

**ARSTITEADUSKOND
FÜSIOLOOGIA INSTITUUT**

Kristi Raud

**“Glutatioonisüsteemi bioloogiline roll psoriaasi
patogeneesis”**

Magistritöö

Juhendajad: Sulev Kõks Ph. D
Külli Kingo Ph. D
Ursel Soomets Ph. D

TARTU 2007

SISUKORD.....	1
LÜHENDID.....	3
SISSEJUHATUS.....	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	6
1.1 ÜLEVAADE PSORIAASIST.....	6
1.1.1 Haiguse kliiniline pilt.....	6
1.1.2 Psoriaasi klassifikatsioon.....	7
1.1.2.1 Naastuline psoriaas.....	7
1.1.2.2 Mädavilliline psoriaas (<i>psoriasis pustulosa</i>).....	8
1.1.3 Pärilikkus ja haigust vallandavad faktorid.....	9
1.1.4 Oksüdatiivne stress psoriaasi korral.....	10
1.2 ÜLEVAADE GLUTATIOONISÜSTEEMIST.....	12
1.2.1 Glutatioonisüsteemi rakke kaitsvad omadused.....	13
1.2.2 Glutatioon ja tema redokstasakaal.....	13
1.2.3 Glutatiooni intratsellulaarne jaotumine.....	14
1.2.4 Glutatiooni metabolism.....	14
1.2.4.1 Substraadi transport.....	14
1.2.4.2 Glutatiooni biosüntees.....	15
1.2.4.3 Glutamaadi-tsüsteiini ligaas.....	16
1.2.4.4 Glutatiooni süntetaas.....	16
1.2.4.5 Glutatiooni reduktaas.....	16
1.2.4.6 Glutatiooni S-transferaas.....	17
1.2.4.7 γ -Glutamüültransferaas.....	17
1.2.5 Suunad glutatioonisüsteemi uurimisel ja glutatiooni analoogid.....	18
2. MAGISTRITÖÖ EESMÄRK.....	21
3. MATERJAL JA METOODIKA.....	22
3.1 UURIMISGRUPID.....	22
3.2 PERIFEEERSE VERE MONONUKLEAARRAKKUDE ISOLEERIMINE.....	23
3.3 RNA ERALDAMINE.....	23
3.4 cDNA SÜNTEES.....	24
3.5 KVANTITATIIVNE PÖÖRDTRANSKRIPTAASI PCR ANALÜÜS.....	24
4. TULEMUSED.....	26
4.1 GEENIDE EKSPRESSIOONI ERINEVUSED SUGUDEVAAHELISELT.....	26

4.2 GEENIDE EKSPRESSIOONI ERINEVUSED PSORIAASIHAIGETE JA KONTROLLINDIVIIDIDE VAHEL.....	26
4.3 GEENIDE EKSPRESSIOONI ERINEVUSED SÕLTUVALT NAHALÖÖBE AKTIIVSUSEST JA ULATUSEST NING KAASUVATEST KÜÜNE- JA LIIGESKAHJUSTEST.....	27
4.4 KORRELATSIOONANALÜÜS.....	28
4.5 ANTIOKSÜDANTSETE PEPTIIDIDE TOIMED ENSÜÜMIDE mRNA EKSPRESSIOONIDELE.....	28
5. ARUTELU.....	30
6. KOKKUVÕTE.....	33
7. SUMMARY.....	34
8. TÄNUAVALDUSED.....	35
9. KASUTATUD KIRJANDUS.....	36
10. LISAD.....	42

LÜHENDID

$\cdot\text{O}_2^-$ – superoksiidi anioon

ATP – adenosintrifosfaat

C – kontrollindiviidid

Ca – kaltsium

CAT – katalaas

cDNA – mRNA suhtes komplementaarne DNA ahel

CO_2 – süsinikdioksiid

Cys – tsüsteiin

de novo – “uuesti”

DNA – desoksüribonukleinhape

GCL – glutamaadi-tsüsteiini ligaas (vana nimetusega γ -glutamüültsüsteiini süntetaas)

GCLC – glutamaadi-tsüsteiini ligaasi katalüütiline subühik

GCLM – glutamaadi-tsüsteiini ligaasi modifitseeriv subühik

GGT – γ -glutamüültransferaas

GGTL3 – γ -glutamüültransferaasi sarnane ensüüm 3

GGTLA1 – γ -glutamüültransferaasi sarnase aktiivsusega ensüüm 1

Glu – glutamaat

Gly – glütsiin

GPX – glutatiooni peroksüdaas

GSH – glutatioon

GSR – glutatiooni reduktaas

GSS – glutatiooni süntetaas

GSSG – oksüdeeritud glutatioon (glutatioon disulfiid)

GST – glutatiooni S-transferaas

GSTP1 – glutatiooni S-transferaas- π

H_2O_2 – vesinikperoksiid

HIV – *Human Immunodeficiency Virus*

HLA-Cw*0602 – inimese leukotsüüdi antigeeni Cw*0602 alleel

HPRT-1 – *Hypoxanthine Phosphoribosyl-Transferase-1*

kDa – kilodalton

mRNA – *messenger* ribonukleiinhape

Na – naatrium

nM – nanomolaarne

O₂ – molekulaarne hapnik

OH· – hüdroksüülradikaal

P - psoriaasahaiged

p – kromosoomi lühike õlg

PASI – *Psoriasis Area and Severity Index*

PBS – *Phosphate Buffered Saline*

q – kromosoomi pikk õlg

QRT-PCR – kvantitatiivne pöördtranskriptaasi polümeraasi ahelreaktsioon

RNA – ribonukleiinhape

RNase – ribonukleas

ROS – reaktiivsed hapniku osakesed (*reactive oxygen species*)

SEM – keskmise standardviga

SOD – superoksiidi dismutaas

UPF1/UPF17 – glutatiooni analoogid

UV – ultraviolet

ΔCt – lävitsükli erinevus

SISSEJUHATUS

Psoriaas on krooniline põletikuline T-rakkude poolt vahendatud autoimmuunhaigus, mida põeb 1-5% meestest ja naistest. Lääne-Euroopas esineb psoriaasi peaaegu sama sagedasti kui diabeeti (2-3%), seevastu asiaatidel, mustanahalistel, eskimotel ja indiaanlastel esineb seda haigust palju harvem (*Naldi, 2004*).

Psoriaas on tugeva geneetilise taustaga komplekshaigus, mille avaldumist mõjutavad nii geneetilised kui ka keskkonnast tulenevad faktorid. Haiguse avaldumine sõltub paljude geenide koosmõjust ja interaktsioonidest keskkonnafaktoritega. Potentsiaalseid haigust põhjustavaid kandidaatgeene on leitud mitmes erinevas kromosoomis, kuid tänu suurele heterogeensusele erinevate rasside vahel, on erinevate teadusgruppide poolt tehtud uuringud sageli vastuolulised (*Giardina et al., 2004*). Kuid siiski on praegu psoriaasiga kõige rohkem seostatud 6 kromosoomi lühikeses õlas paiknevat inimese leukotsüüdi antigeeni Cw6*0602 alleeli (HLA-Cw6*0602) (*Langley et al., 2005; Veal et al., 2001; Nair et al., 2000*). Veel on teada, et ekso- ja endogeensed reaktiivsed hapniku osakesed (ROS) indutseerivad ja soodustavad mitmeid põletikulisi nahahaigusi (*Nachbar & Korting, 1995*) ning on näidatud, et ROS'idel on oluline koht ka psoriaasi patogeneesis (*Maccarrone et al., 1997; Kavanagh et al., 1996*). Tavaliselt põhjustavad ROS'id väga vähe kahju tänu rakusisestele antioksidatiivsetele kaitsesüsteemidele, mis kahjutustavad ROS'e ning vähendavad nende poolt esile kutsutud oksüdatiivset stressi (*Trouba et al., 2002*). Kuna psoriaasi patogenees pole tänaseni lõplikult selge, siis arvatakse, et haiguse üheks võimalikuks tekkepõhjuseks võib olla antioksidatiivse glutatioonisüsteemi aktiivsuse vähenemine, üldine ROS'ide taseme tõus ning sellest tulenevalt suurenenud oksüdatiivne stress (*Ortonne et al., 1996*).

Käesoleva magistr töö üheks eesmärgiks oli uurida glutatiooni metabolismis oluliste ensüümide ekspressiooni psoriaasihaigete ja tervete indiviidide perifeerse vere mononuklearrakkudes. Teiseks eesmärgiks oli uurida Tartu Ülikooli Biokeemia Instituudis sünteesitud uute antioksidantsete peptiidide (UPF1 ja UPF17) mõju glutatioonisüsteemi ensüümide ekspressioonile.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 ÜLEVAADE PSORIAASIST

Psoriaas on krooniline põletikuline T-rakkude poolt vahendatud autoimmuunne nahahaigus. Haigusele on iseloomulik kiirenenud keratinotsüütide proliferatsioon ja nende ebanormaalne diferentseerumine naha sarvkihis ning T-rakulise infiltraadi esinemine pärisnahas (*Ozawa & Alba, 2004*). Psoriaasi puhul on tegemist multifaktoriaalse haigusega, mis tähendab seda, et inimene haigestub psoriaasi teatavate geneetiliste ja keskkonnast tulenevate tegurite kokkulangemise korral (*Hannuksela et al., 2006*). Haigust põeb 1-5% elanikest ning naised ja mehed on võrdselt ohustatud. Lääne-Euroopas on psoriaas peaaegu sama sage kui diabeet (2-3%). Asiaatidel, mustanahalistel, eskimotel ja indiaanlastel esineb seda haigust palju harvem kui valgenahalistel (*Naldi, 2004; Hannuksela et al., 2006*).

1.1.1 Haiguse kliiniline pilt

Haiguse tekkimisel esimeseks muutuseks nahal on punetav sõlmeke. Kui kahjustus laieneb, kujunevad välja punetavad ja nahapinnast kõrgemad naastud, mida tavaliselt katab hõbevalge kett. Naastude skarifitseerimisel eemaldub kett ning nähtavale tulevad väikesed torkekujulised verepiisad (*Auspitz'i* verepiiskade fenomen). Kollete hulk ja läbimõõt nahal võib olla varieeruv, kuid nende paiknemine on enamasti sümmeetriline (*Hannuksela et al., 2006*). Lööbe sagedasemateks lokaliseerimise kohtadeks on põlve- ja küünarliigese sirutuspinnad, nimmestluupiirkond ning juustega kaetud peanahk (*Hannuksela et al., 2006*). Psoriaasile on iseloomulik *Koebner'i* fenomen – haiguskolde tekkimine trauma kohale (*Langely et al., 2005*).

Haiguse aktiivsus ja kulg võivad olla väga erinevad. Kliiniline pilt võib varieeruda ühest koldest nahal kuni erütrodermise vormini, mida iseloomustab naha punetus, ketendus ja infiltratsioon üle kogu keha (*Langely et al., 2005*).

10-30% patsientidel esineb kaasuvana küünekahjustused (*Tham et al., 1988; Biondi et al., 1989*) ning umbes 5%-40% psoriaasiga haigetel areneb välja põletikuline liigeskahjustus (*Krueger & Bowcock, 2005*).

1.1.2 Psoriaasi klassifikatsioon

Psoriaasi klassifitseeritakse naastuliseks ja mädavilliliseks psoriaasiks:

1.1.2.1 Naastuline psoriaas

- Krooniline naastuline psoriaas (*psoriasis vulgaris*) (Joonis 1) on kõige levinum haigusvorm, esinedes 80% psoriaasiga haigetest. Selle vormi puhul domineerivad kindlalt piiritletud, erineva suurusega, nahapinnast kõrgemad ja ketendavad naastud, mis esinevad tavaliselt sümmeetriliselt. Naastude sagedasemateks lokalisatsioonideks on jäsemete sirutuspinna, eriti põlved ja küünarnukid ning nimme-ristluupiirkond. Juustega kaetud peanahal esinevad analoogsed naastud, mis eelistatult paiknevad juustepiiril. Näol esinev psoriaas on õhukese ketuga, meenutades seborröaekseemi. Mõnikord paiknevad psoriaatilised kahjustused ka peopesadel ja jalataldadel (*Hannuksela et al., 2006; Langely et al., 2005*).



Joonis 1. Naastulisele psoriaasile iseloomulikud haiguskolded (<http://www.derma.ee/articles.php?id=115>).

Haiguse alguse järgi võib psoriaasi jagada kahte tüüpi: varajane ja hiline naastuline psoriaas:

- Varajane naastuline psoriaas avaldub enne 40. eluaastat. Nendel patsientidel on nahalööve ulatuslikum ning neil esineb suure tõenäosusega psoriaas ka mõnel lähisugulasel (*Naldi & Rzany, 2004*).
- Hiline naastuline psoriaas avaldub peale 40. eluaastat, kõige sagedamini peale 50. eluaastat. Tavaliselt sel juhul psoriaasi perekondlikult ei esine ning lööve on rohkem lokaliseeritud (*Naldi & Rzany, 2004*).

