

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

Merit Müür

**MiR-146a reguleerib epidermise-spetsiifilise  
miR-203 taset keratinotsüütides**

Bakalaureusetöö, 12 EAP

Geenitehnoloogia

Juhendajad MSc Helen Hermann

PhD Ana Rebane

PhD Martin Pook

TARTU 2017

## **MiR-146a reguleerib epidermise-spetsiifilise miR-203 taset keratinotsüütides**

Atoopiline dermatiit on krooniline põletikuline nahahaigus, mida iseloomustavad punased laigud nahal ja sügelus. Mikro-RNA-d on lühikesed (21-25 nukleotiidi pikad) üheaahelised RNA molekulid, mis suruvad kodeerivate mRNA-dega paardudes nende translatsiooni alla või lagundavad need. Juhusliku leiu alusel nähti, et miR-146a ning miR-203 ekspressioonitasemete vahel võib olla seos ning töö üldiseks eesmärgiks oligi uurida, kas miR-146a reguleerib miR-203 avaldumise taset naha keratinotsüütides. Tulemustest võib järeldada, et miR-146a ekspressiooni tõus toob kaasa ka miR-203 taseme tõusu tõenäoliselt mõjutades kõrvuti mitmete teiste geenide ekspressiooniga valgu TP53 taset.

**Märksõnad:** atoopiline dermatiit, mikro-RNA, miR-146a, miR-203

**CERCS:** B210 histoloogia, tsütokeemia, histokeemia, koekultuurid

B630 dermatoloogia, veneroloogia

## **MiR-146a Regulates Epidermis-Specific MiR-203 Level in Keratinocytes**

Atopic dermatitis is a chronic inflammatory skin disease which is characterized by lesions and pruritus. MicroRNAs are short (21-25 nucleotides long) single-stranded RNA molecules, which bind to mRNAs via base pair complementarity and repress the translation or cause mRNA degradation. Because of a fortuitous finding, we hypothesized that there could be a connection between the expression level of miR-146a and miR-203 and the main goal of the thesis was to investigate whether miR-146a is capable of regulating miR-203 level. Our results indicate that miR-146a has the capacity to control the level of miR-203, most probably through regulating TP53 among other genes.

**Keywords:** atopic dermatitis, microRNA, miR-146a, miR-203

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

B630 dermatology, venerology

# SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID .....	4
SISSEJUHATUS .....	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1 Nahk .....	7
1.2 Atoopiline dermatiit.....	8
1.2.1 Hiire atoopilise dermatiidi mudel .....	9
1.3 Mikro-RNA-d .....	10
1.3.1 Mikro-RNA-de biogenees .....	11
1.3.2 Mikro-RNA-de funktsioon .....	12
1.3.3 Mikro-RNA-d nahas .....	13
2. EKSPERIMENTAALOSA .....	17
2.1 Töö eesmärgid .....	17
2.2 Materjal ja meetodika.....	17
2.2.1 <i>In situ</i> hübridisatsioon .....	17
2.2.2 Hiire atoopilise dermatiidi mudel kasutades MC903 .....	17
2.2.3 Inimese ja hiire primaarsete keratinotsüütide kasvatamine ja paljundamine .....	18
2.2.4 Rakkude stimuleerimine tsütokiinidega .....	19
2.2.5 Transfekterimine mikro-RNA miimidega .....	19
2.2.6 RNA eraldamine inimese primaarsetest keratinotsüütidest.....	19
2.2.7 RT-qPCR mRNA tasemete uurimiseks .....	20
2.2.8 RT-qPCR miRNA tasemete uurimiseks .....	21
2.2.9 Statistiline analüüs.....	22
2.3 Tulemused .....	23
2.3.1 MiR-203 ekspressioon metsiktüüpi ja <i>miR-146a<sup>-/-</sup></i> hiire nahas .....	23
2.3.2 MiR-203 ekspressioon hiire primaarsetes keratinotsüütides .....	25
2.3.3 MiR-203 ekspressioon inimese primaarsetes keratinotsüütides.....	26
2.4 Arutelu.....	28
KOKKUVÕTE .....	30
TÄNUSÕNAD .....	32
KASUTATUD KIRJANDUS .....	33
Kirjanduse loetelu.....	33
Kasutatud veebiaadressid .....	40
LIHTLITSENTS.....	41

## KASUTATUD LÜHENDID

AD – atoopiline dermatiit (*atopic dermatitis*)

AGO – valk Argonaut (*Argonaute*)

AP – aluseline fosfataas (*alkaline phosphatase*)

CARD10 – *caspase recruitment domain-containing protein 10*

CCL5 – *C-C motif chemokine 5*

CD4 – glükoproteiin immuunrakkudel (*cluster of differentiation 4*)

cDNA – komplementaarne DNA (*complementary DNA*)

c-Jun – proto-onkogeen Jun (*proto-oncogene c-Jun*)

c-Myc – proto-onkogeen Myc (*Myc proto-oncogene protein*)

Ct – lävitsükkel (*threshold cycle*)

DGCR8 – *DiGeorge syndrome chromosomal region 8*

DIG – digoksigeniin (*digoxigenin*)

dNTP – deoksünukleotiidtrifosfaat (*deoxynucleotide triphosphate*)

EDTA – etüleendiamiintetraatsetaat (*ethylenediaminetetraacetic acid*)

EF1A – elongatsioonifaktor 1-alfa (*elongation factor 1-alpha*)

EGFR – epidermaalse kasvufaktori retseptor (*epidermal growth factor receptor*)

