsioon kõikides proovides suurel määral. PS, PSA ja kontrollrühma keskmised ($\pm 95\%$ usaldusintervall) RNA saagised olid vastavalt 0.24 ± 0.08 ng/ μ l, 0.36 ± 0.15 ng/ μ l ning 0.25 ± 0.15 ng/ μ l. Dispersioonanalüüsi tulemusena ei tuvastatud erinevusi rühmade vahel ($p=0.355$) (Joonis 13).

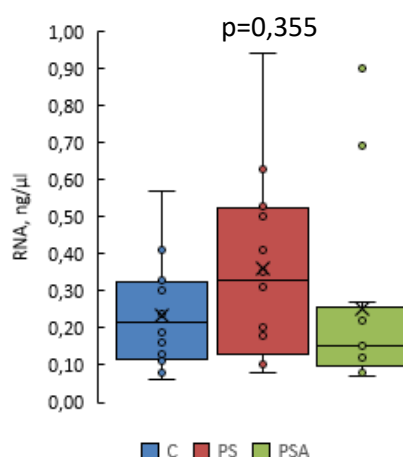


Joonis 11. Partiklite kontsentratsioon ja suuruse jaotus EV proovides (A). Karp-vurrud diagrammina on esitatud partiklite üldine kontsentratsioon mõõdetud EV proovides. (B) Mõõdetud EV proovide nanopartiklite suuruse jaotus 30nm vahemike kaupa. Esitatud on

rühmade aritmeetilised keskmised $\pm$ 95% usaldusintervallid. PS – naastulise psoriaasi rühm (N=12); PSA – naastuline psoriaas + psoriaatiline artriit patsientide rühm (N=12); C - kontrollrühm (N = 12).



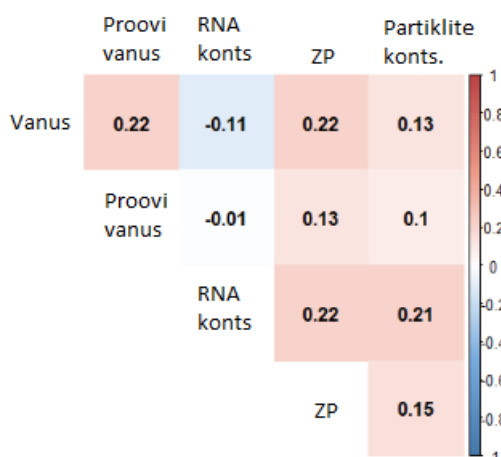
Joonis 12. EV proovide keskmised zetapotentsiaali (ZP) väärtused ja ZP väärtuste jaotus proovides. (A) Karp-vurrud diagrammina on esitatud mõõdetud EV proovide keskmine ZP väärtus. (B) Mõõdetud EV proovide erinevate ZP väärtustega partiklite suhteline jaotus 5mV vahemike kaupa. Esitatud on rühmade keskmine osahulgad $\pm$ 95% usaldusintervallid. PS – naastulise psoriaasi rühm (N=12); PSA – naastuline psoriaas + psoriaatiline artriit patsientide rühm (N=12); C - kontrollrühm (N = 12).



Joonis 13. EV proovidest eraldatud RNA kontsentratsioon esitatud karp-vurrud diagrammina. PS – naastulise psoriaasi rühm (N=12); PSA – naastuline psoriaas + psoriaatiline artriit patsientide rühm (N=12); C - kontrollrühm (N = 12).

2.3.4 Patsientide vanuse ja proovide hoiustamise aja mõju EV-de omadustele

Järgmisena uuriti patsientide vanuse ja vereseerumi proovide hoiustamise aja võimalikke seoseid eelnevalt määratud EV-de omadustega (Lisa 1). Korrelatsioonianalüüsid teostati kasutades R-i. Seoste iseloomustamiseks kasutati Pearsoni korrelatsioonikordajat (Rootalu, 2014). Analüüsi kaasati kõik EV proovid sõltumata rühmast. Seos loeti tugevaks, kui korrelatsioonikordaja absoluutväärtus oli 0.75 või kõrgem, keskmiseks, kui korrelatsioonikordaja absoluutväärtus jäi 0.75 ja 0.5 vahele, ning nõrgaks, kui korrelatsioonikordaja absoluutväärtus jäi 0.5 ja 0.3 vahele. Kõiki proove korraga analüüsides ei tuvastatud märkimisväärsed korrelatsioone (Joonis 14).



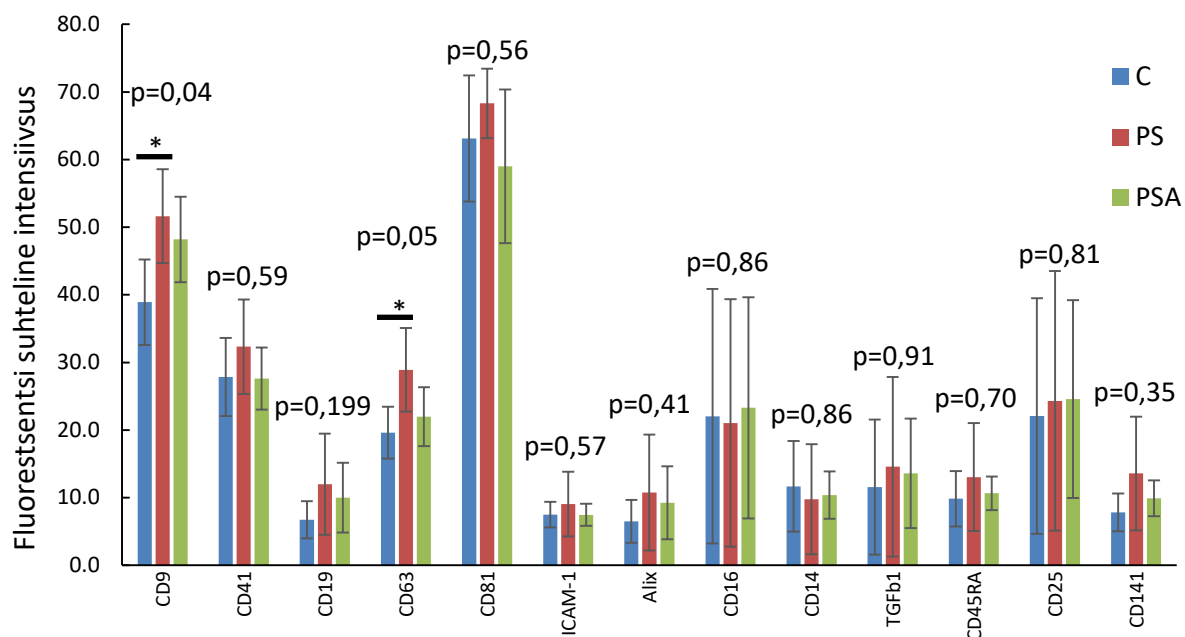
Joonis 14. EV-de füüsikaliste omaduste, patsientide vanuse ning seerumiproovi hoiustamisaja vaheliste seoste korrelatsioonimaatriks. Väärtused ruutudes on Pearsoni korrelatsioonikordajaväärtused. Punased toonid tähistavad korrelatsiooni positiivset korrelatsiooni ning sinised toonid tähistavad negatiivset korrelatsiooni, vastavalt joonisel olevale värviskaalale.

2.3.5 EV-de pinnamarkerite kvantiteerimine

EV Array mikrokiip võimaldas kvantiteerida 30 erinevat pinnavalku, mille loetelu on toodud Lisas 2. Edasisse analüüsi kaasati vaid nende valkude mõõtmistulemused, mille korral ületas mõõtmistulemus mürataseme vähemalt 8 proovi puhul vähemalt ühes rühmas. Edasisse analüüsi kaasati seega 13 pinnavalgu mõõtmistulemused. Kahe proovi (PS10 ja PSA12) puhul EV Array analüüs ebaõnnestus - fluorestsentssignaal oli üleküllastunud kõikide markerite lõikes.