Klassifikatsiooni järgi kuuluvad naastulise psoriaasi hulka veel järgmised psoriaasi vormid:

- Tilkpsoriaas (*psoriasis guttata*) – esinemissagedus ~2%. Tilkpsoriaas on kõige sagedasem psoriaasi vorm lastel ning avaldub tavaliselt angiinide järgselt, üldjuhul allub hästi ravile ja võib ravi järel pikka aega remissioonis püsida (*Hannuksela et al., 2006*).
- Kehavoltide psoriaas (*psoriasis inversa*) esineb peamiselt kehavoltide piirkonnas (kaenlaalused, naba, kubemevoldid, päraakupilu, rindade alused) (*Hannuksela et al., 2006*).
- Kogu keha psoriaas (*psoriasis erythrodermica*) tähendab väga laiaulatuslikku psoriaasi (üle 75% keha pindalast). Selle haigusvormiga on sageli seotud termoregulatsiooni häired (hüpotermia) ja metaboolsed muutused (raua, vitamiin B₁₂ ja folaadi aneemia) ning patsient vajab haiglaravi. Kõik eelmainitud psoriaasivormid võivad areneda erütrodermseks (*Hannuksela et al., 2006; Langely et al., 2005*).

1.1.2.2 Mädavilliline psoriaas (*psoriasis pustulosa*)

Mädavilliline psoriaas esineb ~3% juhtudest. Punetavale nahale ilmuvad pindmised, väikesed mädavillid. Mädavillilisel psoriaasil eristatakse paikset ja generaliseeritud vormi. Paikse vormi korral esineb lööve peopesadel või jalataldadel. Generaliseerunud haiguse korral on lööve üle kogu keha, esinevad palavik,

leukotsütoos ja elektrolüütide tasakaaluhäired ning selline patsient vajab haiglaravi (*Hannuksela et al., 2006*).

Psoriaasi diagnoos baseerub põhiliselt kliinilisel pildil, kuid mõnikord peetakse vajalikuks haiguse diagnoosimiseks histoloogilise uuringu teostamist, et eristada psoriaasi teistest sarnaste sümptomitega haigustest (mündikujuline ekseem, seborröaekseem ja silenaha seenhaigus) (*Luba & Stulberg, 2006*).

1.1.3 Pärilikkus ja haigust vallandavad faktorid

Psoriaas on multifaktoriaalne haigus, mille tekkes osalevad nii pärilikud kui ka keskkonnast tulenevad faktorid. Psoriaasi haigestumisega seotud pärilik eelsoodumus ei allu Mendeli seaduste kohasele dominantsele või retsessiivsele pärilikkusmustrile. Lapsel, kelle peres pole psoriaasi, on risk haigestuda nimetatud haigusesse 2%. Kui ühel vanemal on psoriaas, on risk umbes 15%. Kui see on mõlemal vanemal, tõuseb risk kuni 65%-ni. Ühemunakaksikutel on konkordantsus psoriaasi suhtes 70-90% ja erimunakaksikutel 15-30%, mis näitab hästi haiguse päriliku loomust. Hinnanguliselt 30% psoriaatikutest omab ühte või rohkem psoriaasi põdevat esimese astme sugulast (*Hannuksela et al., 2006*).

Psoriaas on tugeva geneetilise taustaga komplekshaigus, mille avaldumist mõjutavad nii geneetilised kui ka keskkonnafaktorid. Võimalikke kandidaatgeene on leitud mitmes eri kromosoomis (*Giardina et al., 2004*). Kõige tugevam seos on leitud 6p21 lookuses asuva HLA-Cw6 geeni ja varajase haigusvormi vahel (*Langely et al., 2005; Veal et al., 2001*). Kahel kolmandikul psoriaasihaigel leiti HLA-Cw*0602 alleel, kusjuures üldpopulatsioonis esines antud alleeli vaid 10-15% indiviididel (*Veal et al., 2002*). Kui indiviid oli homosügootne HLA-Cw*0602 alleeli suhtes, tõusis psoriaasirisk 2,5 korda (*Gudjonsson et al., 2003*). Kuna kõigil haigetel ei esine seda alleeli, siis ollakse praegu seisukohal, et on olemas veel teisi geneetilisi faktoreid, mis võivad põhjustada psoriaasi avaldumise (*Gudjonsson et al., 2004*). Samuti on leitud seoseid kromosoomides 1p, 1q21, 3q21, 4q, 6p, 8, 11, 16q, 17q, 19p ja 20p paiknevate geenide ja haiguse vahel. Nende geenide ja psoriaasi vaheline seos on veel kinnitamata tulemuste suure varieeruvuse tõttu. Haigust soodustava lookuse leidmine on suhteliselt raske tänu suurele heterogeensusele, mis erinevate rasside vahel esineb (*Langely et al., 2005*).

Kuna tegemist on komplekshaigusega, siis haiguse avaldumine sõltub lisaks geneetilistele faktoritele ka mitmetest keskkonnanafaktoritest, millest üks olulisemaid on streptokokktonsilliidi põdemine, mis eriti lastel võib vallandada tilkpsoriaasi. Eriti ohustab see veel neid indiviide, kes kannavad HLA-Cw*0602 alleeli (*Gudjonsson et al., 2002*). Ka muud infektsioonhaigused (HIV infektsioon) või põletikulised soolehaigused võivad soodustada psoriaasi avaldumist ja raskendada selle kulgu (*Namazi, 2004*). Mõned ravimid (malaariavastased ravimid, beetablokaatorid, mittesteroidsed põletikuvastased ravimid) võivad psoriaasi vallandada või selle kulgu raskendada (*Abel et al., 1986*). On teada, et psüühilise stressi ja lööbe ägestumise vahel on teatavad seosed (*Picardi & Abeni, 2001*). Samuti füüsiline trauma (nt päikesepõletus) võib esile kutsuda haiguse avaldumise ja ägenemise ning alkoholitarbimine ja suitsetamine vallandavad, raskendavad ning hoiavad alal raskesti ravitavat ja ulatuslikku psoriaasi (*Naldi et al., 2004*).

1.1.4 Oksüdatiivne stress psoriaasi korral

Nahk on bioloogiline barjäär, mis kaitseb organismi paljude keskkonnast tulenevate ohtude eest. Vabad radikaalid indutseerivad või soodustavad mitmeid põletikulisi nahahaigusi, ülitundlikkust, aga ka naha vananemist ja kasvajate teket (*Nachbar & Kortig, 1995*). Erinevad kemikaalid, ultraviolet (UV) kiirgus, mikroorganismid, viirused ja ksenobiootikumid on eksogeensed vabade radikaalide allikad. Endogeenseid radikaale genereeritakse rakuliste protsesside, immuunreaktsioonide ja patoloogiliste seisundite ajal ning see on normaalse rakulise funktsioneerimise eraldamatu osa (*Powers & Hamilton, 1999; Trouba et al., 2002*).

Nahk on oluline ROS´de sihtmärk ning on näidatud, et neil on oma osa ka psoriaasi patogeneesis (*Maccarrone et al., 1997; Kavanagh et al., 1996*). ROS´id kujutavad endast aatomeid või molekule, millel on üks või rohkem mittepaardunud elektroni (*Knight, 1995; Halliwell et al., 1992*). Tavaliselt põhjustavad ROS´id väga vähe kahju, tänu intratsellulaarsetele antioksidatiivsetele kaitsesüsteemidele, mis kahjutustavad neid ning vähendavad nende poolt esile kutsutud oksüdatiivset stressi. Suurenenud ROS´de hulk võib olla koormav antioksidatiivsele süsteemile, aidates kaasa nahahaiguste väljaarenemisele. Kuigi ROS´idel on oma osa nahakasvajate

tekkel ei ole nende bioloogiline sihtmärk ja aktiivsuse patogeneetiline mudel lõplikult selge (*Trouba et al., 2002*).

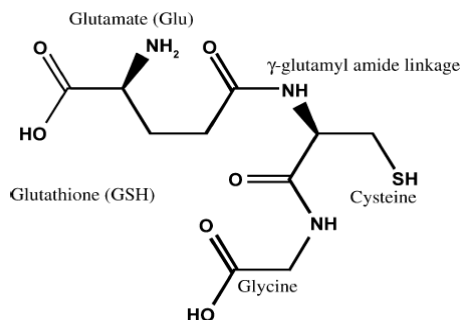
Kuna psoriaasi patogeneesi põhjused ei ole tänaseni lõplikult selged, siis arvatakse, et haiguse üheks võimalikuks tekkepõhjuseks võib olla antioksidatiivse süsteemi aktiivsuse vähenemine ning üldine ROS'ide tõusnud tase. ROS'e produtseeritakse psoriaasi korral põletikuliste protsesside ajal ning need mõjutavad rakkude DNA'd, valkude ja süsivesikute metabolismi. On teada, et psoriaatilistes kahjustustes esineb polümorfonukleaarne infiltraat (*Ortonne, 1996*) ning varasemad uuringud on näidanud, et keratinotsüütide, fibroblastide ja endoteelirakkude poolt produtseeritud ROS'id mõjutavad kemotaktiliselt neutrofiile (*Raynaud et al., 1997*) ning neutrofiilide kogunemine psoriaatilistes kahjustustes võib põhjustada rohke superoksiidi produktsiooni (*Turner et al., 1998*).

Madalatel kontsentratsioonidel võtavad superoksiidi anioon ($\cdot\text{O}_2^-$), hüdroksüülradikaalid ($\text{OH}\cdot$), vesinikperoksiid (H_2O_2) ja molekulaarne hapnik (O_2) osa mitmetest rakulistest protsessidest nagu immuunreaktsioonid, apoptoos, rakkude paljunemine ja diferentseerumine. ROS'ide üleproduktsioon või nende ebapiisav kahjutustamine põhjustab oksidatiivset stressi, millega kaasneb muutunud signaaliülekanne, häirunud metabolism ning biomolekulide kahjustused, mis kõik põhjustavad patoloogilisi muutusi rakkude ja kudede funktsioneerimises. ROS'id stimuleerivad rakkude jagunemist ja suunavad mittediferentseerunud keratinotsüüdid formeeruma defektseks sarvkestaks, mis on tsentraalseks sündmuseks psoriaasi korral (*Shilov & Sergienko, 2000*). Ebanormaalne keratinotsüütide diferentseerumine psoriaasahaigetel, võib seega olla põhjustatud osaliselt tõusnud $\cdot\text{O}_2^-$ hulgast, mida genereeritakse polümorfonukleaarleukotsüütide ja psoriaatiliste dermaalsete fibroblastide poolt. Biomolekulide kahjustus, nagu lipiidide peroksüdatsioon, DNA mutatsioonid, ensüümide inaktivatsioon/aktivatsioon ja valkude oksüdatsioon/degradatsioon, toimub tänu tõusnud ROS'ide tasemele (*Parola et al., 1999*).

Seega võib rakkude oksidatiivne kahjustus omada rolli psoriaasi patogeneesis. Senised uuringud on piirdunud üksikute antioksidantsete ensüümide uurimisega, kuid puuduvad süsteemsed, terviklikkust kajastavad uuringud. Seetõttu on edasised tööd selles valdkonnas kindlasti vajalikud, et välja selgitada antioksidatiivse süsteemi võimalikku haaratust psoriaasi patogeneesi.

1.2 ÜLEVAADE GLUTATIOONI SÜSTEEMIST

Glutatioon (GSH) on tuntuim madalmolekulaarne tiool, mis esineb taime- ja loomarakkudes millimolaarsetes kontsentratsioonides. Inimesel esinevad GSH kõrgeimad tasemed maksas, erütrotsüütides, pankreases, neerudes, põrnas, silmades ja kopsudes. Glutatioon on tripeptiid (Joonis 2), mis koosneb glutamaadist, tsüsteiinist ja glütsiinist (γ -L-Glu-L-Cys-Gly) ning tal on kaks iseloomulikku struktuurset tunnust: γ -glutamüülside ja sulfhüdrüülgrupp (*Ehrlich et al, 2007*), mis annavad glutatiooni molekulile funktsioonide mitmekesisuse. Glutatioonisüsteemi kõige olulisemaks funktsiooniks on rakkude kaitsmine oksüdatiivse stressi eest (*Dickinson & Forman, 2002; Hayes & McLellan, 1999; Meister & Anderson, 1983*). Tänu tsüsteiini jäägi sulfhüdrüülgrupi reaktiivsusele osaleb GSH ka teistes olulistes rakulistes protsessides nagu näiteks desoksüribonukleotiidide süntees, endogeensete ühendite protsessimine (östrogeen, prostaglandiinid ja leukotrieenid) ja ravimite inaktiveerimine (*Meister & Anderson, 1983*). Lisaks aitab GSH hoida mitmeid valke aktiivses vormis (*Cotgreave & Gerdes, 1998; Klatt & Lamas, 2000*). GSH eksisteerib rakkudes glutatiooni (GSH) ja glutatioon-disulfiidi (GSSG) redokspaarina ning see on kõige sagedasem rakkudes esinev redokskompleks (*Schafer & Buettner, 2001*).



Joonis 2. Glutamaadist, glütsiinist ja tsüsteiinist koosnev glutatiooni molekul (*Dalton et al., 2004*).

1.2.1 Glutatiooni süsteemi rakke kaitsvad omadused

Glutatioonisüsteemi kõige olulisemaks funktsiooniks on rakkude kaitsmine oksüdatiivse stressi eest (*Dickinson & Forman, 2002; Hayes & McLellan, 1999; Meister & Anderson, 1983*). GSH suudab kahjutustada vabasid radikaale, redutseerida peroksiide ja konjugeeruda elektrofiilsete ühenditega. Seeläbi kaitseb ta rakke ROS´de ja nende toksiliste vaheproduktide eest. GSH on eriti efektiivne väga toksiliste hüdroksüülradikaalide (*Bains & Shaw, 1997*) ning ka teiste kõrgelt reaktiivsete osakeste vastu (peroksünitrit) (*Halliwell & Gutteridge, 1999*).