FERMT1 – *fermitin family homolog 1*

GW182 – *the glycine-tryptophan protein of 182 kDa*

hsa – inimene, *Homo sapiens*

IgE – immunoglobuliin E (*immunoglobulin E*)

IL – interleukiin (*interleukin*)

IRAK1 – *interleukin-1 receptor-associated kinase 1*

ISH – *in situ* hübridisatsioon (*in situ hybridization*)

miR, miRNA – mikro-RNA (*microRNA*)

MC903 – kaltsipotriool (*calcipotriol*)

mRNA – informatsiooni-RNA (*messenger-RNA*)

NF- $\kappa$ B – tuumafaktor  $\kappa$ B (*nuclear factor  $\kappa$ B*)

NHEK – normaalsed inimese epidermaalsed keratinotsüüdid (*normal human epidermal keratinocytes*)

PABP – polü(A)-seonduv valk (*poly(A)-binding protein*)

PBS – füsioloogiline lahus fosfaatpuhvrts (*phosphate-buffered saline*)

rcf – suhteline tsentrifugaaljõud (*relative centrifugal force*)

RISC – RNA-indutseeritud vaigistamise kompleks (*RNA-induced silencing complex*)

RNAas – RNA-d lagundav ensüüm (*ribonuclease, RNase*)

RT-qPCR – pöördtranskriptsiooni kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon (*reverse transcription quantitative polymerase chain reaction*)

RXR/VDR – retinoid X retseptori ja vitamiin D retseptori heterodimeer (*retinoid X receptor and vitamin D receptor heterodimer*)

SEM – standardviga (*standard error of the mean*)

SFM – seerumi-vaba sööde (*serum-free medium*)

Skp2 – *S-phase kinase-associated protein 2*

SOCS3 – *suppressor of cytokine signaling 3*

STAT3 – *signal transducer and activator of transcription 3*

Th2 – tüüp 2 abi-T-rakud (*Type 2 helper T cells*)

TNF- $\alpha$  – tuumori nekroosi faktor  $\alpha$  (*tumor necrosis factor  $\alpha$* )

TP53 – *cellular tumor antigen p53*

TP63 – *tumor protein 63*

TRAF6 – *TNF receptor-associated factor 6*

TSLP – tüümuse stromaalne lümfoetiin (*thymic stromal lymphopoietin*)

UTR – mitte-transleeritav regioon (*untranslated region*)

WT – metsiktüüp (*wild type*)

## SISSEJUHATUS

Atoopilist dermatiiti (AD) on defineeritud kui krooniline ägenemiste ja vaibumistega kulgev põletikuline nahahaigus, millega kaasnevad sügelus ja punakad laigud nahal (Konishi *et al.*, 2002). Haiguse teket on seostatud geneetiliste, immunoloogiliste ning keskkonnateguritega (Lyons *et al.*, 2015). Atoopiline dermatiit esineb sagedamini väikelastel, kuid haigus võib tekkida ka hilisemas eas (Garmhausen *et al.*, 2013). AD-d esineb kuni 20% lastest ja kuni 3% täiskasvanutest (Weidinger *et al.*, 2013). Laia leviku tõttu on oluline uurida haiguse tekkepõhjuseid ning leida ravivõimalusi.

Mikro-RNA-d (miR) on lühikesed 21-25 nukleotiidi pikad endogeensed üheaahelalised RNA molekulid, mille funktsiooniks on mRNA-dega paardudes nende translatsiooni alla suruda või need lagundada (Li *et al.*, 2017). Mikro-RNA-de osalust on nähtud mitmete bioloogiliste protsesside juures, näiteks arengus, rakkude diferentseerumises ja proliferatsioonis (Jonas ja Izaurralde, 2015). Mikro-RNA-de regulatsiooni vigu seostatakse mitmete haigustega (Izaurralde, 2015).

Käesoleva bakalaureusetöö kirjanduse ülevaade annab üldpildi naha ehitusest, atoopilisest dermatiidist ja selle hiire mudelist. Samuti käsitletakse mikro-RNA-sid, sealhulgas nende biogeneesi ning funktsiooni, lähemalt vaadatakse miR-146a ja miR-203 olulisemaid funktsionaalseid omadusi. Eksperimentaalse osa eesmärgiks oli uurida, kas miR-146a mõjutab miR-203 avaldumise taset nahas ja keratinotsüütides. Selleks analüüsiti miR-203 ekspressiooni tasemeid nii metsiktüüpi kui *miR-146a<sup>-/-</sup>* hiirte nahas ning hiire ja inimese primaarsetes keratinotsüütides. Et modelleerida haiguslikku olukorda, kasutati tsütokiinidega stimuleerimist ja materjali, mis pärines hiirtelt, millele oli rakendatud atoopilise dermatiidi mudelit.

Bakalaureusetöö valmis Tartu Ülikooli molekulaar- ja rakubioloogia instituudi geenitehnoloogia õppekava raames. Eksperimentaalne osa viidi läbi Tartu Ülikooli bio- ja siirdemeditsiini instituudi biomeditsiini osakonna RNA bioloogia uurimisgrupis.