Statistiliselt oluliste erinevuste tuvastamiseks rühmade vahel kasutati dispersioonianalüüsi ning leiti, et oluline erinevus kolme rühma lõikes esineb CD9 ja CD63 puhul (p-väärtused vastavalt 0,04 ja 0,05) (Joonis 18). Seejärel tehti t-test, et leida, milliste rühmade vahel statistiliselt olulised erinevused esinevad. Nii CD9 kui ka CD63 puhul oli

erinevus PS ja kontrollrühma vahel (p-väärtused vastavalt 0.019 ja 0.024), kus mõlemal juhul oli pinnamarkerite signaal tugevam PS rühmas.



Joonis 18. EV pinnamarkerite fluorestsentssignaalide keskmine suhteline intensiivsus ja 95% usaldusintervall rühmiti (C – kontrollrühm, N=12; PS – PS-patsientide rühm, N=11; PSA – PS+PSA patsientide rühm, N=11). Iga pinnamarkeri kohta tehti eraldi dispersioonianalüüs. Täрни ja joonega on tähistatud statistiline erinevus C ja PS vahel CD9 ja CD63 pinnamarkerite ekspressioonis (paariviisilise t-testi p-väärtused vastavalt 0.019 ja 0.024).

3 Arutelu

Antud magistritöö eesmärgiks oli uurida EV-de füüsikalisi omadusi ning pinnamarkereid, et saada uusi teadmisi EV-dest kui potentsiaalsetest biomarkerites PS ja PSA kontekstis.

Esmalt valideeriti EV-de puhastamise protokoll ja eraldati vastavalt sellele EV-d erinevate patsiendirühmade vereseerumist. Seejärel mõõdeti EV-de füüsikalised omadused ehk kontsentratsioon, suuruste profiil ja zeta-potentsiaali väärtus puhastatud proovides kasutades selleks nanopartiklite liikumisanalüüsi (ingl k *nanoparticle tracking analysis*, NTA) seadet. Spetsiifilisema lähenemisena kvantiteeriti valitud pinnavalkude suhteline hulk EV proovides EV Array meetodil. Lisaks sellele eraldati edasiste uuringute tarbeks EV proovidest RNA ning mõõdeti proovides oleva RNA kontsentratsioon.

Erinevad EV-de isoleermise meetodeid iseloomustavad varieeruv EV-de saagis ja spetsiifilisus (kaasnevad HDL, LDL ja valkude partiklid). Seeläbi mõjutab EV-de puhastamise meetodi valik ka järgnevate katsete raames saadud tulemusi (Buschmann *et al.*, 2018; Tian *et al.*, 2020). Nii on diferentsiaalsel ultratsentrifuugimisel saadavates proovides partiklite kontsentratsioon kaks kuni neli korda väiksem ning proovid sisaldavad suuremaid partikleid kui SEC-st saadavad proovid (Tian *et al.*, 2020). Viimaste puuduseks on proovide madalam puhtus. Lähtuvalt olemasolevast algmaterjali kogusest valiti selles töös EV-de isoleerimiseks SEC meetod, mis tagas vähese sisendmaterjali hulga juures mõistliku saagikuse ja proovide puhtuse.

Füüsikaliste omaduste uurimisel ei ilmnunud uuritavate rühmade vahel statistiliselt olulisi erinevusi. Varasemalt publitseeritud uuringud on näidanud EV suurustemuutust *in vitro* põletikuliste tsütokiinidega stimuleeritud keratinotsüütides (Mangino *et al.*, 2019). Samas pole leitud erinevusi veres EV-de hulgas ja nende suuruses PS-i kergete ja raskekujuliste haiguskulgede vahel (Jacquin-Porretaz *et al.*, 2019). Ka käesolevas töös ei nähtud olulisi erinevusi EV-de kontsentratsiooni ja suuruse vahel võrreldud rühmade lõikes.

sRNA kontsentratsiooni osas leidub varasematest publikatsioonidest andmeid vähe, kuna enamasti on kvantiteeritud partiklites sisalduvat miRNA-de suhtelist hulka (Chen *et al.*, 2019; Pasquali *et al.*, 2020). Küll on aga täheldatud, et EV-dest saadav RNA kogus ei sõltu proovimahust (Helwa *et al.*, 2017), kuid võib olla mõjutatud EV-de kontsentratsioonist ning heterogeensusest, kuna sõltuvalt doonorakkude füsioloogilisest olekust, võivad vesiikulid sisaldada nii suuremat RNA hulka kui tavaliselt kui ka võivad RNA-d sisaldavad vesiikulid täiesti puududa (Kumar *et al.*, 2020).

Kuigi ZP-d on EV-de kontekstis põhjalikult uuritud, on ZP mõõtmistulemusi erinevate haigustega, sh psoriaasiga, seostada püütud vähe. Käesolevas töös ei ilmnunud ZP

mõõtmistulemustes olulisi erinevusi rühmade vahel, kuid tegemist on potentsiaalse füüsikalise parameetriga, mida EV-de kui biomarkerite kontekstis uurida. Varasemas uuringus on näidatud, et sarnaselt rakkude analüüsiga voolutsütomeetrias saab EV-de ZP-d ja suurust mõõta iga partikli kohta eraldi ning selle kaudu iseloomustada vesiikulite populatsioone proovis (Vogel *et al.*, 2017).

Kõige rohkem on EV-de puhul uuritud nende sisemuses peituvaid valke ning nukleiinhappeid ning ka nende pinnal olevaid membraanseid valke. Osad neist valkudest on määratletud klassikalisteks EV-de pinnamarkeriteks (CD9, CD63, CD81), mis esinevad enamike EV-de pinnal sõltumata nende päritolust. (Kowal *et al.*, 2016). Käesolevas töös leiti statistiliselt olulisi erinevusi CD9 ja CD63 pinnavalkude suhtelises hulgas PSgrupi ja kontrollgrupi vahel. Arvestades, et mõlemat peetakse EV-de markeriks, võiks oletada, et see võib viidata teadmata EV alampopulatsiooni suuremale kontsentratsioonile. Kuna olulisi erinevusi partiklite kontsentratsioonis ei ilmnenud, siis võib oletada, et PS rühmas on vesiikulite teke osadest rakupopulatsioonidest suurem kui kontrollrühma patsientidel. On näidatud, et CD63 tase vereliistakutest pärinevate mikropartiklite pinnal korreleerub positiivselt IL-12 ja IL-17 tasemega PS patsientide veres (Papadavid *et al.*, 2016). PS tekkes on oluline osa IL-17 tsütokiinil, mis soodustab keratinotsüütide ebanormaalsel proliferatsioonil. CD9 ekspressiooni uurimisel nahas on varasemalt leitud, et CD9 üleekspressiooni korral surutakse alla keratinotsüütide migreerumist (Jones, Bishop and Watt, 1996), kuid PS puhul on täheldatud hoopis keratinotsüütide migratsiooni intensiivistumist (Duvic *et al.*, 1997). Käesoleva töö raames jääb selgusetuks, kas vereseerumist eraldatud EV-de pinnal oleva CD9 hulk võib olla seotud psoriaatilises nahas toimuvate protsessidega. Käesoleva töö üheks puuduseks on tagasihoidlik valimi suurus ning mõõtmistulemuste hajuvus. Täpsemate tulemuste saamiseks oleks vajalik kaasata uuringusse rohkem patsiente või kasutada suuremat proovikogust patsiendi kohta.