On mitmeid viise, kuidas GSH kaitseb rakke ROS´ide, elektrofiilide ja ksenobiootikute eest. Ta on võimeline reageerima radikaalidega mitte-ensümaatilisel ning kahjutustama H₂O₂ ja orgaanilisi peroksüdaase redutseerides neid glutatiooni peroksüdaasi (GPX) abil (*Cohen & Hochstein, 1963; Dickinson & Forman, 2002*). GPX´i poolt vahendatud GSH oksüdeerumise produktiks on GSSG. Rakusiseselt on GSSG´d võimalik konverteerida tagasi GSH´ks glutatiooni reduktaasi (GSR) abil (*Maher, 2005*).

1.2.2 Glutatioon ja tema redokstaskaal

GSH oksüdeerumine dimeersesse vormi (GSSG) toimub reageerides reaktiivsete osakestega (hüdroksüülradikaalid, peroksünitrit) või peroksiidide eliminatsioonil GPX´i abil (*Cnubben et al., 2001; Halliwell et al., 1999*). GSSG koosneb kahest GSH molekulist, mis on omavahel seotud disulfiidsillaga. GSH oksüdeerumine muudab GSH redutseeritud vormi kontsentratsiooni rakkudes, mida iseloomustatakse GSH/GSSG suhtena (normaalolukorras 100 või enam) (*Griffith, 1999; Pastore et al., 2003*). Redutseeritud ja mitteredutseeritud GSH suhe on seotud paljude raku metaboolsete protsesside regulatsiooniga ja redokstundlike transkriptsionaalsete elementide aktiveerimisega (*Jefferies et al., 2003*).

1.2.3 Glutatiooni intratsellulaarne jaotumine

Hoolimata sellest, et kõik rakud sisaldavad GSH'd millimolaarsetes kontsentratsioonides, ei ole GSH rakus ühtemoodi jaotunud (*Schafer & Buettner, 2001*). Arvatakse isegi, et GSH ebahütlane jaotumine võib olla olulise tähtsusega antioksüdantse süsteemi töös (*Maher, 2005*).

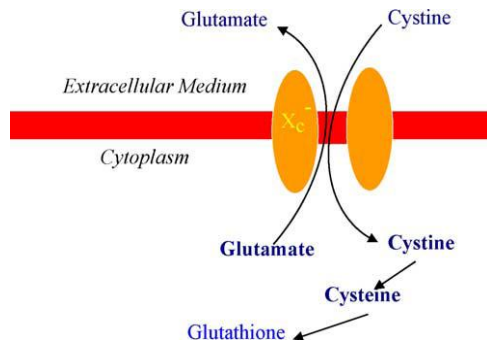
Peamine osa GSH'st paikneb raku tsütoplasmas, kus seda ka sünteesitakse. Tuumal ja mitokondril on omaette GSH varu, mis vähemalt osaliselt ei ole seotud raku tsütoplasma GSH tasemega (*Sims et al., 2004*). Mitmed uuringud on näidanud, et GSH vähenemine tsütoplasmas ei too endaga kaasa GSH hulga vähenemist tuumas ja mitokondrites (*Schafer & Buettner, 2001; Sims et al., 2004; Muyderman et al., 2004*), hoolimata sellest, et mitokondrites puuduvad glutatiooni biosünteesiks vajalikud ensüümid (*Pastore et al., 2003*). Mitokondriaalne GSH varu on oluline rakkude kaitses vähemalt mõnede oksüdatiivse stressi vormide vastu (*Muyderman et al., 2004*). *Fernandez-Checa* oma töögrupiga uuris alkoholist tingitud maksahaigust ning selgus, et krooniline etanooli manustamine viib selektiivselt mitokondriaalse GSH taseme vähenemiseni, mis omakorda muudab hepatotsüüdid oksüdatiivse stressi suhtes tundlikumaks (*Fernandez-Checa et al., 1998*). Peale selle on mitokondriaalse GSH vähenemisel oma osa ka vananemise protsessil (*Maher, 2005*).

1.2.4 Glutatiooni metabolism

1.2.4.1 Substraadi transport

GSH sünteesiks vajalikud glutamaat (Glu) ja glütsiin (Gly) esinevad intratsellulaarselt kõrgetes kontsentratsioonides. Kolmandaks GSH biosünteesiks vajaliku aminohappe, tsüsteiini (Cys), kontsentratsioon rakus on madal ning tänu sellele on GSH biosüntees limiteeritud (*Wu et al., 2004 (1)*). Ekstratsellulaarses keskkonnas oksüdeeritakse tsüsteiin tsüstiiniks ja seega on rakkudele GSH biosünteesiks vajaliku tsüstiini transport rakku hädavajalik. Tsüstiini transport rakkudesse toimub Na⁺ sõltumatu glutamaadi/tsüstiini antiporterite abil (Joonis 3), millega transporditakse rakkudesse 1 tsüstiini molekul 1 glutamaadi molekuli vastu (1:1) (*McBean, 2002*). Kõrge glutamaadi ekstratsellulaarne kontsentratsioon inhibeerib

tsüstiini transporti rakku ja seega ka GSH biosünteesi (Wu *et al.*, 2004 (1)). See olukord iseloomustab mitmeid kliinilisi seisundeid, näiteks HIV infektsiooni ja kasvaja, millede korral esineb kõrge oksüdatiivne stress ja vajadus GSH järele on suur (Maher, 2005).



Joonis 3. Glutamaadi/tsüstiini antiporter. Tsüstiini transport rakkudesse toimub Glu/Cys antiporteri poolt, millega transporditakse rakkudesse 1 tsüstiini molekul 1 glutamaadi molekuli vastu (1:1) (Maher, 2005).

1.2.4.2 Glutatiooni biosüntees

Intratsellulaarset GSH taset reguleeritakse keeruliste mehhanismide kaudu. See hõlmab GSH sünteesi, lagundamist, regenereerimist ja tema transporti rakust välja ning substraadi transporti ja saadavust (Meister & Anderson, 1983).

GSH biosüntees toimub kahes etapis, kahe ATP-sõltuva ensüümi poolt. Glutamaadi-tsüsteiini ligaas (GCL) (vana nimetusega γ -glutamüültsüsteiini süntetaas) katalüüsib esimest GSH biosünteesi etappi, mille tulemuseks on dipeptiidi (γ -Glu-Cys) moodustumine. Esimeses etapis formeerub glutamaadi ja tsüsteiini vahele γ -side, mis kaitseb dipeptiidi aminopeptidaaside eest. See etapp on glutatiooni biosünteesis limiteeritud tsüsteiini kättesaadavusega. Teises etapis liidab glutatiooni süntetaas (GSS) dipeptiidile Gly molekuli, moodustades tripeptiidse GSH (γ -L-Glu-L-Cys-Gly) (Joonis 2) (Sies, 1999). GSH metabolism lk 18, Joonis 4.

1.2.4.3 Glutamaadi-tsüsteiini ligaas

Glutamaadi-tsüsteiini ligaasi (GCL) aktiivsust reguleeritakse transkriptsionaalsetel, translatoorsetel ja post-translatoorsetel tasemetel. GCL on heterodimeerne valk, koosnedes 73 kDa katalüütilisest (GCLC) ja 31 kDa reguleerivast/modulatoorsest subühikust (GCLM). Kogu GCL katalüütiline aktiivsus on GCLC subühikul ning seal asub ka GSH biosünteesi pärssimise piirkond (*Dickinson et al., 2004*). GCLM ja GCLC geene aktiveeritakse transkriptsionaalselt erinevate ühendite poolt (nt mitmed metallid, oksüdatiivset stressi põhjustavad ühendid, glutatiooni konjugaadid, tsütokiinid, antioksüdandid) (*Wild & Mulcahy, 2000; Soltaninassab et al., 2000*). Uuringud näitavad, et rottide GCLC ja GCLM promotorete järjestus (*Yang et al., 2001a,b*) on erinev inimese vastava piirkonna järjestusest, (*Dickinson & Forman, 2002*) mistõttu ei saa rottide GCL geeni regulatsiooni täielikult samastada inimese GCL geeni regulatsiooniga (*Maher, 2005*).

GCL'i post-translatoorsest regulatsioonist ei ole palju teada, kuid arvatakse, et GCLC aktiivsust reguleeritakse negatiivselt fosforüleerimise teel. On viidatud mitmetele kinaasidele, mis võiksid GCL'i post-translatoorselt reguleerida (proteiinkinaas A, proteiinkinaas C ja Ca^{2+} /kalmoduliinsõltuv kinaas) (*Soltaninassab et al., 2000*). GSH metabolism lk 18, Joonis 4.

1.2.4.4 Glutatiooni süntetaas

Glutatiooni süntetaas (GSS) katalüüsib GSH biosünteesi teist etappi, lisades dipeptiidile glütsiini molekuli (*Dickinson & Forman, 2002*). Võrreldes GCL'iga on GSS'i regulatsioonist palju vähem teada. GSS geeni 5' regioon on uurimata ning seetõttu on teadmata ka selles piirkonnas paiknevad potentsiaalsed geeniregulatsiooni elemendid (*Njalsson et al., 2000*). GSH metabolism lk 18, Joonis 4.

1.2.4.5 Glutatiooni reduktaas

Nii ensümaatilised, üle GPX'i toimuvad, kui ka mitte-ensümaatilised ROS'ide detoksifikatsiooni reaktsioonid lõppevad GSSG produtseerimisega. Kuna GSSG suurenenud hulk on rakule kahjulik, eksporditakse teda sageli rakust välja, mis toob

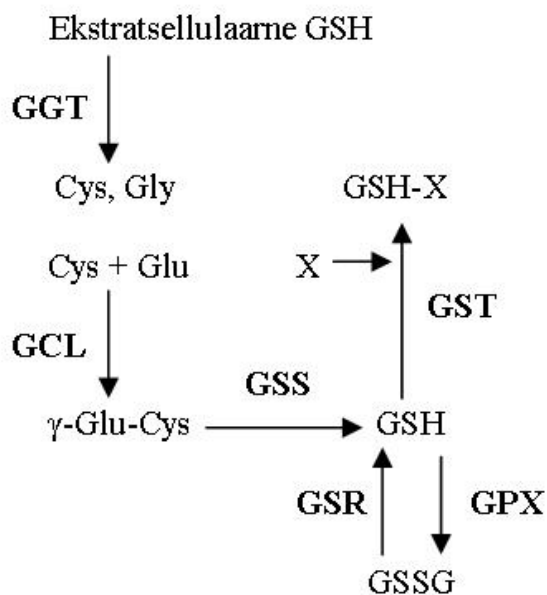
kaasa GSH hulga vähenemise. GSR on ensüüm, mis suudab sünteesida GSSG'st uuesti GSH. Selle reaktsiooni teel ei ekspordita GSSG'd rakust välja ning GSH rakuline tase ei vähene (*Lopez-Barea et al., 1990*). GSH metabolism lk 18, Joonis 4.

1.2.4.6 Glutatiooni S-transferaas

Glutatiooni S-transferaasid (GST) kaitsevad organismi reaktiivsete osakeste eest, mis on tekkinud endogeensete või eksogeensete ühendite lagunemise tulemusel (*Hayes & McLellan, 1999; Rinaldi et al., 2002*). GSH, kui nukleofiil, reageerib endogeensete ja eksogeensete elektrofiilsete ühenditega ning enamus nendest detoksifikatsiooni reaktsioonidest on vahendatud GST poolt (*Dickinson et al., 2004*). Inimestel on üle 21 erineva GST, mis on kodeeritud kahe erineva multigeense perekonna poolt ning kuhu kuuluvad nii lahustuvad kui ka membraanile seotud valgud. On näidatud, et GST (eriti GST- π) üleekspressioon põhjustab ravimresistentsuse tekkimise vähirakkudes (*Paydas et al., 1995; Wu et al., 2004 (2)*). GST'de poolt läbi viidavate detoksifikatsiooni reaktsioonide tulemusel väheneb rakuline GSH tase, kuna tekkinud GSH-konjugaadid on vees hästi lahustuvad ning neid väljutatakse organismist uriini ja väljaheitesse sekreteerides (*Hayes & McLellan, 1999*). GSH metabolism lk 18, Joonis 4.

1.2.4.7 γ -Glutamüültransferaas

γ -Glutamüültransferaasid (GGT) on ekstratsellulaarselt membraaniga seotud ensüümid, mille substraatideks on nii GSH kui ka GSSG molekulid. GGT on ainuke ensüüm, mis suudab ATP abil lagundada aminohappejääkide vahelist γ -sidet (*Meister & Anderson, 1983*). GGT on võimeline hüdrolüüsima GSH glutamaadiks ja tsüsteinüülglütsiiniks, ning tsüsteinüülglütsiinid võivad omakorda olla substraadiks peptidaasidele. Nende reaktsioonide poolt produtseeritud vabad aminohapped transporditakse tagasi rakkudesse ning neid saab kasutada taas GSH regenereerimisel. Seega GGT hoolitseb rakkudest välja transporditud GSH ja GSSG retsükleerimise eest ning kindlustab glutatiooni biosünteesiks vajalike aminohapete tagasi transpordi (*Maher, 2005*). GSH metabolism lk 18, Joonis 4.