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

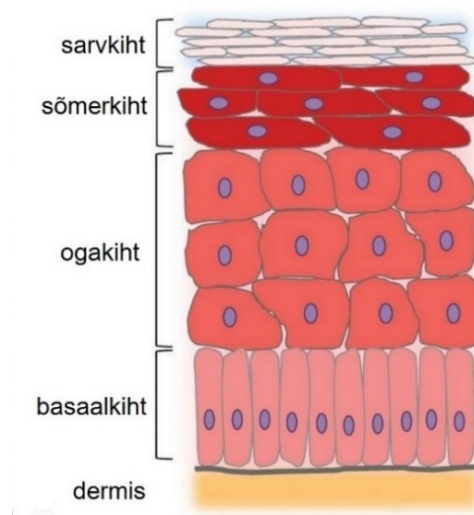
## 1.1 Nahk

Nahk on inimese suurim organ (Manevski *et al.*, 2014) olles ühenduslüliks inimese ja väliskeskkonna vahel ning seetõttu on sellel väga oluline kaitsefunktsioon. Nahk peab kaitsema erinevate välistegurite eest, näiteks patogeenide (Di Grazia *et al.*, 2015), mehaaniliste mõjutuste (Brandner *et al.*, 2010) ja veekaotuse eest (Kelleher *et al.*, 2015). Nahk koosneb kolmest kihist: epidermis (marrasknahk), dermis (pärisnahk) ning subkuutis (alusnahk) (Blacksin *et al.*, 2006).

Epidermis ehk marrasknahk (Joonis 1) on kõige pealne nahakiht, mille peamised rakutüübid on keratinotsüüdid, melanotsüüdid, Langerhansi rakud ja Merkel'i rakud (Watt, 1989). Epidermis jaotatakse omakorda neljaks kihiks (Ma *et al.*, 2015), mille põhilised rakud keratinotsüüdid jagunevad basaalkihis, arenevad ogakihi ja sõmerkihi ning lõplik diferentseerumine toimub sarvkihi (Kingo, 2010).

Sarvkiht ehk epidermise kõige pealne kiht koosneb tuumata sarvplaatidest (Ma *et al.*, 2015), kus puuduvad organellid (Celli *et al.*, 2011). Pealised rakud eralduvad pidevalt (Sugino *et al.*, 2014) ning need asendatakse altpoolt tulevate uute keratinotsüütidega (Martínez-Mora *et al.*, 2012). Sarvkiht koosneb kuni 20 rakukihist (Combadiere ja Liard, 2011). Sarvkihi all on sõmerkiht, mis koosneb mitmekihilistest lamerakkudest, mis on kolmes kuni neljas reas (Ma *et al.*, 2015). Sõmerkihi algab tuumade ja rakusiseste organellide taandareng (Gagna *et al.*, 2009) ning rakud lähevad ilma terava piirita üle ogakihi rakkudeks.

Ogakiht omakorda koosneb 3-8 reas olevast kuupepiteelist (Ma *et al.*, 2015), mille rakkudes on võimalik tuvastada esimesi diferentseerumismarkereid, näiteks keratiin-10 (Nöske *et al.*, 2016). Basaalkiht koosneb jagunemisvõimelistest rakkudest, mis omakorda on kinnitunud basaalmembraanile (Breitkreutz *et al.*, 2004). Selle kihi rakkude funktsioon on moodustada uusi keratinotsüüte, mis asendaksid sarvkihist eralduvaid rakke (Bermudez *et al.*, 2011). Basaalmembraan kinnitab epidermise pärisnaha külge (Behrens *et al.*, 2012).



**Joonis 1. Epidermise struktuur.** Epidermis koosneb erinevatest kihtidest, mille kõige pindmine kiht on sarvkiht, mille moodustavad lõplikult diferentseerunud keratinotsüüdid. Sarvkihi all oleval sõmerkihi keratinotsüütidel on veel tuumad olemas. Sõmerkihi all on ogakiht, mis moodustub kuupepiteelist ning ogakihti liiguvad rakud jagunemisvõimelisest basaalkihist. Basaalkihi rakud kinnituvad basaalmembraanile, mis eraldab epidermist dermisest. Modifitseeritud ja tõlgitud Blaydon ja Kellsell, 2014 järgi.

Basaalmembraani all asub dermis ehk pärisnahk, mis koosneb sidekoest, sisaldades fibroblaste, makrofaage, nuumrakke, T-lümfotsüüte ja Langerhansi rakke (Gonzalez-Ramos *et al.*, 1996). Peale rakkude asuvad seal veel veresooneid (Stücker *et al.*, 2002), karvanääpsud (Higgins *et al.*, 2013), närvid (Sevrain *et al.*, 2013), lümfisooneid (Kriehuber *et al.*, 2001) ning higinäärmed (Alexander *et al.*, 2011). Pärisnaha all asub alusnahk, mis on dermise ja nahaaluste organite vahelülis. Alusnahk koosneb põhiliselt kohevast sidekoest ja rasvarakkudest (Kingo, 2010).

Nahk on väga oluline barjäär, mis kaitseb organismi välismõjude eest ning seetõttu on hädavajalik, et iga naha funktsioon toimiks piisava efektiivsusega. Kui barjäär on vigane, võib see kaasa tuua nakatumise patogeenidega ning kogu organismi olukorra halvenemise.

## 1.2 Atoopiline dermatiit

Atoopiline dermatiit ehk nahapõletik on krooniline ägenemiste ja vaibumistega kulgev põletikuline nahahaigus, mida iseloomustavad punakad nahalaigud ja sügelus (Konishi *et al.*, 2002). Haiguse tekkes mängivad olulist rolli nii geneetilised, immunoloogilised kui ka keskkonnategurid (Lyons *et al.*, 2015). Sageli eristatakse AD-1 kahte vormi: allergiline ja mitteallergiline vorm. Allergilist vormi põeb 55-85% atoopilise dermatiidi haigetest ning selle



puhul on IgE antikehade tase tõusnud. Mitteallergilise atoopilise dermatiidi all kannatab 15-45% haigetest ning selle puhul on IgE antikehade tase kehas normaalne (Schmid *et al.*, 2001). Immunoloogiliste teguritena on AD patsientidel nähtud normaalsest erinevat T-lümfotsüütide tasakaalu ja erinevate valkude, näiteks tsütokiinide, IgE ja antimikroobsete peptiidide sünteesi häireid (Rozalski *et al.*, 2016).