Antud töös esitatud tulemuste põhjal ei leia EV-de roll PS ja PSA biomarkeritena kinnitust, kuid täiendavaid teadmisi lisab järgnev planeeritud EV-de sRNA sekveneerimine. Vereseerum on hea materjal EV-de uurimiseks, kuna proovi võtmine on patsiendile võrdlemisi vähe invasiivne protseduur ja proovimaterjali saab vajadusel võtta suuremates kogustes ning korduvalt. Lisaks sellele võib vereseerum sisaldada EV-sid erinevatest kudedest üle terve organismi, kuid EV-de heterogeensuse tõttu on raske määrata nende täpset rakulist päritolu. Eraldatud vesiikulite suurus, tüüp, arvukus sõltuvad kasutatud puhastusmeetodist (Kowal *et al.*, 2016). Rakuväliste vesiikulite omadused võivad sõltuda ka

haiguse olekust - aktiivne või remissiooni faas; ning patsiendi üleüldisest seisundist proovi võtmise ajal.

Vaatamata sellele kannavad EV-d endas olulist infot paljude protsesside kohta organismis ning biotehnoloogiate areng võimaldab järjest täpsemalt uurida EV-sid ja nende mõjusid organismis. Käesoleva töö tulemustest lähtudes võib pidada EV-de erinevuste leidmist PS ja PSA patsientide vahel tõenäoliseks ning edasised uuringud võiksid keskenduda haigusspetsiifilistele pinnamarkerite uurimisele ja kvantiteerimisele.

Kokkuvõte

Psoriaas on autoimmuune nahahaigus, mis esineb 2-4% maailma rahvastikust. Psoriaasi kõige tavalisem vorm on naastuline psoriaas, mida iseloomustavad eriteemsed ketendavad nahalaigud. Patsientidel võib esineda korraga mitu psoriaasivormi ning võivad kaasned teised haigused nagu diabeet. Psoriaasi tekke taga on nii geneetilised kui ka keskkonnast tulenevad tegurid. Nii võib vallanduda geneetilise eelsoodumusega inimesel psoriaas näiteks nahavigastuse tagajärjel. Haiguse tekkemehhanismis on oluline roll immuunrakkude vahendatud autoimmuunvastusel.

Psoriaatiline artriit on reumatoidfaktor-negatiivne artriit, mis esineb kuni 26% psoriaasihaigetest, kuid arvatakse, et kuni 15% psoriaasipatsientidest põeb artriiti enda teadmata. Haigus areneb välja tavaliselt pärast psoriaasi teket ning keskmiselt 80% psoriaatilise artriidi patsientidest esineb ka küünepsoriaas. Psoriaatilisel artriidil puuduvad väga selged tunnused, mis eristaksid seda teistest artriitidest.

EV-d on raku sisemusest või pinnalt vabanevad membraansed vesiikulid, millel on oluline roll rakkudevahelises suhtluses. Erinevad uuringud on näitanud, et EV-des sisalduvatel valkudel ja nukleiinhapetel on oma roll haiguste väljakujunemisel ja selle kulu mõjutamisel. EV-d jagunevad oma tekkemehhanismi, suuruse, sisaldise ja pinnamarkerite alusel kolmeks suuremaks rühmaks: eksosoomid, mikrovesiikulid ja apoptootilised kehad.

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida EV-de potentsiaali biomarkeritena psoriaasi ja psoriaatilise artriidi määramiseks ja haiguskulu jälgimiseks. Uurimuse käigus määrati EV-de suurust, zeta-potentsiaali, RNA sisaldust ning pinnavalkude ekspressiooni psoriaasipatsientidel ning psoriaatilist artriiti põdevatel patsientidel. Leiti üksikuid seoseid tunnuste vahel, kuid haiguste omavahelisteks eristamiseks ei olnud need piisavad. Statistiline tähtsus ilmnis kahe EV pinnamarkeri, CD63 ja CD9 erinevuses psoriaasipatsientide ja kontrollgrupi vahel. CD63 puhul on varasemalt täheldatud, et CD63 tase vereliistakutelt pärinevate mikropartiklitelt on positiivses korrelatsioonis psoriaasi tekkel osaleva IL-17-ga. CD9 ekspressiooni tõus on aga seotud keratinotsüütide migratsiooni allasurumisega, mis on psoriaasis toimuvale vastupidine. EV-de uurimine on haru, mis on jõudsalt arenemas tänu biotehnoloogilistele saavutustele teaduses. Ehkki erinevate rakupopulatsioonide EV-de kirjeldamine on hetkel veel keerukas, on kogunenud juba piisavalt teadmisi, et arendada välja diagnostilisi teste. See näitab EV-de potentsiaali biomarkeritena ning perspektiive edasisteks töödeks EV-dega.

Summary

Psoriasis is an autoimmune skin disease that affects 2-4% of the world's population. The most common form of psoriasis is plaque psoriasis, which is characterized by erythematous flaky patches of skin. Patients may have multiple forms of psoriasis at one time and may also be affected by comorbidities such as cardiovascular disease, diabetes and psoriatic arthritis. There are both genetic and environmental factors behind the onset of psoriasis. Thus, a person with a genetic predisposition may develop psoriasis, for example as a result of a skin injury. Immune-cell-mediated autoimmune responses play an important role in the mechanism of the disease.

Psoriatic arthritis is a rheumatoid factor-negative arthritis that occurs in up to 26% of psoriasis patients, but it is estimated that up to 15% of psoriasis patients have arthritis without their knowledge. The disease usually develops after the onset of psoriasis, and on average 80% of patients with psoriatic arthritis also have nail psoriasis. Psoriatic arthritis does not have very clear features that distinguish it from other arthritis.

EVs are membranous vesicles released from the inside or from the surface of a cell that play an important role in cell-to-cell communication. Various studies have shown that the protein and nucleic acid cargo of EVs mediates the pathogenesis of various diseases. The aim of this study was to investigate the potential of EVs as biomarkers for psoriasis and psoriatic arthritis. The study determined the size of EVs, zeta-potential, RNA concentration in vesicles and the relative abundance of selected surface proteins in psoriasis patients and patients with psoriatic arthritis in comparison to controls. Statistically significant differences were seen in case of two EV surface markers, CD63 and CD9, both of which were observed to be more abundant on the surface of EVs isolated from the blood serum of psoriasis patients compared to the control group. It has been previously observed that CD63 levels from platelet-derived microparticles are positively correlated with IL-17, which is involved in the development of psoriasis. CD9 overexpression has been associated with suppression of keratinocyte migration. EV research is thriving due to new advances in EV-related technologies. Although it is still difficult to differentiate between EVs from different cell populations, sufficient knowledge has already been accumulated to start developing diagnostic tests. This shows the potential of EVs as biomarkers and perspectives for further work with EVs.

KASUTATUD KIRJANDUS

Abji, F. *et al.* (2016) 'Brief Report: CXCL10 Is a Possible Biomarker for the Development of Psoriatic Arthritis Among Patients With Psoriasis', *Arthritis & Rheumatology*. John Wiley & Sons, Ltd, 68(12), pp. 2911–2916. doi: 10.1002/art.39800.

Akagi, T. *et al.* (2015) 'On-chip immunoelectrophoresis of extracellular vesicles released from human breast cancer cells', *PLoS ONE*. Public Library of Science, 10(4), p. e0123603. doi: 10.1371/journal.pone.0123603.

Alenius, G.-M., Eriksson, C. and Rantapää Dahlqvist, S. (2009) 'Interleukin-6 and soluble interleukin-2 receptor alpha-markers of inflammation in patients with psoriatic arthritis?', *Clinical and experimental rheumatology*. Italy, 27(1), pp. 120–123.

Alvarez-Erviti, L. *et al.* (2011) 'Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes', *Nature Biotechnology*, 29(4), pp. 341–345. doi: 10.1038/nbt.1807.

Amintas, S. *et al.* (2021) 'Next-Generation Cancer Biomarkers: Extracellular Vesicle DNA as a Circulating Surrogate of Tumor DNA', *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. Frontiers Media S.A., p. 1806. doi: 10.3389/fcell.2020.622048.