Joonis 4. Glutatiooni (GSH) metabolism. GSH sünteesitakse glutamaadi-tsüsteiini ligaasi (GCL) ja glutatiooni süntetaasi (GSS) poolt glutamaadist (Glu), tsüsteiinist (Cys) ja glütsiinist (Gly). GSH oksüdeeritakse glutatiooni disulfiidiks (GSSG) reaktiivsete hapniku osakeste poolt reaktsioonis, mida katalüüsib glutatiooni peroksüdaas (GPX). GPX'i poolt produsteeritud GSSG konverteeritakse tagasi GSH'ks glutatiooni reduktaasi poolt (GSR). GSH suudab glutatiooni S-transferaasi (GST) abil konjugeeruda ning detoksifitseerida endogeenseid ja eksogeenseid elektrofiile (X). Need konjugaadid, nagu ka GSH ise, transporditakse rakust välja, kus nad omakorda on substraadiks γ -glutamüültransferaasile (GTT), mille tulemusel moodustuvad glutamaat ja tsüsteinüülglütsiin. Tsüsteinüülglütsiinid võivad omakorda olla substraadiks peptidaasidele (Maher, 2005).

1.2.5 Suunad glutatiooni süsteemi uurimisel ja glutatiooni analoogid

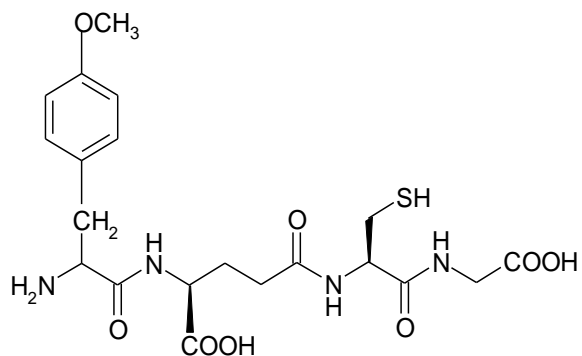
Rakuline GSH taseme vähenemine ja kõrge oksüdatiivne stress ilmnevad väga erinevates kliinilistes olukordades, näiteks mitmete krooniliste haiguste (kardiovaskulaarhaigused, neurodegeneratiivsed haigused, HIV, vähkkasvajad) ning akuutsete kliiniliste seisundite (põletikud, organite ülekanne, neerukahjustus, kopsukahjustus, kirurgiliste operatsioonide komplikatsioonid) korral. Peale nende arvatakse siia alla ka stress ja vananemine (Dorge, 2002; Emerit et al., 2004; Gate et al., 1999). Mitmetes patoloogilistes sündmustes esinev kõrge oksüdatiivne stress loob vajaduse uute ja paremate antioksidantsete omadustega molekulide järele (Ehrlich et al., 2007).

Tänu GSH mitmekülgetele omadustele on pakutud välja mitmeid erinevaid strateegiaid, kuidas säilitada glutatioonisüsteemi funktsionaalsus. Üheks teadlaste eesmärkideks on intratsellulaarse GSH taseme taastamine/säilitamine nii, et see võiks olla kasulik erinevatele kliinilistele seisunditele, mida eelpool mainiti. GSH manustamine sellistes olukordades on komplitseeritud, kuna GSH degradeeritakse kiiresti seedesüsteemi poolt ning samuti ei suuda rakud GSH'd sellisel kujul kasutada. Peamiseks limiteerivaks faktoriks GSH *de novo* sünteesi juures peetakse tsüstiini biosaadavust. Seetõttu on kasutusel tsüsteiini eellasühendid, näiteks N-atsetüül-L-tsüsteiin (Bernard, 1991; Ortolani et al., 2000).

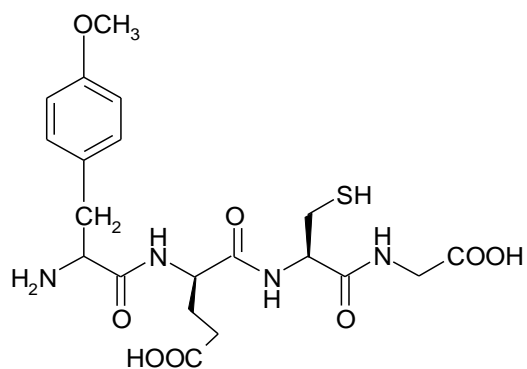
Tänu GSH mitmekülgetele omadustele on sünteesitud väga palju erinevate omadustega GSH analooge (Lucente et al., 1998). On mitmeid GSH molekuli modifikatsioone, mis parandavad GSH stabiilsust ja tema omastamist rakkude poolt. Kui vahetada GSH molekuli N-terminaalne aminogrupp pürroolitsükli vastu, saadakse uus antioksidant, mida ei suudeta oksüdeerida GPX'i poolt (Gaulhier et al., 1994). Kui asendada γ -glutamüülühik *cis*- või *trans*-4-karboksüül-L-proliini jäägiga, saadakse konformatsiooniliselt jäik ahel, mis muudab GSH analoogi resistentseks γ -glutamüültransferaasi (GGT) lagundavale toimele (Paradisi et al., 2003).

Vähkkasvajate vastase teraapia puhul on GST taseme vähendamine peamiseks eesmärgiks. On näidatud, et GST (eriti GST- π) üleekspressioon põhjustab ravimresistentsuse tekkimise vähirakkudes. GST on mitmete vähiteraapias kasutatavate ühendite deaktivaator (Wu et al., 2004 (2)). Tänu sellele on disainitud palju GSH analooge, mis inhibeeriksid erinevaid GST isoensüüme (Burg et al., 2002). Üks edukamaid GSH analooge vähi ravis on TLK286, mis on praegu ka kliinilistes katsetustes (Rosen et al 2003). Mõned disainitud GSH analoogid on näidanud võimsat proliferatsiooni ja tuumorite vastast aktiivsust (Lo & Thornalley, 1992).

Hiljuti disainiti TÜ Biokeemia Instituudis Ursel Soomets'a juhitud töögrupi poolt uued glutatiooni analoogid – UPF1 ja UPF17. UPF1 puhul lisati glutatiooni N-terminaalsesse otsa neljandaks aminohappejäägiks metoksü-L-türosiini jääk (Joonis 5) ning UPF17 puhul muudeti UPF1's esinev γ -side α -sidemeks (Joonis 6). Eelnevalt on näidatud, et UPF1 on ~60 korda (Pöder et al., 2004) ning UPF17 ~1000 korda parem reaktiivsete osakeste kahjutustaja kui GSH ise. On viidud läbi ka nende uute glutatiooni analoogide toksilisuse uuringud ning näidati, et UPF1 ja UPF17 ei mõjuta 200 μ M kontsentratsioonides inimese erütroleukeemia rakkude – K562 eluvõimet (Ehrlich et al., 2007).



Joonis 5. UPF1 struktuur (Ehrlich et al., 2007).



Joonis 6. UPF17 struktuur (Ehrlich et al., 2007).

Tänu sellele, et on sünteesitud uusi efektiivseid ja väga erinevate funktsioonidega glutatiooni analooge, võib antioksidantne ravi tulevikus anda lisavõimaluse psoriaasi kontrolli alla saamiseks.

2. MAGISTRITÖÖ EESMÄRK

Magistritöö eesmärkideks oli:

- 1) uurida antioksidatiivse glutatioonisüsteemi ensüümide geeniekspressiooni erinevusi psoriaasahaigete ja tervete indiviidide perifeerse vere mononukleaarrakudest TaqMan QRT-PCR meetodil;
- 2) uurida Tartu Ülikoolis disainitud uudsete antioksidantsete tetrapeptiidsete glutatiooni analoogide mõju nimetatud süsteemi ensüümide mRNA ekspressioonile.

3. MATERJAL JA METOODIKA

3.1 UURIMISGRUPID

Glutatioonisüsteemi ensüümide uuringus osales 20 tervet indiviidi ja 20 psoriaasiga haiget. Uuritavad koguti SA Tartu Ülikooli Nahahaiguste kliinikus dr Külli Kingo poolt. Uuringus osalesid naastulise psoriaasiga haiged, kellel esines mõõdukas kuni raske haigusvorm (Tabel 1). Haigusvormi raskust hinnati PASI (*Psoriasis Area and Severity Index*) skoori abil, mis arvestab nahalööbe aktiivsust ja ulatust. Vastavalt PASI skooridele, jagati patsiendid kahte gruppi – PASI ≤ 20 (n=7; 5(N); 2(M)) ning PASI >20 (n=13; 3(N); 10(M)). Neljateistkümmel haigel (3(N), 11(M)) esines kaasuvana psoriaatiline küünekahjustus ning kuuel haigel (2(N), 4(M)) psoriaatiline liigeskahjustus. Uuringusse kaasati haiged, kes ei olnud saanud eelnevalt 3 kuu vältel süsteemset või lokaalset ja valgusravi. Kontrollgrupi moodustasid inimesed, kes ei põdenud kroonilisi põletikulisi nahahaigusi ning kellel perekonnas ei esinenud psoriaasi. Vereanalüüsid koguti uuritavatelt peale kirjaliku nõusoleku saamist ja eetikakomitee loal.

Tabel 1 Glutatioonisüsteemi ensüümide uuringus osalenud indiviidide iseloomustus

	Indiviidide koguarv	Sugu naised/mehed	Perekondlik psoriaas	Vanuse vahemik (aastates)	Keskmine haigestumine (aastates)	Keskmine psoriaasi kestvus (aastates)
Psoriaasiga patsiendid	20	8/12	6	22 – 82	29,65	21,1
Terved kontrollid	20	8/12	-	21 – 54	-	-

3.2 PERIFEEVERSE VERE MONONUKLEAARRAKUDE ISOLEERIMINE

Vere mononukleaarrakud isoleeriti perifeersest verest, kasutades *Ficoll*'i gradiendis tsentrifugimist (1500 x g 30 min 22°C). Rakke pesti kaks korda PBS'is ning tsentrifugiti põhja peale mõlemat pesu (200 x g 10 min 22°C). Peale teist rakkude tsentrifugimist, resuspendeeriti rakud RPMI-1640 söötmes, mis sisaldas veise loote seerumit ja antibiootikume (250 ml RPMI-1640 + 25 ml veise loote seerumit + 2,5 ml penitsilliini ja streptomütsiini segu) (*Invitrogen*).

Glutatioonisüsteemi ensüümide uuringus osales 20 psoriaasahaiget ja 20 tervet kontrolli, kelle mononukleaarrakkudest mõõdeti nimetatud süsteemi ensüümide mRNA ekspressiooni tasemed. Uute antioksidantsete glutatiooni analoogide (UPF1 ja UPF17) uurimiseks jaotati viie psoriaasiga patsiendi ja viie kontrollisiku vererakud kolme koekultuuri tassi vahel, millest ühel tassil olevad rakud jäeti stimuleerimata ning kahte ülejäänut stimuleeriti vastavalt UPF1 ja UPF17. Antioksidantsete peptiidide lõplikuks kontsentratsiooniks söötmes oli 500 nM. Ülejäänud 15 patsiendi ja 15 kontrollindiviidi vererakke ei stimuleeritud antioksidantsete peptiididega. Rakke inkubeeriti 12 h 37°C ja 5% CO₂ juuresolekul. Peale 12 h inkubeerimist koguti rakud koekultuuri tassidelt ning eraldati RNA.

3.3 RNA ERALDAMINE

RNA eraldamiseks kasutati *Trizol Reagent*'i. RNA isoleeriti vastavalt tootja instruktsioonidele (*Invitrogen*).

Rakud lüüsi 500 µl *Trizol Reagent*'is edasi-tagasi pipeteerides ja seejärel inkubeeriti 5 min 15-30°C juures. Peale inkubeerimist lisati 100 µl kloroformi ning inkubeeriti 2-3 min 15-30°C juures. Peale seda tsentrifugiti rakke 12 000 x g 15 min 4°C. Tekkinud vesifaasi tõsteti puhtasse tuubi ning lisati 250 µl isopropanooli. Järgnevalt inkubeeriti proove 10 min 15-30°C juures ning tsentrifugiti 12 000 x g 10 min 4°C. Supernatant eemaldati ning RNA pesti 500 µl 75% etanooliga. Proovid segati vorteksil ning tsentrifugiti 7 500 x g 5 min 4°C. Supernatant eemaldati ning RNA kuivatati 10 min jooksul ja lahustati *RNase*'i vabas vees 10 min 55°C juures ja asetati peale seda jääle. Peale protseduure mõõdeti RNA kontsentratsioon, kasutades

NanoDrop ND-1000 spektrofotomeetrit. RNA kontsentratsioonid varieerusid 27,7 ng/ μ l – 241,4 ng/ μ l. Peale kontsentratsioonide mõõtmist säilitati RNA -80°C juures edasiseks kasutamiseks.

3.4 cDNA SÜNTEES

cDNA sünteesiti pöördtranskriptaasi reaktsiooni teel 250 ng totaalsest RNA'ist, kasutades ensüümina *SuperScript III (Invitrogen)*. Pöördtranskriptsiooni tingimused: inkubeerimine 65°C juures 5 min, millele järgnes inkubeerimine 0°C 1 min ning süntees 50°C 90 min. Sellele järgnes inaktivatsioon 70°C 5 min. cDNA säilitati -80°C juures edasiseks kasutamiseks.