Geneetilistest faktoritest tingituna on haigete nahabarjäär ebatäiuslik ning see lubab siseneda suurtel valgulistel antigeenidel (Czarnowicki *et al.*, 2014) põhjustades allergilise vormi tekkimise (Smith *et al.*, 2006). Allergeeni sisenemisel püüavad dendriitrakud selle molekulid kinni ning esitlevad T-rakkudele, mis selle tagajärjel aktiveeruvad ning hakkavad tootma Th2 tüüpi tsütokiine (nt interleukiin (IL)-4, IL-5, IL-13) (Shreffler *et al.*, 2006). IL-4 ja IL-13 soodustavad IgE ümberlülitumist (Holgate, 2012) ning on olulised just allergilise AD puhul, IL-5 vastutab eosinofiilide elumuse eest (Fulkerson *et al.*, 2014). Tsütokiinid omakorda aktiveerivad B-rakke, mis arenevad plasmarakkudeks ning hakkavad tootma IgE antikehi (Milovanovic *et al.*, 2010). Antikehad seonduvad nuumrakkudele, mis seejärel vabastavad näiteks histamiini, mis muudab veresooned laiemaks ning nende seinad lihtsamini läbitavamaks (Coleman, 2002). Väljatoodud mehhanismi tõttu liigub haiguskoldesse veel rohkem immuunrakke ning reaktsioon muutub järjest tugevamaks. Mitteallergilise vormi tekkepõhjused on veel välja selgitamata, kuid IgE normaalse taseme tõttu eeldatakse, et haigus saab alguse Th2 tüüpi immuunvastusest ja põletikust (Novak ja Bieber, 2003).

Atoopiline dermatiit on rohkem levinud imikutel ja väikelastel, kuid haigusnähud võivad tekkida ka vanemas eas (Garmhausen *et al.*, 2013). Arvatakse, et AD esinemissagedus lastel on kuni 20% ja täiskasvanutel kuni 3% (Weidinger *et al.*, 2013). Suure levimuse tõttu on atoopilise dermatiidi vastaste ravimite väljatöötamine majanduslikult oluline. Selleks on aga vaja haiguse patoloogilised mehhanismid välja selgitada, millele aitab kaasa katseloomade mudelite kasutamine teadustöös.

### **1.2.1 Hiire atoopilise dermatiidi mudel**

Erinevate haiguste modelleerimiseks kasutatakse katseloomadena enamasti hiiri. Üks atoopilise dermatiidi mudelitest põhineb vitamiin D3 analoogi MC903 (kaltsipotriool) kasutamisel hiirel ning selle arendas välja Li *et al.* 2006. aastal.

Mainitud atoopilise dermatiidi mudeli puhul indutseeritakse tüümuse stromaalse lümfoetiini (*thymic stromal lymphopoietin*, TSLP) üleekspressioon keratinotsüütides, mis toimub läbi retinoid X retseptori ja vitamiin D retseptori heterodimeeride (RXR/VDR) (Li *et al.*, 2006). Arvatakse, et kui vitamiin D või MC903 pole retseptorile seondunud, siis on kompleks seotud korepressoriga. Kui aga rakus on vitamiin D või MC903, siis seondub kompleksile koaktivaator ning initsieeritakse TSLP transkriptsioon (Li *et al.*, 2006).

TSLP on oluline tsütokiin atoopilise dermatiidi sümptomite tekkes (Li *et al.*, 2005). TSLP üleekspressioon soodustab AD teket kaudselt, sundides dendriittrakte tootma kemokiine, mis on atraktandiks Th2 tüüpi rakkudele, suurendades sellega nende hulka haiguskindes (Reche *et al.*, 2001), ning lisaks aktiveerivad kemokiinid kohalolevaid naiivseid CD4<sup>+</sup> T-rakke prolifereruma ja diferentseeruma Th2 suunas (Soumelis *et al.*, 2002). Tulemuseks on atoopilist dermatiiti iseloomustav Th2 tüüpi põletik (Esaki *et al.*, 2015).

MC903 kasutades tekivad hiirte kõrvadel atoopilise dermatiidi tunnused – kõrvad muutuvad punaseks, lähevad paiste, kestendavad (Choi *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2016) ja sügelevad (Li *et al.*, 2006). Antud mudeli puhul esineb muutusi ka rakulises koosluses. Hiirtel on tuvastatav epidermise paksenemine ning suure hulga immuunrakkude (eriti eosinofiilide ja nuumrakkude) liikumine nahka (Rebane *et al.*, 2014). Mudel põhjustab ka süsteemseid muutusi, mis on sarnased atoopilisele dermatiidile, näiteks tõuseb MC903 mõjul hiirte seerumi IgE tase (Li *et al.*, 2008) ja Th2 tüüpi tsütokiinide tase (Li *et al.*, 2006). Seega võib öelda, et MC903 lokaalne määrimine tekitab hiirtele inimeste atoopilise dermatiidile sarnase fenotüübi ning seda saab kasutada atoopilise dermatiidi hiire mudelina (Li *et al.*, 2006).