Asadullah, K. *et al.* (2004) 'Interleukin-10: An Important Immunoregulatory Cytokine With Major Impact on Psoriasis', *Current Drug Targets - inflammation & Allergy*, 3(2), pp. 185–192.

Baj-Krzyworzeka, M. *et al.* (2006) 'Tumour-derived microvesicles carry several surface determinants and mRNA of tumour cells and transfer some of these determinants to monocytes', *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 55(7), pp. 808–818. doi: 10.1007/s00262-005-0075-9.

Belov, L. *et al.* (2016) 'Extensive surface protein profiles of extracellular vesicles from cancer cells may provide diagnostic signatures from blood samples', *Journal of Extracellular Vesicles*. Taylor and Francis Ltd., 5(1). doi: 10.3402/jev.v5.25355.

Blais, M. E., Dong, T. and Rowland-Jones, S. (2011) 'HLA-C as a mediator of natural killer and T-cell activation: Spectator or key player?', *Immunology*. Immunology, pp. 1–7. doi: 10.1111/j.1365-2567.2011.03422.x.

Borges, F. T. *et al.* (2013) 'TGF- β 1-Containing exosomes from injured epithelial cells activate fibroblasts to initiate tissue regenerative responses and fibrosis', *Journal of the American Society of Nephrology*. J Am Soc Nephrol, 24(3), pp. 385–392. doi: 10.1681/ASN.2012101031.

Buschmann, D. *et al.* (2018) 'Evaluation of serum extracellular vesicle isolation methods for profiling miRNAs by next-generation sequencing', *Journal of Extracellular Vesicles*. Taylor and Francis Ltd., 7(1). doi: 10.1080/20013078.2018.1481321.

Capon, F. (2017) 'The genetic basis of psoriasis', *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG, p. 2526. doi: 10.3390/ijms18122526.

Chandran, V. *et al.* (2010) 'Soluble biomarkers differentiate patients with psoriatic arthritis from those with psoriasis without arthritis', *Rheumatology*, 49(7), pp. 1399–1405. doi: 10.1093/rheumatology/keq105.

Chandran, V. *et al.* (2019) 'Serum-based soluble markers differentiate psoriatic arthritis from osteoarthritis', *Annals of the Rheumatic Diseases*, 78(6), pp. 796 LP – 801. doi:

10.1136/annrheumdis-2018-214737.

Chang, C.-C. *et al.* (2012) ‘Downregulation of Inflammatory MicroRNAs by Ig-like Transcript 3 Is Essential for the Differentiation of Human CD8⁺ T Suppressor Cells’, *The Journal of Immunology*, 188(7), pp. 3042 LP – 3052. doi: 10.4049/jimmunol.1102899.

Chen, X.-M. *et al.* (2019) ‘Novel findings from determination of common expressed plasma exosomal microRNAs in patients with psoriatic arthritis, psoriasis vulgaris, rheumatoid arthritis, and gouty arthritis.’, *Discovery medicine*. United States, 28(151), pp. 47–68.

Cheung, K. L. *et al.* (2016) ‘Psoriatic T cells recognize neolipid antigens generated by mast cell phospholipase delivered by exosomes and presented by CD1a’, *Journal of Experimental Medicine*, 213(11), pp. 2399–2412. doi: 10.1084/jem.20160258.

Colombo, M., Raposo, G. and Théry, C. (2014) ‘Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles’, *Annual review of cell and developmental biology*. Annu Rev Cell Dev Biol, pp. 255–289. doi: 10.1146/annurev-cellbio-101512-122326.

Cretu, D. *et al.* (2018) ‘Differentiating Psoriatic Arthritis From Psoriasis Without Psoriatic Arthritis Using Novel Serum Biomarkers’, *Arthritis Care & Research*. John Wiley & Sons, Ltd, 70(3), pp. 454–461. doi: 10.1002/acr.23298.

Danielsen, K. *et al.* (2013) ‘Is the prevalence of psoriasis increasing? A 30-year follow-up of a population-based cohort’, *British Journal of Dermatology*. John Wiley & Sons, Ltd, 168(6), pp. 1303–1310. doi: 10.1111/bjd.12230.

Deng, S. *et al.* (2020) ‘Extracellular Vesicles: A Potential Biomarker for Quick Identification of Infectious Osteomyelitis’, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. Frontiers Media S.A., 10, p. 323. doi: 10.3389/fcimb.2020.00323.

Duvic, M. *et al.* (1997) ‘Molecular mechanisms of tazarotene action in psoriasis’, in *Journal of the American Academy of Dermatology*. Mosby Inc., pp. S18–S24. doi: 10.1016/S0190-9622(97)80396-9.

El-Komy, M. *et al.* (2020) ‘Upregulation of the miRNA-155, miRNA-210, and miRNA-20b in psoriasis patients and their relation to IL-17’, *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*. SAGE Publications Inc., 34. doi: 10.1177/2058738420933742.

Elder, J. T. *et al.* (2010) ‘Molecular Dissection of Psoriasis: Integrating Genetics and Biology’, *Journal of Investigative Dermatology*, 130(5), pp. 1213–1226. doi: <https://doi.org/10.1038/jid.2009.319>.

EV Array (2017). Available at: <https://evarray.dk/research.html> (Accessed: 18 May 2020).

Fan, Q. *et al.* (2018) ‘The emerging role of exosome-derived non-coding RNAs in cancer biology’, *Cancer Letters*, 414, pp. 107–115. doi: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.10.040>.

Fan, X. *et al.* (2008) ‘Fine mapping of the psoriasis susceptibility locus PSORS1 supports HLA-C as the susceptibility gene in the Han Chinese population’, *PLoS Genetics*. PLoS Genet, 4(3). doi: 10.1371/journal.pgen.1000038.

Farber, E. M., Nall, M. L. and Watson, W. (1974) ‘Natural History of Psoriasis in 61 Twin Pairs’, *Archives of Dermatology*, 109(2), pp. 207–211. doi:

10.1001/archderm.1974.01630020023005.

Fried, R. G. *et al.* (1995) 'Trivial or Terrible? The Psychosocial Impact of Psoriasis', *International Journal of Dermatology*. John Wiley & Sons, Ltd, 34(2), pp. 101–105. doi: 10.1111/j.1365-4362.1995.tb03588.x.

Ganguly, D. *et al.* (2009) 'Self-RNA-antimicrobial peptide complexes activate human dendritic cells through TLR7 and TLR8.', *The Journal of experimental medicine*, 206(9), pp. 1983–1994. doi: 10.1084/jem.20090480.

Gladman, D. D. (1991) 'Psoriatic arthritis', in Bellamy, N. (ed.) *Prognosis in the Rheumatic Diseases*. Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 153–166. doi: 10.1007/978-94-011-3896-3_7.

Gladman, D. D. *et al.* (2005) 'Psoriatic arthritis: epidemiology, clinical features, course, and outcome.', *Annals of the rheumatic diseases*, 64 Suppl 2(Suppl 2), pp. ii14-7. doi: 10.1136/ard.2004.032482.

Guðjónsson, J. E. *et al.* (2002) 'HLA-Cw6-Positive and HLA-Cw6-Negative Patients with Psoriasis Vulgaris have Distinct Clinical Features', *Journal of Investigative Dermatology*, 118(2), pp. 362–365. doi: <https://doi.org/10.1046/j.0022-202x.2001.01656.x>.

Gudjonsson, J. E. and Elder, J. T. (2007) 'Psoriasis: epidemiology', *Clinics in Dermatology*. Elsevier, 25(6), pp. 535–546. doi: 10.1016/J.CLINDERMATOL.2007.08.007.

Gupta, M. *et al.* (2011) 'Dyslipidemia and oxidative stress in patients of psoriasis', *Biomedical Research*, 22(2), pp. 222–225.