3.5 KVANTITATIIVNE PÖÖRDTRANSKRIPTAASI PCR ANALÜÜS

Erinevate glutatioonisüsteemi ensüümide ekspressiooni tasemed detekteeriti kasutades TaqMan-QRT-PCR meetodit (*ABI Prism 7900HT Sequence Detection System, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*). Kasutati TaqMan Assay-On-Demand (*FAM-labelled MGB-probe*) FAM-MGB'ga märgistatud geeni ekspressiooni praimerisegu (*20x gene expression assay mix*) ja TaqMan® universaalset Master Mix'i. HPRT-1 (*Hypoxanthine Phosphoribosyl-Transferase-1*) ekspressiooni tase detekteeriti, kasutades spetsiifilisi primereid (HPRT-1 ekson 6, 5'-GACCTTGCTTTCCTTGGTCAGG-3'; HPRT-1 ekson 7, 5'-AGTCTGGCTTATATCCAACACTTCG-3'; lõpliku kontsentratsiooniga 300 nM) ja VIC-Tamra'ga märgistatud proovi (VIC-5'-TTTCACCAGCAAGCTTGCGACCTTGA-3'-TAMRA; lõpliku kontsentratsiooniga 200 nM). Reaktsioon viidi läbi 10 μ l reaktsioonimahus ja neljas korduses. Erinevate geenide ekspressiooni tasemed arvutati sõltuvuses koduhoidja geeni – HPRT-1'ga.

mRNA koguse määramiseks kasutati võrdelist Ct meetodit, kus sihtmärk geeni hulk normaliseeriti endogeense võrdlustasemega (Δ Ct). Statistilisteks analüüsideks (*Mann-Whitney U test*) kasutati GraphPad Prism 4 tarkvara. Korrelatsioonanalüüsi

(*Spearman*'i korrelatsiooni kordaja) kasutati kahe parameetri omavaheliste seoste leidmiseks.

- Uuritavad glutatioonisüsteemi ensüümid

Glutatiooni süntetaas (GSS) – Hs00609286_m1

Glutatiooni reduktaas (GSR) – Hs00167317_m1

Glutatiooni S-transferaas- π (GSTP1) – Hs00168310_m1

γ -glutamüültransferaas 1 (GGT1) – Hs00360188_m1

γ -glutamüültransferaasi sarnane ensüüm 3 (GGTL3) – Hs00369304_m1

γ -glutamüültransferaasi sarnase aktiivsusega ensüüm 1 (GGTLA1) – Hs00269779_m1

Glutamaadi-tsüsteiini ligaas, katalüütiline subühik (GCLC) – Hs00155249_m1

Glutamaadi-tsüsteiini ligaas, modifitseeriv subühik (GCLM) – Hs00157694_m1

4. TULEMUSED

Glutatioonisüsteemi ensüümide uurimiseks mõõdeti 20 kontrollindiviidil ja 20 psoriaasiga haigel perifeerse vere mononukleaarakkudest kaheksa glutatiooni metabolismis osaleva ensüümi (GSS, GSR, GSTP1, GGT1, GGTL3, GGTLA1, GCLC, GCLM) mRNA ekspressiooni tase QRT-PCR meetodi abil. Lisaks uuriti Tartu Ülikoolis sünteesitud uute antioksidantsete glutatiooni analoogide (UPF1 ja UPF17) mõju uuritavate ensüümide mRNA ekspressioonile. Selleks stimuleeriti viie kontrollisiku ja viie psoriaasiga patsiendi mononukleaarakke UPF1 ja UPF17 peptiididega. Uuritavate geenide mRNA ekspressiooni tasemed psoriaasiga patsientidel ja tervetel kontrollindiviididel on näidatud Lisa's 1 ning antioksidantsete peptiidide efektid uuritavate geenide ekspressioonile tervete ja haigete grupis on välja toodud vastavalt Lisa's 2 ja Lisa's 3. Statistiliste analüüside teostamiseks kasutati *Mann-Whitney U test*'i.

4.1 GEENIDE EKSPRESSIOONI ERINEVUSED SUGUDEVAAHELISELT

Võimalike sugudevahelise erinevuse leidmiseks võrdlesime omavahel uuritavate geenide mRNA ekspressioone meeste ja naiste gruppides ning teostasime analüüsi, mis näitas, et sugudevaheline ekspressioonide erinevus puudub nii kontrollindiviidide kui ka psoriaasihaigete grupis.

4.2 GEENIDE EKSPRESSIOONI ERINEVUSED PSORIAASIHAIGETE JA KONTROLLINDIVIIDIDE VAHEL

Kõigi kaheksa uuritud geeni mRNA ekspressiooni tasemed olid psoriaasihaigete grupis madalamad võrreldes tervete kontrollindiviididega. Statistiline analüüs andis viie geeni (GSS, GGTL3, GGTLA1, GCLC, GCLM) puhul statistiliselt olulise erinevuse haigete ja tervete vahel (vt Lisa 1). Uuritud geenide hulgast andis statistiliselt kõige olulisema tulemuse GSS. GSS'i mRNA ekspressioon oli

psoriaasahaigetel 1,4 korda madalam võrreldes tervete indiviididega ($p < 0,001$). Tugeva statistilise erinevuse saime ka GGTL3 geeni puhul ($p < 0,01$), mis psoriaasahaigete grupis ekspresseerus 1,5 korda madalamalt ning GCLC ($p < 0,01$) geeni puhul, mille mRNA ekspressioon haigete grupis oli 1,7 korda madalam. Ülejäänud kaks geeni, GGTLA1 ja GCLM, andsid nõrga statistilise seose ($p < 0,05$) ning mRNA ekspressioonid oli haigete grupis vastavalt 1,8 korda ja 1,3 korda madalamad võrreldes kontrollisikutega.

Ülejäänud kolm geeni (GSR, GSTP1 ja GGT1) ei näidanud statistiliselt olulisi seoseid, kuid ka nende geenide puhul olid haigete grupis märgatavad selged tendentsid madalamale mRNA ekspressioonile (vt Lisa 1).

4.3 GEENIDE EKSPRESSIOONI ERINEVUSED SÕLTUVALT NAHALÖÖBE AKTIIVSUSEST JA ULATUSEST NING KAASUVATEST KÜÜNTE- JA LIIGESKAHJUSTUSTEST

Leidmaks võimalikke seoseid haiguse aktiivsuse ning uuritavate geenide ekspressioonide vahel, võrdlesime omavahel terveid indiviide ja psoriaasahaigeid, kellel PASI skoor oli ≤ 20 ning terveid kontrollisikuid ja haigeid, kellel PASI skoor oli > 20 . Samuti võrdlesime omavahel haigeid PASI skooriga ≤ 20 ning > 20 . Statistiliselt olulisi seoseid psoriaasi ulatuse ja raskusastme ning uuritavate geenide vahel ei ilmnenud.

Võimalike seoste leidmiseks psoriaatiliste küünekahjustuste ja uuritavate geenide ekspressiooni tasemete vahel võrdlesime omavahel küünekahjustustega psoriaasahaigeid ($n=14$) ja terveid kontrollindiviide ning samuti küünekahjustustega ja küünekahjustuseta haigeid. Statistiliselt olulisi seoseid me ei leidnud.

Võrreldes liigeskahjustusega ja liigeskahjustuseta haigeid tervete kontrollindiviididega, statistiliselt olulisi erinevusi me ei leidnud. Samas leidsime statistiliselt olulise erinevuse GSR mRNA ekspressioonis võrreldes omavahel liigeskahjustusega ning liigeskahjustuseta psoriaasahaigeid ($p < 0,05$). Liigeskahjustusega patsientidel oli GSR mRNA ekspressioon kaks korda madalam kui liigeskahjustuseta patsientidel.

4.4 KORRELATSIOONANALÜÜS

Võimalike seoste leidmiseks erinevate geenide vahel, viisime läbi *Spearman*'i korrelatsioonanalüüsi. Korrelatsioonanalüüsi andmed erinevate geenide ekspressioonide vahel psoriaasahaigetel ja tervetel kontrollindiviididel on toodud Lisa's 4.

Kontrollindiviidide grupis saime positiivse korrelatsiooni GSTP1 ja GGTLA1 ($r=0,66$; 95% CI 0,30 – 0,86; $p<0,01$) ning GSTP1 ja GCLM geenide mRNA tasemete vahel ($r=0,58$; 95% CI 0,18 – 0,82; $p<0,01$). Negatiivne korrelatsioon ilmnes GGT1 ja GSTP1 ($r=-0,60$; 95% CI -0,83 – -0,21; $p<0,01$) ning GGT1 ja GGTLA1 ($r=-0,48$; 95% CI -0,77 – -0,04; $p<0,05$) mRNA ekspressioonide vahel, sealjuures GGT1 oli positiivselt seotud GGTL3 ekspressiooniga ($r=0,51$; 95% CI 0,08 – 0,78; $p<0,05$). Kontrollindiviidide grupis olid omavahel positiivselt seotud veel GGTLA1 ja GCLM mRNA ekspressioon ($r=0,51$; 95% CI 0,07 – 0,78; $p<0,05$).

Psoriaasahaigete grupis saime positiivse korrelatsiooni GSS ja GSR ($r=0,49$; 95% CI 0,05 – 0,77; $p<0,05$) ning GSS ja GGTLA1 mRNA ekspressiooni vahel ($r=0,48$; 95% CI 0,015 – 0,77; $p<0,05$). Seejuures negatiivne korrelatsioon ilmnes GSS ja GGTL3 mRNA ekspressiooni vahel ($r=-0,59$; 95% CI -0,82 – -0,18; $p<0,01$). Positiivselt korreleerusid omavahel veel GGT1 ja GGTL3 geenid ($r=0,54$; 95% CI 0,1046 – 0,8055; $p<0,05$).

4.5 ANTIOKSÜDANTSETE PEPTIIDIDE TOIMED ENSÜÜMIDE mRNA EKSPRESSIOONIDELE

Uurimaks antioksidantseid peptiide, stimuleerisime viie kontrollisiku ja viie psoriaasahaige perifeerse vere mononukleaarrakke UPF1 ja UPF17 ning mõõtsime nende mõju glutatioonisüsteemi ensüümide ekspressioonile QRT-PCR'i meetodi abil. Uued antioksidantsed peptiidid olid väga efektiivsed, mõjutades uuritavate geenide ekspressioone eelkõige psoriaasahaigetel. Nii UPF1 kui ka UPF17 tõstsid kõigi uuritavate geenide ekspressioone haigete grupis (vt. Lisa 3), sealjuures oli tõus statistiliselt oluline nelja geeni puhul (GSS, GSR, GGT1, GCLC). Samuti tõstsid uued

antioksidantsed peptiidid mõnede geenide ekspressioone ka tervete grupis (vt. Lisa 2), statistiliselt oluline seos ilmnas kahe geeni puhul (GCLC ja GCLM).

UPF1 ja UPF17 stimulatsiooni järgselt tõusis statistiliselt oluliselt psoriaasahaigete GSS mRNA ekspressioon 1,8 korda (vastavalt $p < 0,05$ ja $p < 0,01$), viies GSS'i ekspressiooni taseme haigetel võrreldavale tasemele tervete kontrollindiviididega. Peale selle tõstis UPF1 haigete grupis statistiliselt oluliselt GSR mRNA ekspressiooni 1,9 korda ($p < 0,01$), viies GSR'i mRNA ekspressiooni isegi kõrgemale kontrollisikutel mõõdetud tasemest. GGT1 mRNA ekspressioon tõusis haigete grupis UPF17 stimulatsiooni järgselt 1,9 korda ($p < 0,05$), ületades samuti kontrollindiviidide GGT1 ekspressiooni taseme. GCLC mRNA tase tõusis statistiliselt oluliselt UPF17 stimulatsiooni järgselt nii tervete kui ka psoriaasahaigete grupis vastavalt 1,3 korda ja 1,9 korda ($p < 0,05$), viies haigete GCLC mRNA taseme taas kõrgemale kui kontrollindiviididel. UPF1 stimulatsiooni järgselt tõusis kontrollisikute grupis statistiliselt oluliselt GCLM mRNA ekspressiooni tase 1,7 korda ($p < 0,05$).

5. ARUTELU

Psoriaas on sagedasti esinev krooniline retsidiivide ja remissioonidega kulgev, põletikuline nahahaigus (*Naldi & Rzany, 2004*). On mitmeid uuringuid, mis näitavad, et haiguse patogeneesis on olulisel kohal kõrgeenenud ROS'ide produktsioon, mis tekivad tänu pidevatele põletikulistele protsessidele nahas (*Maccarrone et al., 1997; Kavanagh et al., 1996*). Oksüdatiivse stressi kompenseerimiseks funktsioneerib rakkudes antioksidatiivne glutatioonisüsteem, mis kahjutustab ROS'e ning kaitseb seeläbi ülemäärase oksüdatiivse stressi eest (*Dickinson & Forman, 2002*).