### **1.3 Mikro-RNA-d**

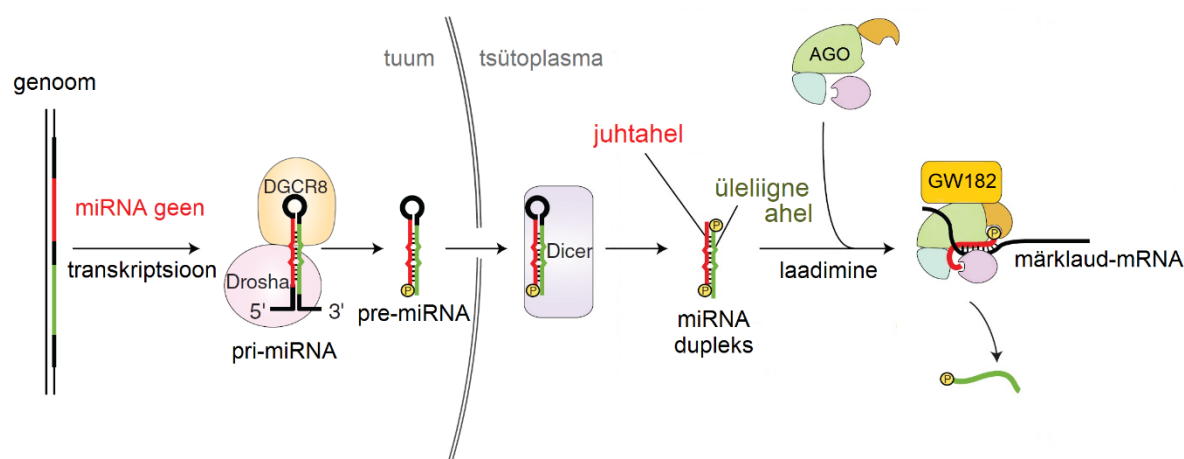
Mikro-RNA-d (miR) on lühikesed 21-25 nukleotiidi pikad endogeensed üheaheelised RNA molekulid, mis inhibeerivad kodeerivate mRNA-dega paardudes nende translatsiooni alla või initsieerivad märklaud-mRNA lagundamise (Izaurralde, 2015). Mikro-RNA-d reguleerivad mitmeid olulisi bioloogilisi protsesse nagu organismi arengut (Olsen ja Ambros, 1999), rakkude diferentseerumist (Chen *et al.*, 2004), proliferatsiooni (Felli *et al.*, 2005), migratsiooni (Xiao *et al.*, 2014) ja apoptoosi (Gong *et al.*, 2012). Mikro-RNA-de regulatsiooni vigu seostatakse mitmete haiguste ja tervisehäiretega (Izaurralde, 2015).

Mikro-RNA-d on evolutsiooniliselt konserveerunud (Jonas ja Izaurralde, 2015) ning nad võivad ühes rakutüübis mõjutada ühte kuni mitutsadat mRNA-märklauda (Baek *et al.*, 2008).

Inimese genoomis on identifitseeritud üle 2500 mikro-RNA<sup>1</sup> ning arvestades, et mikro-RNA-d reguleerivad üle 60% inimese valke kodeerivatest geenidest, on neil oluline roll organismi toimimisel (Friedman *et al.*, 2009).

### 1.3.1 Mikro-RNA-de biogenees

Mikro-RNA-d on endogeensed ehk organism toodab neid ise. Pooled inimese mikro-RNA-de geenidest asuvad teiste geenide sees, millest enamik paikneb intronites, ning ülejäänud on geenide vahel (Paczynska *et al.*, 2015). Mikro-RNA-de valmimine on mitme-etapiline protsess, mis algab tuumas, kui RNA polümeraas II viib läbi mikro-RNA geeni transkriptsiooni (Joonis 2) (Meister *et al.*, 2004). Tulemuseks on pikk pri-miRNA, mida edasi töötleb Drosha-DGCR8 (*DiGeorge syndrome chromosomal region 8*) kompleks, mis on vastavalt ribonukleas (RNAas) ning RNA-ga seonduv valk (Han *et al.*, 2004). Töötlustest jääb alles lühem, umbes 70 nukleotiidi pikkune juuksenõelastruktuuriga pre-miRNA (Lee *et al.*, 2003).



**Joonis 2. Mikro-RNA-de biogenees.** Tuumas transkribeeritakse mikro-RNA-de geenide pealt pri-miRNA-d, mis Drosha poolt lõigatakse lühemateks pre-miRNA-deks. Seejärel viiakse need tsütoplasmasse, kus neid lõikab Dicer. Alles jääb mikro-RNA dupleks, mille juhtahel jääb RISC kompleksi, kuid üleliigne ahel heidetakse kõrvale. Küps RISC kompleks on nüüd võimeline seonduma märklaud-mRNA-ga Muudetud ja tõlgitud Nakanishi, 2016 põhjal.

Järgnevalt viib tuumamembraani valk Eksportiin-5 pre-miRNA tuumast välja (Yi *et al.*, 2003). Tsütoplasmas lõikab pre-miRNA-t Dicer-ensüüm, mis on ribonukleas-helikaas multidomeenne ensüüm (Han *et al.*, 2004). Dicer eemaldab juuksenõelastruktuurilt otsmise

<sup>1</sup> miRBase andmebaas, külastatud 24.05.17, <http://www.mirbase.org/cgi-bin/browse.pl?org=hsa>

lingu (Bernstein *et al.*, 2001) ning alles jääb lühike, umbes 22 nukleotiidi pikkune RNA dupleks, mis koosneb miRNA-5p ja miRNA-3p ahelast ning mille mõlemas otsas on 5' fosfaat ning 2 nukleotiidi pikkune 3' üleulatuv ots (Ando *et al.*, 2011).