Gupta, M. A. and Gupta, A. K. (1995) 'Age and Gender Differences in the Impact of Psoriasis on Quality of Life', *International Journal of Dermatology*. John Wiley & Sons, Ltd, 34(10), pp. 700–703. doi: 10.1111/j.1365-4362.1995.tb04656.x.

Helwa, I. *et al.* (2017) 'A Comparative Study of Serum Exosome Isolation Using Differential Ultracentrifugation and Three Commercial Reagents', *PLOS ONE*. Public Library of Science, 12(1), p. e0170628. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170628>.

Henseler, T. and Christophers, E. (1995) 'Disease concomitance in psoriasis', *Journal of the American Academy of Dermatology*. Mosby, 32(6), pp. 982–986. doi: 10.1016/0190-9622(95)91336-X.

Hiemenz, P. C. and Rajagopalan, R. (1997) *Principles of Colloid and Surface Chemistry*. New York: Taylor and Francis Ltd.

Hughes, C. D. *et al.* (2020) 'P19 Frequencies of IL-17+CD8+ T-cells and tissue resident memory T-cells in early inflammatory arthritis', *Rheumatology*, 59(Supplement_2). doi: 10.1093/rheumatology/keaa111.018.

Husted, J. A. *et al.* (2001) 'Health-related quality of life of patients with psoriatic arthritis: A comparison with patients with rheumatoid arthritis', *Arthritis Care & Research*. John Wiley & Sons, Ltd, 45(2), pp. 151–158. doi: 10.1002/1529-0131(200104)45:2<151::AID-ANR168>3.0.CO;2-T.

Ichii, O. *et al.* (2012) 'Altered expression of microRNA miR-146a correlates with the development of chronic renal inflammation', *Kidney International*, 81(3), pp. 280–292. doi: <https://doi.org/10.1038/ki.2011.345>.

Jacquín-Porretaz, C. *et al.* (2019) 'Increased Levels of Interleukin-17A Exosomes in

Psoriasis.’, *Acta dermato-venereologica*. Sweden, 99(12), pp. 1143–1147. doi: 10.2340/00015555-3300.

Jones, P. H., Bishop, L. A. and Watt, F. M. (1996) ‘Functional significance of CD9 association with $\beta 1$ integrins in human epidermal keratinocytes’, *Cell Communication and Adhesion*. Taylor and Francis Inc., 4(4–5), pp. 297–305. doi: 10.3109/15419069609010773.

Jones, S. M. *et al.* (1994) ‘Psoriatic Arthritis: Outcome of Disease Subsets and Relationship of Joint Disease to Nail and Skin Disease’, *Rheumatology*, 33(9), pp. 834–839. doi: 10.1093/rheumatology/33.9.834.

Jørgensen, M. *et al.* (2013) ‘Extracellular Vesicle (EV) Array: microarray capturing of exosomes and other extracellular vesicles for multiplexed phenotyping.’, *Journal of extracellular vesicles*, 2. doi: 10.3402/jev.v2i0.20920.

Juan, T. and Fürthauer, M. (2018) ‘Biogenesis and function of ESCRT-dependent extracellular vesicles’, *Seminars in Cell and Developmental Biology*. Elsevier Ltd, pp. 66–77. doi: 10.1016/j.semcdb.2017.08.022.

Kagami, S. *et al.* (2010) ‘Circulating Th17, Th22, and Th1 Cells Are Increased in Psoriasis’, *Journal of Investigative Dermatology*, 130(5), pp. 1373–1383. doi: <https://doi.org/10.1038/jid.2009.399>.

Kalra, H., Drummen, G. and Mathivanan, S. (2016) ‘Focus on Extracellular Vesicles: Introducing the Next Small Big Thing’, *International Journal of Molecular Sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 17(2), p. 170. doi: 10.3390/ijms17020170.

Keller, S. *et al.* (2006) ‘Exosomes: From biogenesis and secretion to biological function’, *Immunology Letters*, 107(2), pp. 102–108. doi: <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2006.09.005>.

Kotzerke, K. *et al.* (2013) ‘Immunostimulatory activity of murine keratinocyte-derived exosomes’, *Experimental Dermatology*. John Wiley & Sons, Ltd, 22(10), pp. 650–655. doi: 10.1111/exd.12230.

Kowal, J. *et al.* (2016) ‘Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2016/02/08. National Academy of Sciences, 113(8), pp. E968–E977. doi: 10.1073/pnas.1521230113.

Kumar, S. R. *et al.* (2020) ‘RNA cargos in extracellular vesicles derived from blood serum in pancreas associated conditions’, *Scientific Reports*. Nature Research, 10(1), p. 2800. doi: 10.1038/s41598-020-59523-0.

Langley, R. G. B., Krueger, G. G. and Griffiths, C. E. M. (2005) ‘Psoriasis: epidemiology, clinical features, and quality of life’, *Annals of the Rheumatic Diseases*, 64(suppl 2), p. ii18 LP-ii23. doi: 10.1136/ard.2004.033217.

Levine, D. and Gottlieb, A. (2009) ‘Evaluation and Management of Psoriasis: An Internist’s Guide’, *Medical Clinics*. Elsevier, 93(6), pp. 1291–1303. doi: 10.1016/j.mcna.2009.08.003.

Li, J. *et al.* (2009) ‘Claudin-containing exosomes in the peripheral circulation of women with ovarian cancer’, *BMC Cancer*, 9(1), p. 244. doi: 10.1186/1471-2407-9-244.

Li, W. *et al.* (2017) ‘Role of exosomal proteins in cancer diagnosis’, *Molecular Cancer*, 16(1), p. 145. doi: 10.1186/s12943-017-0706-8.

- Li, X. *et al.* (2015) 'Lowering the quantification limit of the QubitTM RNA HS assay using RNA spike-in', *BMC molecular biology*. BioMed Central, 16, p. 9. doi: 10.1186/s12867-015-0039-3.
- Liang, Y., Pan, H. F. and Ye, D. Q. (2015) 'Tc17 cells in immunity and systemic autoimmunity', *International Reviews of Immunology*. Taylor and Francis Ltd, 34(4), pp. 318–331. doi: 10.3109/08830185.2014.954698.
- Linxweiler, J. and Junker, K. (2020) 'Extracellular vesicles in urological malignancies: an update', *Nature Reviews Urology*, 17(1), pp. 11–27. doi: 10.1038/s41585-019-0261-8.
- Liu, Y. *et al.* (2015) 'Downregulation of serum brain specific microRNA is associated with inflammation and infarct volume in acute ischemic stroke', *Journal of Clinical Neuroscience*, 22(2), pp. 291–295. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2014.05.042>.
- Luga, V. *et al.* (2012) 'Exosomes Mediate Stromal Mobilization of Autocrine Wnt-PCP Signaling in Breast Cancer Cell Migration', *Cell*, 151(7), pp. 1542–1556. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.11.024>.
- Mangino, G. *et al.* (2019) 'Interleukin-17A affects extracellular vesicles release and cargo in human keratinocytes', *Experimental Dermatology*. John Wiley & Sons, Ltd, 28(9), pp. 1066–1073. doi: 10.1111/exd.14015.
- Marton, N. *et al.* (2017) 'Extracellular vesicles regulate the human osteoclastogenesis: divergent roles in discrete inflammatory arthropathies', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74(19), pp. 3599–3611. doi: 10.1007/s00018-017-2535-8.
- McBride, J. D., Rodriguez-Menocal, L. and Badiavas, E. V (2017) 'Extracellular Vesicles as Biomarkers and Therapeutics in Dermatology: A Focus on Exosomes', *Journal of Investigative Dermatology*, 137(8), pp. 1622–1629. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jid.2017.04.021>.
- Mease, P. J. (2011) 'Measures of psoriatic arthritis: Tender and Swollen Joint Assessment, Psoriasis Area and Severity Index (PASI), Nail Psoriasis Severity Index (NAPSI), Modified Nail Psoriasis Severity Index (mNAPSI), Mander/Newcastle Enthesitis Index (MEI), Leeds Enthesit', *Arthritis Care & Research*. John Wiley & Sons, Ltd, 63(S11), pp. S64–S85. doi: 10.1002/acr.20577.
- Mease, P. J. and Menter, M. A. (2006) 'Quality-of-life issues in psoriasis and psoriatic arthritis: Outcome measures and therapies from a dermatological perspective', *Journal of the American Academy of Dermatology*, 54(4), pp. 685–704. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2005.10.008>.
- Meehan, K. and Vella, L. J. (2016) 'The contribution of tumour-derived exosomes to the hallmarks of cancer', *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. Taylor & Francis, 53(2), pp. 121–131. doi: 10.3109/10408363.2015.1092496.
- Di Meglio, P., Villanova, F. and Nestle, F. O. (2014) 'Psoriasis.', *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 4(8). doi: 10.1101/cshperspect.a015354.
- Moll, J. M. H. and Wright, V. (1973) 'Psoriatic arthritis', *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 3(1), pp. 55–78. doi: [https://doi.org/10.1016/0049-0172\(73\)90035-8](https://doi.org/10.1016/0049-0172(73)90035-8).
- Montecalvo, A. *et al.* (2012) 'Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes', *Blood*, 119(3), pp. 756–766. doi: 10.1182/blood-2011-