Varasemad psoriaasiga seotud glutatioonisüsteemi käsitlevad uuringud on keskendunud enamasti glutatiooni peroksüdaasi (GPX), katalaasi (CAT) ja superoksiidi dismutaasi (SOD) tasemete määramisele ning sageli on erinevate uurimisgruppide poolt saadud tulemused olnud vastuolulised. *Therond* ja tema töögrupp näitasid psoriaasahaigete fibroblastides ja erütrotsüütides esinevat kõrget SOD'i taset (*Therond et al., 1996*), samal ajal kui *Polkanov* oma töögrupiga sai vastupidise tulemuse (*Polkanov et al., 1987*). Sarnaselt *Polkanov*'i uurimisgrupiga, näitas *Yildirim* oma kaastöötajatega statistiliselt olulist erinevust haigete ja tervete vahel, sealjuures psoriaasiga patsientidel oli SOD'i tase madalam kui tervetel (*Yildirim et al., 2003*). Samuti said nad *Polkanov*'i töögrupiga sarnase tulemuse GPX'i ja CAT'i suhtes. Mõlemate uurijate poolt saadud tulemused näitasid GPX'i madalamat ning CAT'i kõrgemat taset psoriaasahaigete grupis võrreldes tervete kontrollindiviididega (*Polkanov et al., 1987; Yildirim et al., 2003*). *Smith* oma töögrupiga uuris GST ja GPX ensüümide ekspresseid psoriaasahaigete terves ja haiges nahas. Nad leidsid, et psoriaatilistes nahakahjustustes on GSTP1 ja GPX geenide ekspressiooni tasemed kõrgemad kui sama indiviidi terves nahas, vastavalt 3,74 korda ($p < 0,0001$) ja 1,38 korda ($p = 0,002$). Lisaks uurisid nad ka UV kiirguse toimet nimetatud geenide ekspressioonile ning leidsid, et GSTP1 ja GPX ekspressiooni tase tõusis peale stimulatsiooni haiges nahas statistiliselt oluliselt, (mõlema geeni puhul $p < 0,0001$), viidates rakkude kaitsemehhanismile oksüdatiivse stressi vastu, aktiveerides antioksidatiivse glutatioonisüsteemi geene (*Smith et al., 2003*).

Teadaolevalt ei ole siiani psoriaasahaigete antioksidatiivse süsteemi ensüümide taset väga laialdaselt uuritud. Kuna on teada, et psoriaasi ei ole ainult nahahaigus, vaid tegemist on süsteemse haigusega, siis sellest tulenevalt saigi magistritöö eesmärgiks

seatud ülejäänud glutatiooni metabolismis oluliste ensüümide taseme määramine perifeerse vere mononukleaarakkudest ning uute antioksidatiivsete glutatiooni analoogide võimalike efektide uurimine psoriaasihaigetel.

Töö eesmärgiks oli määrata psoriaasihaigete ja kontrollindiviidide glutatiooni metabolismis osalevate geenide (GSS, GSR, GSTP1, GGT1, GGTL3, GGTLA1, GCLC, GCLM) ekspressiooni tase QRT-PCR meetodil. Kõikide uuritud geenide mRNA ekspressioonitasemed olid psoriaasihaigetel võrreldes tervete kontrollindiviididega madalamad ning geenide GSS, GGTL3, GGTLA1, GCLC, GCLM puhul olid erinevused statistiliselt olulised (vt Lisa 1). Nendest geenidest GSS'1, GCLC'1 ja GCLM'1 on väga oluline funktsioon, nimelt need ensüümid on vastutavad glutamaadist, tsüsteiinist ja glütsiinist moodustatava GSH molekuli sünteesi eest ning seega on psoriaasihaigetel glutatiooni süntees limiteeritud peale tsüstiini kättesaadavuse ka ensüümide madalama tasemega. Samuti olid psoriaasiga haigetel statistiliselt oluliselt langenud GGTL3 ja GGTLA1 geenide ekspressioonid. GGT ja temaga sarnased ensüümid on võimelised hüdrolyüsima GSH glutamaadiks ja tsüsteinüülglytsiiniks, ning tsüsteinüülglytsiinid võivad omakorda olla substraadiks peptidaasidele. Nende reaktsioonide poolt produtseeritud vabad aminohapped transportitakse tagasi rakkudesse glutamaadi/tsüstiini antiporterite poolt ning neid kasutatakse taas GSH regenereerimisel. Seetõttu võib järeldada, et psoriaasiga haigetel on GSH sünteesiks vajalike komponentide transport rakku häiritud ning seetõttu ka GSH süntees pärssitud. Ülejäänud kolm geeni, GSR, GSTP1 ja GGT1 mRNA ekspressioonitasemed ei erinenud gruppide vahel statistiliselt, kuid haigete grupis ilmsid selged tendentsid nende geenide madalamale ekspressioonile. Kuid liigeskahjustustega haigetel leidsime statistiliselt oluliselt madalama GSR geeniekspressiooni ($p < 0,05$) võrreldes liigeskahjustuseta patsientidega. Nimelt ekspresseerus liigeskahjustusega patsientidel GSR geen kaks korda madalamalt võrreldes liigeskahjustuseta haigetega. Seega võib kokkuvõtvalt öelda, et psoriaasi puhul esineb üldine glutatioonisüsteemi madal aktiivsus, mis peegeldab antioksidatiivse süsteemi ebaefektiivsust ning mille tõttu ei suudeta tõusnud ROS'ide taset piisavalt alandada ja haiguse teket pidurdada.

Korrelatsioonanalüüs näitas, et mõlemas uurimisgrupis oli gene, mis olid suuremal või vähemal määral positiivselt või negatiivselt seotud. Kontrollgrupis korreleerusid omavahel positiivselt neli geeni ning negatiivselt kaks geeni, samal ajal kui psoriaasihaigete grupis olid omavahel positiivselt seotud kolm geeni ja negatiivselt

üks geen. Ilmnes tõsiasi, et haigete ja tervete grupis on omavahel korreleeruvad geenid suhteliselt erinevad. Ainus korrelatsioon, mis haigete grupis langes kokku kontrollgrupis vaadeldud korrelatsiooniga, esines geenide GGT1 ja GGTLA3 vahel, viidates, et vähemalt nende nimetatud geenide regulatsioon võiks toimuda psoriaasahaigetel samamoodi nagu kontrollindiviididel. See, et psoriaasahaigete grupis leitud geenide omavahelised korrelatsioonid ei lange kokku kontrollindiviidide omadega, võiks viidata haigete puhul esinevale geeniregulatsiooni erinevusele, mille tulemuseks võivadki olla geenide korrelatsioonimustri erinevused kontrollindiviidide ja haigete vahel.

Käesolevas uurimuses katsetasime esmakordselt psoriaasahaigete perifeerse vere mononukleaarakkudel antioksidantseid peptiide, UPF1 ja UPF17, mis osutusid väga efektiivseteks psoriaasahaigete glutatioonisüsteemi ensüümide ekspressiooni taastamisel. UPF1 ja UPF17 tõstsid haigetel uuritavate geenide mRNA ekspressioonid samale või isegi kõrgemale tasemele võrreldes tervete kontrollindiviididega. Võib oletada, et tänu antioksidatiivse süsteemi taastumisele suudaksid rakud võidelda efektiivsemalt ROS'ide kahjustava toime vastu ning vähendada seeläbi üleüldist oksüdatiivset stressi. Kuidas ja kuhu UPF1 ja UPF17 toimivad, ei ole veel täpselt teada ning edasised uuringud on tingimata vajalikud. Oletatavasti mõjutavad meie poolt uuritud antioksidantsed peptiidid rakutuumas erinevaid transkriptsioonifaktoreid või muid seal paiknevaid geeni ekspressiooni regulaatoreid, aktiveerides sealhulgas ka glutatioonisüsteemi ensüümide ekspressioone. Glutatiooni analooge UPF1 ja UPF17 võiks seetõttu käsitleda kui uusi võimalikke märklaud medikamente psoriaasi ravis.

6. KOKKUVÕTE

Psoriaas on krooniline põletikuline T-rakkude poolt vahendatud autoimmuunhaigus esinedes ülemaailmselt sagedusega 1-5% (*Naldi, 2004*). Psoriaasi peetakse multifaktoriaalseks haiguseks, mille tekkes osalevad nii pärilikud kui ka keskkonnast tulenevad faktorid (*Hannuksela et al., 2006*). Kuna psoriaasi patogeneesi põhjused ei ole tänaseni lõplikult selged, siis arvatakse, et haiguse üheks võimalikuks tekkepõhjuseks võiks olla antioksidatiivse glutatioonisüsteemi aktiivsuse vähenemine ning üldine ROS'ide taseme tõus tänu pidevalt esinevatele põletikulistele protsessidele (*Ortonne et al., 1996*). Kuna senised uuringud on piirdunud üksikute antioksidantsete ensüümide määramisega psoriaasiga haigetel, sai sellest tulenevalt käesoleva magistritöö eesmärgiks seatud peaaegu terve glutatioonisüsteemi ensüümide taseme määramine kontrollindiviididel ja haigetel.

Eksperimentaalses töös mõõdeti psoriaasahaigete ja kontrollindiviidide perifeerse vere mononukleaar-rakkude kaheksa glutatiooni metabolismis oluliste geenide mRNA ekspressiooni tasemed. Esmakordselt näidati, et kõigi uurimise all olnud geenide (GSS, GSR, GSTP1, GGT1, GGTL3, GGTLA1, GCLC, GCLM) ekspressioonitasemed olid psoriaasahaigetel võrreldes kontrollindiviididega märkimisväärselt madalamad. Seejärel uuriti Tartu Ülikoolis Ursel Soomets' a töögrupi poolt sünteesitud uute antioksidantsete glutatiooni analoogide UPF1 ja UPF17 toimeid uuritavate geenide ekspressioonidele. Uued antioksidantsed peptiidid osutusid väga efektiivseteks glutatioonisüsteemi ensüümide aktiivsuse taastajateks psoriaasahaigete grupis, tõstes geenide ekspressiooni tasemed samale või isegi kõrgemale tasemele võrreldes kontrollindiviididega.

Arvame, et neid uusi antioksidantseid peptiide võiks käsitleda kui uusi võimalikke ravimeellasi psoriaasi ravis. Kuna nende täpne toimemehhanism pole veel lõplikult selge, on edasised uuringud tingimata vajalikud.

7. SUMMARY

Psoriasis is chronic inflammatory T-cell mediated autoimmune disease with the worldwide prevalence 1-5% (*Naldi, 2004*). Psoriasis is considered to be multifactorial disease, caused by the factors derived from genes and environment (*Hannuksela, 2006*). As long as the pathogenesis of psoriasis remains unclear, it is believed that one possible reason could be the decreased activity of antioxidative glutathione system and the general increased level of ROS caused by the constant inflammatory processes in skin (*Ortonne et al., 1996*). So far only few antioxidative enzymes have been studied in patients with psoriasis and therefore the aim of master's thesis become to evaluate the expression of almost all glutathione system enzymes in patients with psoriasis.

In experimental work we detected the mRNA of eight significant genes of glutathione metabolism from peripheral blood mononuclear cells in patients with psoriasis and in healthy controls. For the first time we showed that expressions of all studied genes (GSS, GSR, GSTP1, GGT1, GGTL3, GGTLA1, GCLC, GCLM) were lower in psoriasis patients compared to healthy volunteers. Further we investigated the effects of novel antioxidative glutathione analogues UPF1 and UPF17 on the expression of glutathione enzymes. These glutathione analogues were recently designed at the University of Tartu by Ursel Soomets. UPF1 and UPF17 appeared to be very effective – they increased the expression of all studied genes in the group of patients with psoriasis. Moreover, in group of psoriasis patients the expression of studied genes after the stimulation with UPF1 and UPF17 was higher compared to gene levels in healthy controls.

We believe that these novel antioxidative peptides could be new possible drugs for the treatment of psoriasis. Since their exact mode of action is unknown, further studies are needed in future.

8. TÄNUAVALDUSED

Käesoleva magistritöö valmimisele on kaasa aidanud väga paljud toredad inimesed. Väga suured tänud kuuluvad juhendajatele Sulev Kõks'ile, Külli Kingo'le ja Ursel Soomets'ale. Samuti vajavad eraldi tänamist abivalmid laborikaaslased ja teised lähedased inimesed, kes igal võimalikul viisil on abiks olnud.

9. KASUTATUD KIRJANDUS

Abel EA., DiCicco LM., Orenberg EK., Fraki JE. & Farber EM. Drugs in exacerbation of psoriasis (1986). *J Am Acad Dermatol.* 15 (5 pt 1): 1007 – 22.

Bains J.S. & Shaw C.A. Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress mediated neuronal death (1997). *Brain Res. Rev.* 25, 335–358.

Bernard GR. N-acetylcysteine in experimental and clinical acute lung injury (1991). *Am J Med* 91: 54S-59S.

Biondi C., Scarpa R., Pucino A. & Oriente P. Psoriasis and psoriatic arthritis. Dermatological and rheumatological co-operative clinical report (1989). *Acta Derm Venereol Suppl* 146: 69 – 71.

Burg D., Filippov DV., Hermanns R., van der Marel GA., van Boom JH. & Mulder GJ. Peptiomimetic glutathione analogues as novel gammaGT stable GST inhibitors (2002). *Bioorg Med Chem* 10: 195-205.

Cnubben NHP, Rietjens IMCM, Wortelboer H., van Zander J. & van Bladeren PJ. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense (2001). *Environ Toxicol Pharmacol* 10: 141-152.