Edasi laetakse dupleksid Argonaut (Argonaute, AGO) valgule, mis koosneb 4 domeenist – MID, PAZ, N ja PIWI (Schirle ja MacRae, 2012). MiRNA dupleksite laadimine toimub kahe protsessina – (1) duplexi seondumine, mis vajab tšaperone ja ATP-d (Iwasaki *et al.*, 2010) ja (2) aktivatsioon ehk üleliigse ahela väljaviskamine (Gu *et al.*, 2011). Esimesena seondub AGO valgu MID domeenile miRNA duplexi juhtahela 5' otsa monofosfaat (Kawamata *et al.*, 2011). Selles etapis toimub ka juhtahela valik, milleks enamasti jääb see miRNA ahel, mille 5' ots on termodünaamiliselt ebastabiilsem (Schwarz *et al.*, 2003).

Järgmiseks sammuks on terve RNA duplexi laadimine AGO valgu nukleiinhappe-sidumise taskusse, millele aitab kaasa tšaperonide meeskond (Iwasaki *et al.*, 2010). Seejärel keerdub üleliigne ahel N domeeni vahendusel juhtahelast lahti ja see eemaldatakse kompleksist (Kwak ja Tomari, 2012).

Lisaks AGO valgule ja mikro-RNA-le on RISC kompleksi üheks oluliseks valguks GW182 (*the glycine-tryptophan protein of 182 kDa*) (Eulalio *et al.*, 2008), mis vahendab interaktsioone AGO, deadenülaasi komplekside ja polü(A)-seonduvate valkude (*poly(A)-binding protein*, PABP) vahel (Fabian ja Sonenberg, 2012). Tulemuseks on RNA-indutseeritud vaigistamise kompleks (*RNA-induced silencing complex*, RISC), mille kaudu miRNA-d oma funktsiooni täide viivad (Gu *et al.*, 2011).

### **1.3.2 Mikro-RNA-de funktsioon**

Moodustunud RISC kompleksi peamiseks funktsiooniks on reguleerida geeniekspressiooni transkriptsioonijärgselt. Enamasti lagundatakse mRNA-d tänu deadenüleerimisele, kuid vahel võib RISC ka mRNA translatsiooni alla suruda (Jonas ja Izaurralde, 2015). RISC-i funktsiooni täideviimine algab miRNA komplementaarsuse alusel seondumisega märklaud-mRNA 3' mitte-transleeritavale regioonile (*untranslated region*, UTR) (Janas *et al.*, 2012). Enamasti paikneb miRNA märklauda järjestustele komplementaarne osa miRNA 5' otsas, mida nimetatakse seemneregiooniks (*seed-region*). Seemneregiooniks loetakse miRNA 5' otsa 2. kuni 8. nukleotiidi (Hu *et al.*, 2009).

Üldine lihtsustatud seisukoht on, et väga täpse või täiusliku seondumise tagajärjel mRNA-d lõigatakse, samas kui osaline paardumine toob kaasa mRNA lagundamise (Huntzinger ja Izaurralde, 2011). Tüüpiliselt pole komplementaarsus miRNA ja märklaua vahel lõikamiseks piisav (Connerty *et al.*, 2015) ning seetõttu mRNA lõikamise asemel vaigistatakse, mis tähendab kombinatsiooni translatsiooni mahasurumisest, deadenüleerimisest, *cap*-struktuuri eemaldamisest ning 5'-3' mRNA lagundamisest (Huntzinger ja Izaurralde, 2011). Lisaks AGO-le võtavad sellest osa veel mitmed teised valgud ja kompleksid. Eespool mainitud GW182 valk vahendab interaktsioone deadenülaasi komplekside vahel (Fabian ja Sonenberg, 2012) ning neile omakorda seondub 7-metüülguanosiinmütsi eemaldamise kompleks (*decapping complex*). See eemaldab *cap*-struktuuri mRNA 5' otsast, mis on seejärel avatud 5'-3' eksonukleaasidele. Väljatoodud mehhanism on peamine viis, kuidas miRNA-d täidavad oma funktsiooni (Izaurralde, 2015).

Lisaks mainitud mehhanismidele võivad miRNA-d RISC-ga koostöös mRNA translatsiooni inhibeerida ilma mRNA-d lagundamata, kuid seda on täheldatud harvadel juhtudel (Guo *et al.*, 2010). Kokkuvõttes vajavad mikro-RNA-d funktsioneerimiseks arvukalt teisi valke ning koos reguleerivad nad erinevates kudedes mitmete geenide avaldumist.

### 1.3.3 Mikro-RNA-d nahas

Mikro-RNA-del on nahas leitud erinevaid ülesandeid ning paljude miRNA-de puhul on nende olulisus nahas näidatud (Šahmatova *et al.*, 2016). Välja võib tuua, et mikro-RNA-d reguleerivad naha arengut (Zhang *et al.*, 2011) ja keratinotsüütide jagunemise-diferentseerumise suhet (Lohcharoenkal *et al.*, 2016). Mikro-RNA-de olulisust näitab ka see, et erinevate nahahaiguste puhul on märgatud mikro-RNA-de tasemete muutusi. Näiteks nii psoriaasi kui atoopilise dermatiidi puhul on miR-146a ülesreguleeritud, aga miR-133b allareguleeritud (Sonkoly *et al.*, 2007). Kuna käesolevas töös uuriti miR-203 ja miR-146a, siis nende kahe miRNA funktsioonist nahas ja mujal organismis antakse põhjalikum ülevaade järgmises kahes alapeatükis.