02-338004.

Nair, R. P. *et al.* (2006) 'Sequence and haplotype analysis supports HLA-C as the psoriasis susceptibility 1 gene', *American Journal of Human Genetics*. University of Chicago Press, 78(5), pp. 827–851. doi: 10.1086/503821.

Naldi, L. *et al.* (2004) 'Study Design and Preliminary Results from the Pilot Phase of the PraKtis Study: Self-Reported Diagnoses of Selected Skin Diseases in a Representative Sample of the Italian Population', *Dermatology*, 208(1), pp. 38–42. doi: 10.1159/000075044.

Naldi, L. and Gambini, D. (2007) 'The clinical spectrum of psoriasis', *Clinics in Dermatology*, 25(6), pp. 510–518. doi: <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2007.08.003>.

Neisig, A., Melief, C. J. and Neefjes, J. (1998) 'Reduced cell surface expression of HLA-C molecules correlates with restricted peptide binding and stable TAP interaction.', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. United States, 160(1), pp. 171–179.

Nestle, F. O., Kaplan, D. H. and Barker, J. (2009) 'Psoriasis', *New England Journal of Medicine*, 361(5), pp. 496–509. doi: 10.1056/NEJMra0804595.

Palmulli, R. and Van Niel, G. (2018) 'To be or not to be... secreted as exosomes, a balance finely tuned by the mechanisms of biogenesis', *Essays in Biochemistry*. Portland Press Ltd, pp. 177–191. doi: 10.1042/EBC20170076.

Pant, S., Hilton, H. and Burczynski, M. E. (2012) 'The multifaceted exosome: Biogenesis, role in normal and aberrant cellular function, and frontiers for pharmacological and biomarker opportunities', *Biochemical Pharmacology*, 83(11), pp. 1484–1494. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.12.037>.

Papadavid, E. *et al.* (2016) 'Increased levels of circulating platelet-derived microparticles in psoriasis: Possible implications for the associated cardiovascular risk', *World Journal of Cardiology*. Baishideng Publishing Group Inc., 8(11), p. 667. doi: 10.4330/wjc.v8.i11.667.

Parisi, R. *et al.* (2013) 'Global epidemiology of psoriasis: A systematic review of incidence and prevalence', *Journal of Investigative Dermatology*. Elsevier, 133(2), pp. 377–385. doi: 10.1038/jid.2012.339.

Pasquali, L. *et al.* (2020) 'Circulating microRNAs in extracellular vesicles as potential biomarkers for psoriatic arthritis in patients with psoriasis', *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, n/a(n/a). doi: 10.1111/jdv.16203.

Piruzian, E. *et al.* (2010) 'Integrated network analysis of transcriptomic and proteomic data in psoriasis', *BMC Systems Biology*, 4(1), p. 41. doi: 10.1186/1752-0509-4-41.

Pitt, J. M., Kroemer, G. and Zitvogel, L. (2016) 'Extracellular vesicles: masters of intercellular communication and potential clinical interventions', *The Journal of Clinical Investigation*. The American Society for Clinical Investigation, 126(4), pp. 1139–1143. doi: 10.1172/JCI87316.

Prey, S. *et al.* (2010) 'Assessment of risk of psoriatic arthritis in patients with plaque psoriasis: a systematic review of the literature', *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. John Wiley & Sons, Ltd, 24(s2), pp. 31–35. doi: 10.1111/j.1468-3083.2009.03565.x.

Probert, C. *et al.* (2019) 'Communication of prostate cancer cells with bone cells via

extracellular vesicle RNA; a potential mechanism of metastasis', *Oncogene*, 38(10), pp. 1751–1763. doi: 10.1038/s41388-018-0540-5.

Raposo, G. and Stoorvogel, W. (2013) 'Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends', *Journal of Cell Biology*, 200(4), pp. 373–383. doi: 10.1083/jcb.201211138.

Rashmi, R., Rao, K. S. J. and Basavaraj, K. H. (2009) 'A comprehensive review of biomarkers in psoriasis', *Clinical and Experimental Dermatology*. John Wiley & Sons, Ltd, 34(6), pp. 658–663. doi: 10.1111/j.1365-2230.2009.03410.x.

Ratajczak, J. *et al.* (2006) 'Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication', *Leukemia*, 20(9), pp. 1487–1495. doi: 10.1038/sj.leu.2404296.

Raychaudhuri, S. K., Maverakis, E. and Raychaudhuri, S. P. (2014) 'Diagnosis and classification of psoriasis', *Autoimmunity Reviews*, 13(4), pp. 490–495. doi: <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2014.01.008>.

Riazifar, M. *et al.* (2017) 'Stem Cell Extracellular Vesicles: Extended Messages of Regeneration', *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 57(1), pp. 125–154. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-061616-030146.

Rocha-Pereira, P. *et al.* (2004) 'The inflammatory response in mild and in severe psoriasis', *British Journal of Dermatology*. John Wiley & Sons, Ltd, 150(5), pp. 917–928. doi: 10.1111/j.1365-2133.2004.05984.x.

Rootalu, K. (2014) *Korrelatsioonikordajad | Sotsiaalse Analüüsi Meetodite ja Metodoloogia õpibaas*. Available at: <https://samm.ut.ee/korrelatsioonikordajad> (Accessed: 30 May 2021).

Runz, S. *et al.* (2007) 'Malignant ascites-derived exosomes of ovarian carcinoma patients contain CD24 and EpCAM', *Gynecologic Oncology*, 107(3), pp. 563–571. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2007.08.064>.

Ryoo, H. D. and Bergmann, A. (2012) 'The role of apoptosis-induced proliferation for regeneration and cancer.', *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4(8), p. a008797. doi: 10.1101/cshperspect.a008797.

Salomon, J., Szepietowski, J. C. and Proniewicz, A. (2003) 'Psoriatic Nails: A Prospective Clinical Study', *Journal of Cutaneous Medicine and Surgery: Incorporating Medical and Surgical Dermatology*, 7(4), pp. 317–321. doi: 10.1007/s10227-002-0143-0.

Sampogna, F. *et al.* (2006) 'Age, gender, quality of life and psychological distress in patients hospitalized with psoriasis', *British Journal of Dermatology*. John Wiley & Sons, Ltd, 154(2), pp. 325–331. doi: 10.1111/j.1365-2133.2005.06909.x.

Scott, C. C., Vacca, F. and Gruenberg, J. (2014) 'Endosome maturation, transport and functions', *Seminars in Cell and Developmental Biology*. Elsevier Ltd, pp. 2–10. doi: 10.1016/j.semcdb.2014.03.034.