Cohen G. & Hochstein P. Glutathione peroxidase: the primary agent for the elimination of hydrogen peroxide in erythrocytes (1963). *Biochemistry* 2: 1420-8.

Cotgreave I.A. & Gerdes R.G. Recent trends in glutathione biochemistry—glutathione-protein interactions: a molecular link between oxidative stress and cell proliferation? (1998) *Biochem Biophys Res Commun.* 242, 1–9.

Dalton TP., Chen Y., Schneider SN., Nebert DW. & Shertzer HG. Genetically altered mice to evaluate glutathione homeostasis in health and disease (2004). *Free Radical Biology & Medicine*, vol 37, 10: 1511-1526.

Dickinson DA. & Forman HJ. Cellular glutathione and thiols metabolism (2002). *Biochemical pharmacology* 64: 1019-1026.

Dickinson D.A., Levonen A.-L., Moellering D.R., Arnold E.K., Zhang H., Darley-Usmar V.M. & Forman H.J. Human glutamate cysteine ligase gene regulation through the electrophile response element (2004). *Free Radic. Biol. Med.* 37, 1152–1159.

Dorge W. Aging-related changes in the thiol/disulfide redox state: implications for the use of thiol antioxidants (2002). *Exp Gerontol* 37: 1333-1345.

Ehrlich K., Viirlaid S., Mahlapuu R., Saar K., Kullisaar T., Zilmer M., Langel Ü. & Soomets U. Design, synthesis and properties of novel powerful antioxidants, glutathione analogues (2007). *Free radical research.* Submitted 18 Jan, 2007.

- Emerit J., Edeas M. & Bricaire F. Neurodegenerative diseases and oxidative stress (2004). *Biomed Pharmacother* 58: 39-46.
- Fernandez-Checa J.C., Kaplowitz N., Garcia-Ruiz C. & Colell A. Mitochondrial glutathione: importance and transport (1998). *Semin. Liver Dis.* 18, 389–401.
- Gate L., Paul J., Ba GN., Tew KD. & Tapiero H. Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants (1999). *Biomed Pharmacother* 53: 169-180.
- Gaullier JM., Lafontant P., Valla A., Bazin M., Giraud M. & Santus R. Glutathione peroxidase and glutathione reductase activities towards glutathione-derived antioxidants (1994). *Biochem Biophys Res Commun* 203: 1668-1674.
- Giardina E., Sinibaldi C. & Novelli G. The psoriasis genetics as a model of complex disease (2004). *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 3: 129 – 36.
- Griffith OW. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis (1999). *Free Radic Biol Med* 27: 922-935.
- Gudjonsson JE., Johnston A., Sigmundsdottir H. & Valdimarsson H. Immunopathogenic mechanisms in psoriasis (2004). *Clin Exp Immunol* 135: 1 – 8.
- Gudjonsson JE., Karason A., Antonsdottir A. et al. HLA-Cw6-positive and HLA-CW6-negative patients with psoriasis vulgaris have distinct clinical features (2002). *J Invest Dermatol* 118: 362 – 5.
- Gudjonsson JE., Karason A., Antonsdottir A. et al. Psoriasis patients who are homozygous for the HLA-Cw6*0602 allele have a 2,5 fold increased risk of developing psoriasis compared with Cw6-heterozygotes (2003). *Br J Dermatol* 148: 233 – 5.
- Halliwell B. & Gutteridge J.M.C. *Free radicals in biology and medicine* (1999). Oxford, New York.
- Halliwell B., Gutteridge JMC. & Cross CE. Free radicals, antioxidants and human diseases: where are we now? (1992). *J Laboratory Clin Med* 119: 598 – 620.
- Hannuksela M, Reunala T, Karvonen J & Suhonen R. Nahahaigused (2006).
- Hayes J.D. & McLellan L.I. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress (1999). *Free Radic. Res.* 31, 273–300.
- Jefferies H., Coster J., Khalil A., Bot J., McCauley RD. & Hall JC. Glutathione (2003). *ANZ J Surg* 73: 517-522
- Kavanagh GM., Burton JL. & Dannell VO. Effects of dithranol on neutrophil superoxide generation in patient with psoriasis (1996). *Br J Dermatol* 134: 234 – 237.

- Klatt P. & Lamas S. Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress (2000). *Eur. J. Biochem.* 267, 4928–4944.
- Knight JA. Diseases related to oxygen-derived free radicals (1995). *Ann Clin Laboratory* 25: 111 – 121.
- Krueger JG. & Bowcock A. Psoriasis pathophysiology: current concepts of pathogenesis (2005). *Ann Rheum Dis* 64: ii30 – ii36.
- Langely RGB., Krueger GG. & Griffiths CEM. Psoriasis: epidemiology, clinical features and quality of life (2005). *Ann Rheum Dis* 64: ii18 – ii23.
- Lo TW. & Thornalley PJ. Inhibition of proliferation of human leukaemia 60 cells by diethyl esters of glyoxalase inhibitors in vitro (1992). *Biochem Pharmacol* 44: 2357-2363.
- Lopez-Barea J., Barcena J.A., Bocanegra J.A., Florindo J., Garcia-Alfonso C., Lopez-Ruiz A., Martinez- Galisteo E. & Peinado J. Structure, mechanism, functions and regulatory properties of glutathione reductase (1990). In: Vina, J. (Ed.), *Glutathione: Metabolism and Physiological Functions*. CRC, Boca Raton, FL, pp. 105–116.
- Luba K.M & Stulberg D.L. Chronic plaque psoriasis (2006). *American Family Physician*: vol 73, p 636 – 644.
- Lucente G., Luisi G. & Pinnen F. Design and synthesis of glutathione analogues (1998). *Farmaco* 53: 721-735.
- Maccarrone M., Catani MV. & Iraci S. A survey of reactive oxygen species and their role in dermatology (1997). *J Eur Acad Dermatol Venereol* 8: 185 – 202.
- Maher P. The effects of stress and aging on glutathione metabolism (2005). *Ageing Research Reviews* 4: 288-314.
- McBean G.J. Cerebral cystine uptake: a tale of two transporters (2002). *Trends Pharmacol. Sci.* 23, 299–302.
- Meister A. & Anderson M.E. Glutathione (1983). *Ann. Rev. Biochem.* 52, 711–760.
- Muyderman H., Nilsson M. & Sims N.R. Highly selective and prolonged depletion of mitochondrial glutathione in astrocytes markedly increases sensitivity to peroxynitrite (2004). *J. Neurosci.* 24 .
- Nachbar F. & Korting HC. The role of vitamin E in normal and damaged skin (1995). *J Mol Med* 73: 7 – 17.
- Nair RP., Stuart P., Henseler T., Jenisch S., ChiaNV., Westphal E et al. Localization of psoriasis-susceptibility locus PSORS1 to a 60-kb interval telomeric to HLA-C (2000). *Am J Hum Genet* 66: 1833 – 44.

Naldi L. Epidemiology of psoriasis (2004). *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 3: 121 – 8.

Naldi L. & Rzany B. Chronic plaque psoriasis (2004). *Clin Evid* 11: 2140 – 67.

Namazi MR. Paradoxical exacerbation of psoriasis in AIDS: proposed explanations including the potential roles of substance P and gram-negative bacteria (2004). *Autoimmunity* 37: 67 – 71.

Njalsson R., Carlsson K., Olin B., Carlsson B., Whitbread L., Polekhina G., Parker MW., Norgen S., Mannervik B., Board PG. & Larsson A. Patients with GS deficiency present with various clinical manifestations, including metabolic acidosis, 5-oxoprolinuria, progressive neurological dysfunction and haemolytic anemia (2000). *Biochem J* 349: 275-9.

Ortolani O., Conti A., De Gaudio AR., Moraldi E., Cantini Q. & Novelli G. The effect of glutathione and N-acetylcysteine on lipoperoxidative damage in patients with early septic shock (2000). *Am J Respir Crit Care Med* 161: 1907-1911.

Ortonne JP. Aetiology and pathogenesis of psoriasis (1996). *Br J Dermatol* 135: 1 – 5.

Ozawa M. & Alba S. Immunopathogenesis of psoriasis (2004). *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 3: 137 – 44.

Paradisi MP., Mollica A., Cacciatore I., Di Stefano A., Pinnen F., Caccuri AM., Ricci G., Dupre S., Spirito A. & Lucente G. Proline-glutamate in isopeptides. Synthesis and biological evaluation of conformationally restricted glutathione (2003). *Bioorg Med Chem* 11: 1677-1683.

Parola M., Bellomo G., Robino G., Barrera G. & Dianzani MU. 4-Hydroxynonenal as a biological signal: molecular basis and pathophysiological implications (1999). *Antioxid Redox Signal* 1: 255 – 284.

Pastore A., Federici G., Bertini E. & Piemonte F. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification (2003). *Clin Chim Acta* 333: 19-39.

Paydas S., Yuregir G.T., Sahin B., Seyrek E. & Burgut R. *Oncology*, 1995, 52, 112.

Picardi A. & Abeni D. Stressful life events and skin diseases: disentangling evidence from myth (2001). *Psychother Psychosom* 70: 118 – 36.

Polkanov VS., Bochkarev IM., Shmeleva LT. & Kipper SN. Lipid peroxidation and the blood antioxidant activity in psoriasis (1987). *Vestn Dermatol Venereol* 7: 42 – 46.

Powers SK. & Hamilton K. Antioxidants and exercise (1999). *Clin Sports Med* 18: 525 – 536.

Pöder P., Zilmer M., Starkopf J., Kals J., Talonpoika A., Pulges A., Langel Ü., Kullisaar T., Viirlaid S., Mahlapuu R., Zarkovski A., Arend A. & Soomets U. An

antioxidant tetrapeptide UPF1 in rats has a neuroprotective effect in transient global brain ischemia (2004). *Neurosci Lett* 370: 45-50.

Raynaud F., Brion DE. & Gerbaud P. Oxidative modulation of cyclic AMP-dependent protein kinase in human fibroblasts: possible role in psoriasis (1997). *Free Radical Biol Med* 22: 623 – 632.

Rinaldi R., Eliasson E., Swedmark S. & Morgenstern R. Reactive intermediates and the dynamics of glutathione transferases (2002). *Drug. Metab. Dispos.* 30, 1053–1058.

Rosen LS., Brown J., Laxa B., Boulos L., Reiswig L., Henner WD., Lum RT., Schow SR., Maack CA., Keck JG., Mascavage JC., Dombroski JA., Gomez RF. & Brown GL. Phase I study of TLK286 (glutathione S-transferase P1-1 activated glutathione analogue) in advanced refractory solid malignancies (2003). *Clin Cancer Res* 9: 1628-1638.

Schafer F.Q. & Buettner G.R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple (2001). *Free Radic. Biol. Med.* 30, 1191–1212.

Shilov VN. & Sergienko VI. Oxidative stress in keratinocytes as an etiopathogenetic factor of psoriasis (2000). *Bull Exp Biol Med* 129: 364 – 369.

Sies H. Glutathione and its role in cellular functions (1999). *Free Radic. Biol. Med.* 27, 916–921.

Sims N.R., Nilsson M. & Muyderman H. Mitochondrial glutathione: A modulator of brain cell death (2004). *J. Bioenerg. Biomem.* 36, 329–333.

Smith G., Dawe R.S., Clark C., Evans A.T., Comrie M.M., Wolf C.R., Ferguson J. & Ibbotson S.H. Quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction analysis of drug metabolizing and cytoprotective genes in psoriasis and regulation by ultraviolet radiation (2003). *The Journal of Investigative Dermatology* 2: 390 – 398.

Soltaninassab S.R., Sekhar K.R., Meredith M.J. & Freeman M.L. Multi-faceted regulation of γ -glutamylcystein synthetase (2000). *J. Cell. Physiol.* 183, 163–170.

Tham SN., Lim JJ., Tay SH., Chiew YF., Chua TN., Tan E et al. Clinical observation on nail changes in psoriasis (1988). *Ann Acad Med Singapore* 17: 482 – 5.

Therond P., Gerbaud P. & Dimon S. Antioxidant enzymes in psoriatic fibroblasts and erythrocytes (1996). *J Invest Dermatol* 106: 1325 – 1328.

Trouba KJ., Hamadeh HK., Amin RP. & Germolec DR. Oxidative stress and its role in skin disease (2002). *Antiox Redox Signal* 4: 665 – 673.

Turner CP., Toye AM. & Jones OTG. Keratinocyte superoxide generation (1998). *Free Radic Biol Med* 24: 401 – 407.

Veal CD., Capon F., Allen MH et al. Family-based analysis using a dense single-nucleotide polymorphism-based map defines genetic variation at PSORS1, major psoriasis-susceptibility locus (2002). *Am J Hum Genet* 71: 554 – 64.

Veal CD., Clough RL., Barber RC., Mason S., Tillman D., Ferry B et al. Identification of novel psoriasis susceptibility locus at 1p and evidence of epistasis between PSORS1 and candidate loci (2001). *J Med Genet* 38: 7 – 13.

Wild A.C. & Mulcahy R.T. Regulation of γ -glutamylcysteine synthetase subunit gene expression: Insights into transcriptional control of antioxidant defenses (2000). *Free Radic. Res.* 32, 281–301.