#### 1.3.3.1 MiR-146a

Mikro-RNA-146a (miR-146a) on 22 nukleotiidi pikkune joonisel 3 toodud järjestusega mikro-RNA. Selle geen asub 5. kromosoomis<sup>2</sup>. Põhifunktsiooniks on miR-146a-l immuunsüsteemi aktivatsiooni vähendamine läbi oma märklaud-geenide translatsiooni

---

<sup>2</sup> miRBase andmebaas, külastatud 24.05.17, [http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna\\_summary.pl?org=hsa](http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_summary.pl?org=hsa)

allasurumise. MiR-146a on põletikku soodustava transkriptsioonifaktor NF-κB (*nuclear factor κB*) negatiivseks regulaatoriks. Kui NF-κB aktiveerub, näiteks Tolli-sarnaste retseptorite (Taganov *et al.*, 2006) või tsütokiinidega stimuleerimise kaudu, siis aktiveeritakse mitmed põletikku soodustavad geenid (Rebane *et al.*, 2014). Samuti on ka miR-146a ekspressioon aktiveeritud NF-κB signaaliraja kaudu ning seetõttu põhjustab miR-146a ekspressiooni tõus negatiivse tagasiside sellele signaalirajale. MiR-146a ekspressiooni muutusi on leitud mitmetes haigustes, näiteks autoimmuunhaigustes nagu luupus (Tang *et al.*, 2009) ja reumatoidartriit (Bogunia-Kubik *et al.*, 2016) ning müelodüsplastilise sündroomi (Starczynowski *et al.*, 2010) ja erinevate vähi vormide puhul (Jazdzewski *et al.*, 2008).

**hsa-miR-146a-5p 5' UGAGAACUGAAUUCCAUGGGUU 3'**

**Joonis 3. MiR-146a-5p järjestus<sup>3</sup>.** Inimese miR-146a-5p järjestus miRBase andmebaasist. Seemneraioonile viitab punane joon.

Nahas on miR-146a-l mitu olulist rolli. Peamised miR-146a ülesanded on seotud immuunvastusega, mida miR-146a on võimeline inhibeerima erinevatel viisidel. Näiteks pärsib see TNF-α (*tumor necrosis factor α*) signaalirada, mis on oluline nii psoriaasi kui atoopilise dermatiidi patoloogias (Sonkoly *et al.*, 2008). MiR-146a märklaudadeks on selle raja liikmed TRAF6 (*TNF receptor-associated factor 6*) ja IRAK1 (*interleukin-1 receptor-associated kinase 1*), mis on samuti seotud NF-κB aktiveerimisega (Meisgen *et al.*, 2014). MiR-146a reguleerib ka väljaspool TNF-α signaalirada funktsioneerivaid valke, nt CARD10 (*caspase recruitment domain-containing protein 10*), mis soodustab NF-κB aktiveerimist (Rebane *et al.*, 2014). MiR-146a poolt põhjustatud negatiivse regulatsiooni tagajärjel väheneb immuunvastuse tugevus (Meisgen *et al.*, 2014).

Teiseks inhibeerib miR-146a kemokiinide tootmist, surudes sellega maha keratinotsüütide võime kutsuda kohale leukotsüüte. Näiteks inhibeerides CCL5 (*C-C motif chemokine 5*) ja IL-8 vabastamist rakust, millest esimene kutsub kohale pigem eosinofiile, makrofaage, T-rakke (Rebane *et al.*, 2014) ning teine neutrofiile (Zhu *et al.*, 2013). Lisaks ei lase miR-146a ka keratinotsüütidel immuunrakke aktiveerida, sest inhibeerib tsütokiinide tootmist, nt IL-6 (Urgard *et al.*, 2016). Seega on miR-146a üheks funktsiooniks immuunsüsteemi negatiivne reguleerimine – mikro-RNA tootmine aktiveeritakse, kui rakku stimuleerivad näiteks põletikku soodustavad tsütokiinid, ning vastuseks surub miR-146a maha põletikku

<sup>3</sup> miRBase andmebaas, külastatud 24.05.17, [http://www.mirbase.org/cgi-bin/get\\_seq.pl?acc=MIMAT0000449](http://www.mirbase.org/cgi-bin/get_seq.pl?acc=MIMAT0000449)

soodustavaid genee ning tsütokiinide tootmist. Antud mikro-RNA ülesanne on tõenäoliselt vältida liigse põletikuga tekkivaid koekahjustusi (Sonkoly ja Pivarcsi, 2011).

Peale immuunvastuse mõjutamise pärsib miR-146a ka proliferatsiooni. MiR-146a märklaudadeks on nii EGFR (*epidermal growth factor receptor*), mis on psoriaasi korral keratinotsüütide vohamise üheks põhjustajaks (Zhang *et al.*, 2014), kui ka valk FERMT1 (*fermitin family homolog 1*), mis on keratinotsüütide proliferatsiooni soodustaja (Larjava *et al.*, 2008; Hermann, 2015). Sellega aitab miR-146a kaasa psoriaasi leevenemisele, sest pidurdab rakkude jagunemist ja immuunsüsteemi. Seega on miR-146a nahas mitu olulist rolli, sealhulgas immuunvastuse ja proliferatsiooni vähendamine.

### 1.3.3.2 MiR-203

Mikro-RNA-203 (miR-203) on 22 nukleotiidi pikkune joonisel 4 välja toodud järjestusega mikro-RNA, mille geen asub 14. kromosoomil<sup>4</sup>. MiR-203 on epidermise-spetsiifiline ning selle ekspressiooni keratinotsüütides tõstavad diferentseerumist soodustavad ained (nt kaltsium) (Sonkoly *et al.*, 2010). Peamiseks funktsiooniks on antud mikro-RNA-l epiteeli diferentseerumise soodustamine ja rakkude jagunemise pärssimine (Yi *et al.*, 2008). Sellest tulenevalt esineb miR-203 nahas gradiendina – basaalkihis madalal tasemel, kuid rohkem diferentseerunud kihtides suuremal hulgal (Sonkoly *et al.*, 2007).

hsa-miR-203a-3p 5' GUGAAAUGUUUAGGACCACUAG 3'

**Joonis 4. MiR-203 järjestus<sup>5</sup>.** Inimese miR-203-3p järjestus miRBase andmebaasist. Seemneregioonile viitab punane joon.