Singh, S. *et al.* (2019) 'Genomic alterations driving psoriasis pathogenesis', *Gene*. Elsevier B.V., pp. 61–71. doi: 10.1016/j.gene.2018.09.042.

Skog, J. *et al.* (2008) 'Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers', *Nature cell biology*. 2008/11/16, 10(12), pp. 1470–1476. doi: 10.1038/ncb1800.

- Skriner, K. *et al.* (2006) 'Association of citrullinated proteins with synovial exosomes', *Arthritis & Rheumatism*. John Wiley & Sons, Ltd, 54(12), pp. 3809–3814. doi: 10.1002/art.22276.
- Spelman, L. *et al.* (2015) 'Frequency of undiagnosed psoriatic arthritis among psoriasis patients in Australian dermatology practice', *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. John Wiley & Sons, Ltd, 29(11), pp. 2184–2191. doi: 10.1111/jdv.13210.
- Strimbu, K. and Tavel, J. A. (2010) 'What are biomarkers?', *Current opinion in HIV and AIDS*, 5(6), pp. 463–466. doi: 10.1097/COH.0b013e32833ed177.
- Sun, I. O. and Lerman, L. O. (2020) 'Urinary extracellular vesicles as biomarkers of kidney disease: From diagnostics to therapeutics', *Diagnostics*. MDPI AG, p. 311. doi: 10.3390/diagnostics10050311.
- Tan, E. S. T., Chong, W.-S. and Tey, H. L. (2012) 'Nail Psoriasis', *American Journal of Clinical Dermatology*, 13(6), pp. 375–388. doi: 10.2165/11597000-000000000-00000.
- Tian, Y. *et al.* (2020) 'Quality and efficiency assessment of six extracellular vesicle isolation methods by nano-flow cytometry', *Journal of Extracellular Vesicles*. Taylor and Francis Ltd., 9(1). doi: 10.1080/20013078.2019.1697028.
- Tiilikainen, A. *et al.* (1980) 'Psoriasis and HLA-Cw6', *British Journal of Dermatology*. John Wiley & Sons, Ltd, 102(2), pp. 179–184. doi: 10.1111/j.1365-2133.1980.tb05690.x.
- Valadi, H. *et al.* (2007) 'Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells', *Nature Cell Biology*, 9(6), pp. 654–659. doi: 10.1038/ncb1596.
- Vietri, M., Radulovic, M. and Stenmark, H. (2020) 'The many functions of ESCRTs', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Research, pp. 25–42. doi: 10.1038/s41580-019-0177-4.
- Villani, A. P. *et al.* (2015) 'Prevalence of undiagnosed psoriatic arthritis among psoriasis patients: Systematic review and meta-analysis', *Journal of the American Academy of Dermatology*, 73(2), pp. 242–248. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2015.05.001>.
- Villanova, F., Di Meglio, P. and Nestle, F. O. (2013) 'Biomarkers in psoriasis and psoriatic arthritis', *Annals of the Rheumatic Diseases*, 72(suppl 2), p. ii104 LP-ii110. doi: 10.1136/annrheumdis-2012-203037.
- Vogel, R. *et al.* (2017) 'High-Resolution Single Particle Zeta Potential Characterisation of Biological Nanoparticles using Tunable Resistive Pulse Sensing', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 7(1), pp. 1–13. doi: 10.1038/s41598-017-14981-x.
- Williamson, L. *et al.* (2004) 'Extended report: nail disease in psoriatic arthritis--clinically important, potentially treatable and often overlooked.', *Rheumatology (Oxford, England)*. England, 43(6), pp. 790–794. doi: 10.1093/rheumatology/keh198.
- Wollert, T. and Hurley, J. H. (2010) 'Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes', *Nature*. Nature, 464(7290), pp. 864–869. doi: 10.1038/nature08849.
- Wu, H. *et al.* (2018) 'Pathogenic role of tissue-resident memory T cells in autoimmune

diseases’, *Autoimmunity Reviews*. Elsevier B.V., pp. 906–911. doi: 10.1016/j.autrev.2018.03.014.

Wu, Y., Deng, W. and Klinke, D. J. (2015) ‘Exosomes: Improved methods to characterize their morphology, RNA content, and surface protein biomarkers’, *Analyst*. Royal Society of Chemistry, 140(19), pp. 6631–6642. doi: 10.1039/c5an00688k.

Xu, N. *et al.* (2011) ‘MiR-125b, a MicroRNA downregulated in psoriasis, modulates keratinocyte proliferation by targeting FGFR2’, *Journal of Investigative Dermatology*. Nature Publishing Group, 131(7), pp. 1521–1529. doi: 10.1038/jid.2011.55.

Yao, R. *et al.* (2012) ‘MicroRNA-155 Modulates Treg and Th17 Cells Differentiation and Th17 Cell Function by Targeting SOCS1’, *PLoS ONE*. PLoS One, 7(10). doi: 10.1371/journal.pone.0046082.

Zhao, M. *et al.* (2014) ‘Up-regulation of microRNA-210 induces immune dysfunction via targeting FOXP3 in CD4⁺ T cells of psoriasis vulgaris’, *Clinical Immunology*. Clin Immunol, 150(1), pp. 22–30. doi: 10.1016/j.clim.2013.10.009.

LISA 1. Patsientide ja proovide andmed, mõõtmiste tulemused. C – kontrollgrupp, PS – PS patsiendid, PSA – PS+PSA patsiendid.

Grupp	Proov	Vanus	Sugu	Proovi hoiustamis-aeg, kuudes	RNA kontsent-ratsioon, ng/μl	zeta-potentsiaal, mV	Partiklite kontsetratsioon, partiklit/ml
C	C1	24	Mees	29	0.25	-32.98	4.51E+09
	C2	35	Mees	28	0.33	-32.45	7.36E+10
	C3	51	Mees	50	0.13	-34.48	3.06E+09
	C4	57	Mees	24	0.57	-34.93	6.70E+10
	C5	61	Naine	57	0.19	-33.75	6.60E+10
	C6	64	Mees	33	0.24	-25.36	2.30E+10
	C7	62	Naine	14	0.11	-28.39	3.74E+10
	C8	49	Mees	13	0.30	-26.28	8.84E+09
	C9	52	Mees	42	0.06	-26.27	2.30E+11
	C10	55	Mees	50	0.16	-30.21	1.58E+10
	C11	54	Mees	21	0.41	-30.74	2.89E+10
	C12	55	Mees	14	0.08	-32.15	2.53E+10
PS	PS1	50	Mees	31	0.35	-32.64	4.86E+10
	PS2	57	Mees	10	0.18	-28.01	1.57E+10
	PS3	54	Mees	19	0.08	-32.11	6.66E+10
	PS4	47	Mees	53	0.63	-31.55	4.08E+09
	PS5	48	Mees	13	0.53	-32.24	1.75E+11
	PS6	60	Mees	55	0.31	-24.66	2.30E+10
	PS7	61	Naine	46	0.50	-24.08	2.01E+11
	PS8	55	Naine	53	0.41	-24.51	2.54E+10
	PS9	29	Mees	9	0.94	-29.69	4.01E+10
	PS10	34	Mees	30	0.10	-27.67	7.31E+09
	PS11	59	Mees	39	0.20	-32.52	2.54E+10
	PS12	53	Mees	9	0.11	-32.43	3.13E+09
PSA	PSA1	34	Mees	44	0.12	-34.05	2.00E+10
	PSA2	47	Mees	54	0.07	-32.18	3.05E+10
	PSA3	53	Mees	13	0.15	-30.36	1.24E+10
	PSA4	49	Mees	26	0.09	-31.83	7.27E+10
	PSA5	54	Mees	18	0.27	-31.42	4.61E+10
	PSA6	29	Mees	17	0.15	-23.6	1.36E+10
	PSA7	53	Mees	56	0.90	-22.98	1.08E+11
	PSA8	61	Naine	49	0.15	-27.97	2.61E+10
	PSA9	61	Mees	45	0.22	-25.2	3.38E+10
	PSA10	60	Naine	39	0.08	-27.73	1.40E+10
	PSA11	45	Mees	37	0.13	-37.27	5.26E+10
	PSA12	55	Mees	18	0.69	-27.17	3.11E+10

LISA 2. EV array tulemused. Väärtused tabelis tähistavad fluoretsentssignaali suhtelist intensiivsust negatiivse kontrolli suhtes.