Wu G., Fang Y.-Z., Yang S., Lupton J.R. & Turner N.D. Glutathione metabolism and its implications for health (2004). *J. Nutr.* 134, 489–492. (1)

Wu Z., Minhas G.S., Wen D., Jiang H., Chen K., Zimniak P. & Zheng J. Design, synthesis and structure activity relationships of haloenol lactones: site-directed and isoenzyme-selective glutathione S-transferase inhibitors (2004). *J Med Chem* 47: 3282-3294. (2)

Yang H., Wang J., Huang Z.-Z., Ou X. & Lu S.C. Cloning and characterization of the 50-flanking region of the rat glutamate cysteine ligase catalytic subunit. *Biochem* (2001a). *J.* 357, 447–455.

Yang H., Wang J., Ou X., Huang Z.-Z. & Lu S.C. Cloning and analysis of the rat glutamate cysteine ligase modifier subunit promoter (2001b). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 285, 476–482.

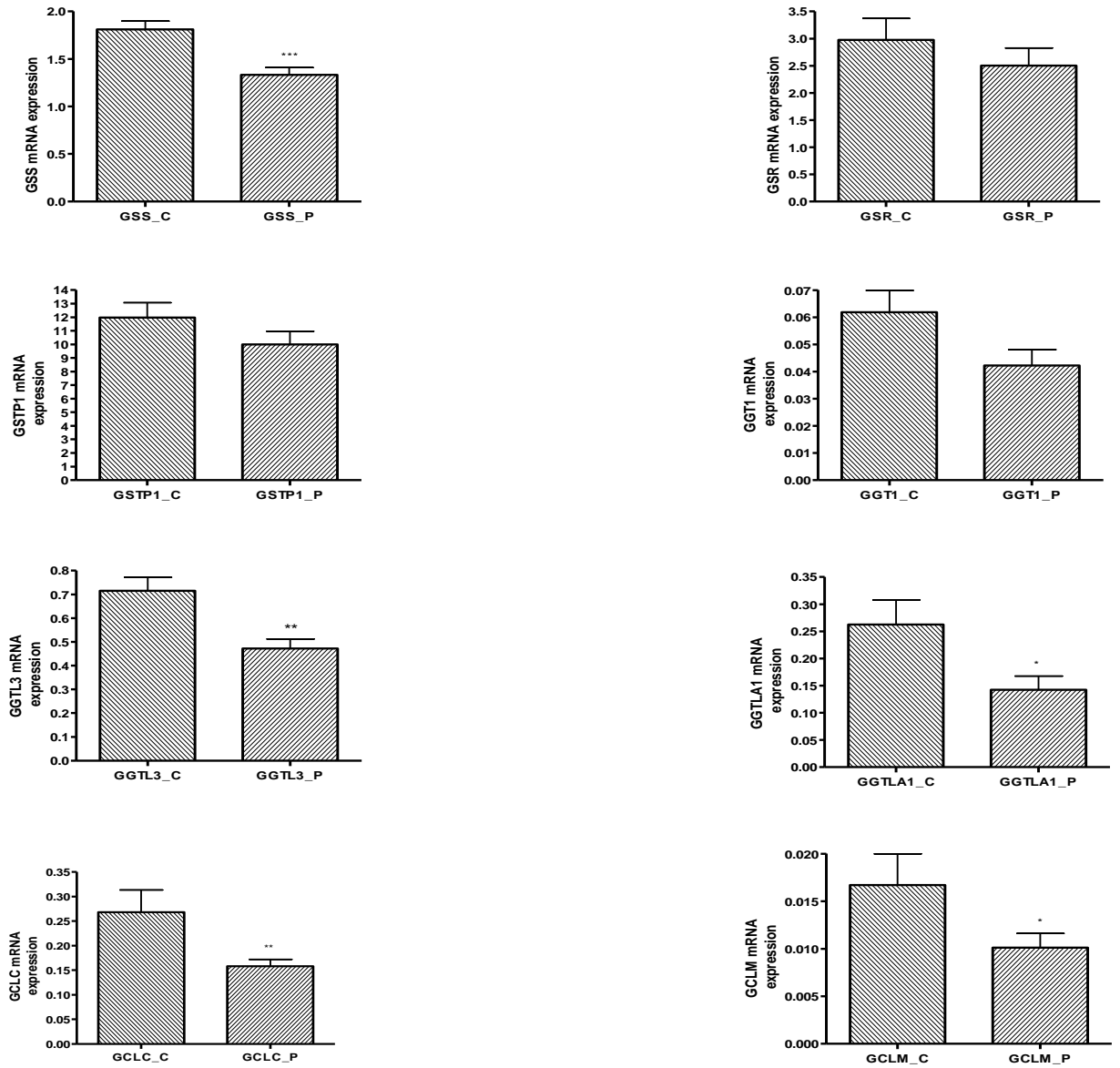
Yildirim M., Inaloz HS., Baysal V. & Delibass N. The role of oxidants and antioxidants in psoriasis (2003). *JEADV* 17: 34 – 36.

<http://www.derma.ee/articles.php?id=115>

10. LISAD

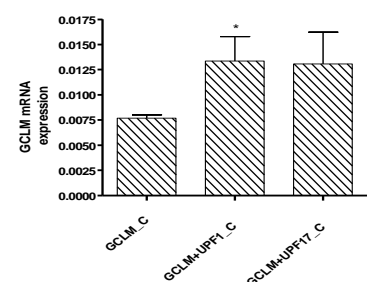
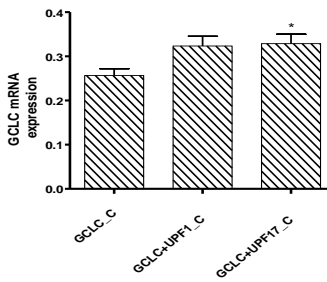
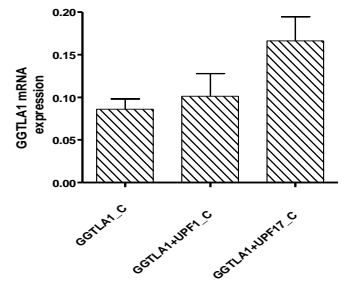
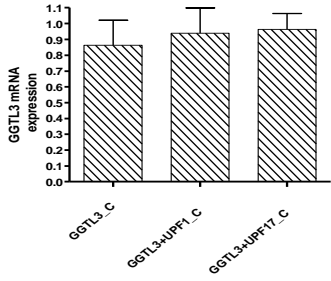
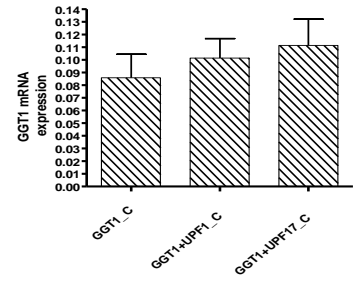
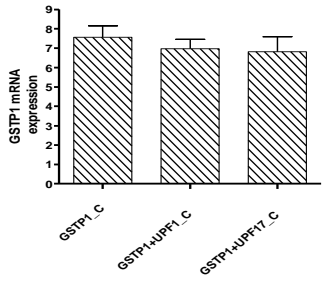
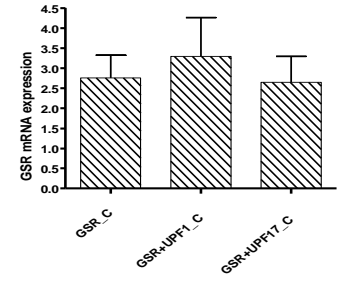
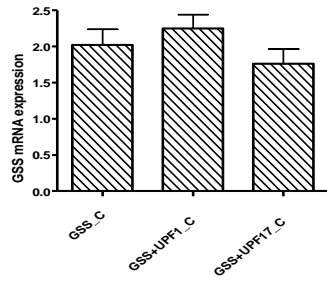
Lisa 1. Uuritavate geenide ekspressioonid psoriaasihaigetel (P) ja tervetel kontrollindiviididel (C). Andmed on antud keskmise ΔCt väärtusena võrrelduna HPRT \pm SEM ekspressiooniga.

* < 0,05; ** < 0,01; *** < 0,001



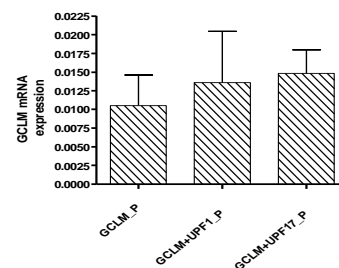
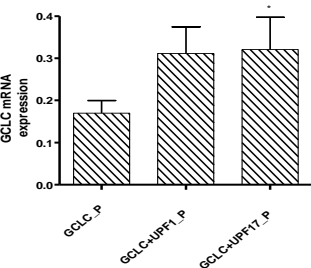
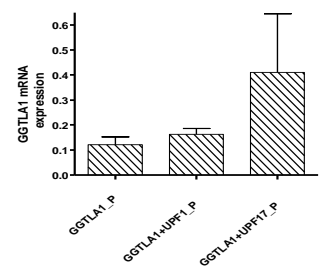
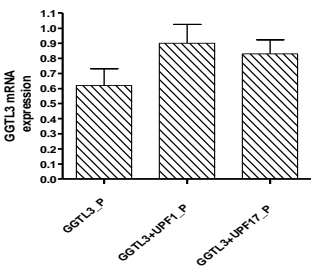
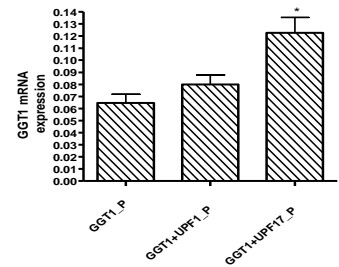
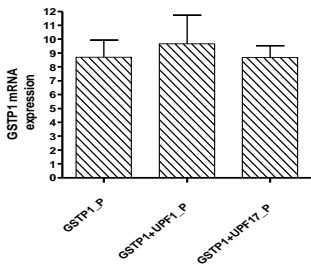
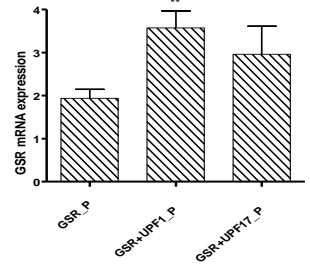
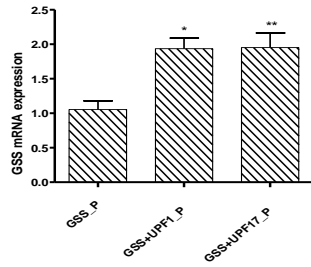
Lisa 2. UPF1 ja UPF17 efektid uuritavate geenide ekspressioonile. Terved kontrollindiviidid (C). Andmed on antud keskmise ΔCt väärtusena võrrelduna HPRT \pm SEM ekspressiooniga.

* $< 0,05$



Lisa 3. UPF1 ja UPF17 efektid uuritavate geenide ekspressioonile. Psoriaasihaiged (P). Andmed on antud keskmise ΔCt väärtusena võrrelduna HPRT \pm SEM ekspressiooniga.

* < 0,05



Lisa 4. Spearman'i korrelatsioonanalüüs kontrollindiviidide (C) ja psoriaasihaigete (P) glutatioonisüsteemi ensüümide ekspresioonitasemete vahel.

	<i>GSS</i> C/P	<i>GSR</i> C/P	<i>GSTP1</i> C/P	<i>GGTL3</i> C/P	<i>GGT1</i> C/P	<i>GCLC</i> C/P	<i>GGTLA1</i> C/P	<i>GCLM</i> C/P
<i>GSS</i> C/P	1 / 1	0.11 / 0.49*	-0.20 / 0.26	0.44 / -0.59**	0.15 / -0.19	0.26 / 0.01	-0.14 / 0.48*	0.08 / 0.38
<i>GSR</i> C/P	0.11 / 0.49*	1 / 1	0.11 / 0.22	-0.01 / -0.09	0.08 / 0.15	0.27 / 0.10	0.25 / 0.19	-0.01 / 0.39
<i>GSTP1</i> C/P	-0.20 / 0.26	0.11 / 0.22	1 / 1	-0.34 / 0.03	-0.60** / -0.08	-0.03 / -0.12	0.66** / 0.24	0.58** / 0.41
<i>GGTL3</i> C/P	0.44 / -0.59**	-0.01 / -0.09	-0.34 / 0.03	1 / 1	0.51* / 0.54*	0.14 / 0.22	-0.29 / -0.32	-0.18 / 0.004
<i>GGT1</i> C/P	0.15 / -0.19	0.08 / 0.15	-0.60** / -0.08	0.51* / 0.54*	1 / 1	0.12 / 0.19	-0.48* / -0.12	-0.16 / 0.04
<i>GCLC</i> C/P	0.26 / 0.01	0.27 / 0.10	-0.03 / -0.12	0.14 / 0.22	0.12 / 0.19	1 / 1	-0.04 / -0.26	-0.12 / 0.08
<i>GGTLA1</i> C/P	-0.14 / 0.48*	0.25 / 0.19	0.66** / 0.24	-0.29 / -0.32*	-0.48* / -0.12	-0.04 / -0.26	1 / 1	0.51* / 0.44
<i>GCLM</i> C/P	0.08 / 0.38	-0.01 / 0.39	0.58** / 0.41	-0.18 / 0.004	-0.16 / 0.04	-0.12 / 0.08	0.51* / 0.44	1 / 1