		CD9	CD41	CD 19	CD6 3	CD81	ICAM-1	Alix	CD16	CD14	TGFb1	CD45R A	CD25	CD14 1	Blank
C1	C	46.5	39.5	10. 9	26.7	39.7	9.9	8.5	29.5	9.3	8.0	11.7	26.7	4.9	0.0
C2	C	44.8	20.2	2.3	15.8	60.7	10.2	1.5	0.9	2.6	1.6	4.5	1.0	6.9	0.2
C3	C	28.8	27.8	1.2	20.4	37.7	6.7	2.0	2.1	5.9	2.9	3.8	3.1	9.0	0.2
C4	C	34.0	17.3	6.2	23.3	76.4	4.4	8.7	20.9	9.6	6.3	7.2	28.3	12.7	0.0
C5	C	57.8	31.7	14. 4	31.7	72.2	10.5	12.8	81.9	17.7	43.4	17.7	74.5	16.1	0.0
C6	C	40.8	15.4	4.0	9.1	64.5	1.9	0.8	0.4	2.1	1.0	10.2	0.5	2.6	0.3
C7	C	12.6	12.6	3.7	9.5	49.4	7.8	2.1	1.1	3.2	1.9	2.9	0.9	1.5	0.2
C8	C	37.4	37.9	11. 7	24.7	61.7	13.8	8.3	11.7	9.4	2.9	9.1	14.8	4.7	0.0
C9	C	46.0	37.1	1.1	19.7	75.4	3.1	1.8	3.4	5.4	3.7	5.0	5.7	4.6	0.1
C10	C	32.2	20.4	8.7	14.3	100.5	8.5	10.7	7.6	23.7	9.5	14.8	9.2	5.4	0.3
C11	C	49.9	45.3	2.1	14.6	55.8	4.2	1.5	0.7	5.7	0.8	2.9	1.2	8.0	0.2
C12	C	36.2	28.8	14. 2	25.7	63.4	8.6	19.2	104.3	45.5	56.7	28.4	98.9	17.6	0.0
Kesk m	38.9	27.8	6.7	19. 6	63.1	7.5	6.5	22.0	11.7	11.6	9.8	22.1	7.8		
PS1	PS	49.0	22.4	7.4	19.9	57.0	6.7	1.3	7.6	3.1	8.1	9.2	8.8	8.5	0.2
PS2	PS	33.1	45.7	1.8	27.9	67.7	3.7	1.2	1.2	4.3	1.0	7.4	1.3	4.1	0.1

PS3	PS	34.5	19.2	2.8	17.8	58.4	2.7	1.9	1.4	2.3	1.4	4.8	1.7	6.1	0.0
PS4	PS	64.1	27.8	14. 1	21.7	59.1	3.1	3.3	1.9	2.6	1.1	2.9	2.0	2.9	0.0
PS5	PS	54.1	36.3	15. 2	30.6	68.7	6.8	5.8	7.7	7.5	7.4	9.2	11.3	11.3	0.2
PS6	PS	61.1	44.0	38. 8	45.3	59.9	9.5	34.2	46.0	7.9	11.9	10.7	53.1	46.6	0.1
PS7	PS	60.3	38.8	1.2	24.2	86.5	6.2	0.4	2.5	1.6	0.5	7.4	0.7	8.2	0.0
PS8	PS	52.4	51.1	35. 0	42.2	75.6	33.5	46.0	106.9	51.7	80.1	54.1	111.2	39.0	0.0
PS9	PS	69.8	37.3	9.8	47.4	74.1	10.5	3.6	7.7	2.4	7.2	12.2	23.2	2.3	0.1
PS11	PS	52.8	16.3	2.2	20.2	71.7	8.6	13.7	8.3	10.5	9.2	7.9	8.2	7.8	0.0
PS12	PS	36.8	16.9	3.5	20.8	72.7	8.4	7.1	40.4	13.5	32.5	17.7	46.1	12.7	0.1
Kesk m	51.6	32.3	12.0	28. 9	68.3	9.1	10.8	21.0	9.8	14.6	13.1	24.3	13.6		
PSA1	PSA	59.7	43.3	18. 0	27.4	41.7	2.6	7.9	73.9	22.1	37.1	16.8	72.9	6.7	0.1
PSA2	PSA	52.3	20.9	10. 4	13.8	44.9	5.8	10.6	10.2	8.1	3.0	7.6	11.7	8.2	0.2
PSA3	PSA	35.3	22.8	27. 0	22.4	46.4	12.0	26.7	6.2	5.8	2.0	11.5	18.8	11.5	0.1
PSA4	PSA	40.7	29.4	17. 2	21.7	90.6	5.5	4.2	17.4	9.8	13.0	9.8	20.4	2.7	0.1

PSA5	PSA	36.8	16.3	2.3	15.0	75.3	6.3	4.0	6.1	3.0	2.2	6.6	7.4	8.3	0.1	
PSA6	PSA	64.7	41.3	2.8	39.5	44.2	5.5	7.5	23.0	7.0	15.9	8.7	20.6	11.6	0.1	
PSA7	PSA	60.1	35.1	3.8	20.9	87.9	4.5	12.4	85.9	17.3	40.1	15.4	76.1	10.6	0.0	
PSA8	PSA	44.2	29.2	22. 0	30.5	77.3	9.0	29.0	21.0	8.7	6.7	4.2	26.7	17.2	0.2	
PSA9	PSA	45.1	26.3	18. 2	14.3	54.0	8.3	3.4	1.0	2.3	8.5	7.0	1.1	4.4	0.1	
PSA1 0	PSA	33.3	28.3	24. 7	20.4	36.3	9.7	23.7	51.5	13.0	29.6	17.6	56.3	17.8	0.1	
PSA1 1	PSA	57.9	30.2	5.8	19.1	75.3	3.0	5.8	12.5	3.2	2.9	10.1	21.9	11.3	0.2	
Keskm	48.2	29.8	10.4	23.8	64.8	7.8	9.4	23.0	10.4	13.3	10.9	24.5	10.2			
St.hälve			12.2	10.27	9.37 8	9.21	14.9	5.292	1 0 . 3	30.5	11	18	9.16	29. 3	9.20787 7	
Blank			0.7	0.9	4.8	0.6	3.5	9.4	0 . 3	0.5	1.6	0.5	3.2	0.6	0.9	0.2
PS10		Outlier	100. 6	85.5	95.8	101. 8	107. 7	52.2	1 2 6 . 5	101.4	46. 0	89.5	29.5	118 .8	81.4	0

PSA12	Outlier	121. 2	128.3	131. 7	139. 4	143. 3	148.3	1 3 6 . 1	159.2	12 5.4	145.7	150.7	164 .0	127.2	0
-------	---------	-----------	-------	-----------	-----------	-----------	-------	-----------------------	-------	-----------	-------	-------	-----------	-------	---

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Irina Guljavina (sünnikuupäev 16.04.1996),

1. Annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „Ekstratsellulaarsed vesiikulid biomarkeritena psoriaasi ja psoriaatilise artriidi korral“, mille juhendajad on Freddy Lättekivi ja Artjom Stepanjuk, reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Irina Guljavina
03.06.2021