Kõige olulisem miR-203 funktsioon on diferentseerumise soodustamine ning seekaudu on epidermise struktuuri ja kihtide moodustumise jaoks oluline (Yi *et al.*, 2008). MiR-203 soodustab diferentseerumist sellega, et pärsib keratinotsüütide proliferatsioonist ning seda peamiselt läbi transkriptsioonifaktor TP63 (*tumor protein 63*) inhibeerimise (Chen *et al.*, 2016). TP63 on hädavajalik mitmekihilise epiteeli tüvirakkude säilitamises (Yi *et al.*, 2008), sest TP63 inhibeerib TP53 (*cellular tumor antigen p53*), mis omakorda soodustab rakkude diferentseerumist (Lee ja Kimelman, 2002). TP53 on omakorda positiivseks regulaatoriks miR-203-le (McKenna *et al.*, 2010). Lisaks TP63-le võib miR-203 reguleerida

<sup>4</sup> miRBase andmebaas, külastatud 24.05.17, [http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna\\_summary.pl?org=hsa](http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_summary.pl?org=hsa)

<sup>5</sup> miRBase andmebaas, külastatud 24.05.17, [http://www.mirbase.org/cgi-bin/get\\_seq.pl?acc=MIMAT0000264](http://www.mirbase.org/cgi-bin/get_seq.pl?acc=MIMAT0000264)

proliferatsiooni ka läbi teiste valkude mRNA-de inhibeerimise, nt proto-onkogeen c-Myc (Lohcharoenkal *et al.*, 2016), Skp2 (*S-phase kinase-associated protein 2*) (Jackson *et al.*, 2013) ja proto-onkogeen c-Jun (Sonkoly *et al.*, 2012). Nahas on proliferatsiooni regulatsioon oluline ka haavade paranemisel. On leitud, et haava piiril migreeruvates ja jagunevates keratinotsüütides on miR-203 tase madal, kuid nende kõrval rakkudes, mis taastavad mitmekihilist epiteeli, on miR-203 tase normaalne (Viticchie *et al.*, 2012). Seega on miR-203 võimeline vähendama proliferatsiooni ning indutseerima keratinotsüütide rakutsüklist väljumist (Deppe *et al.*, 2016), kuid samas tagatakse tema madal tase haavade paranemisel.

MiR-203 sünteesivad küll põhiliselt keratinotsüüdid, kuid selle ekspressioon on leitud ka mujal organites ning samuti on mitmete haiguste puhul täheldatud miR-203 taseme muutusi. Näiteks on miR-203 tase madalam mitmetes nahakasvajates – lameraku kartsinoomis (Lohcharoenkal *et al.*, 2016), melanoomis (Noguchi *et al.*, 2016) ja basaalaraku kartsinoomis (Sonkoly *et al.*, 2012). Samas on reumatoidartriidi sünoviaalsetes fibroblastides nähtud miR-203 taseme tõusu, kus ta soodustab NF-κB aktiveerimist ning reumatoidartriidi sümptomite avaldumist (Stanczyk *et al.*, 2011). Samuti on leitud, et miR-203 tase on terves nahas ja atoopilise dermatiidi korral võrdne, kuid psoriaasi puhul on miR-203 ekspressioon tõusnud (Sonkoly *et al.*, 2007).

Üheks siinkohal oluliseks miR-203 märklauaks on valk SOCS3 (*suppressor of cytokine signaling 3*) (Navarro *et al.*, 2016), mis teadaolevalt inhibeerib STAT3 signaalirada (*signal transducer and activator of transcription 3*) (Sonkoly *et al.*, 2007). STAT3 on transkriptsioonifaktor, mis on psoriaasi patoloogias oluline, sest pidevalt aktiivne STAT3 viib spontaansete psoriaasi laikude tekkeni (Sano *et al.*, 2005). Seega võib miR-203 olla psoriaasi puhul patogeenseks mikro-RNA-ks, sest inhibeerib SOCS3-e, mis võib viia STAT3 raja pideva aktiveerumiseni, mis omakorda toob kaasa leukotsüütide infiltratsiooni ja psoriaasi laikude tekke (Sonkoly *et al.*, 2007).

Eelnevale vastupidiselt on leitud, et miR-203 samuti inhibeerib põletikku soodustavate tsütokiinide tootmist (Wei *et al.*, 2013). Põhjus, miks miR-203 on põletikus kõrgema ekspressiooniga, on veel välja selgitamata, kuid antud mikro-RNA märklaudade uurimine annab alust järeldada, et miR-203-l on nii põletikku soodustavaid kui ka inhibeerivaid omadusi (Primo *et al.*, 2012). Seetõttu tuleks miR-203 seost immuunsüsteemi ning põletikuliste haigustega veel uurida.



## 2. EKSPERIMENTAALOSA

### 2.1 Töö eesmärgid

On teada, et miR-146a on inhibeeriva toimega immuunsüsteemis ning miR-203 soodustab keratinotsüütide diferentseerumist nahas. Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida, kas miR-146a reguleerib miR-203 ekspressiooni taset nahas ja keratinotsüütides. Antud töö täpsemad eesmärgid olid:

- selgitada välja, kas *miR-146a<sup>-/-</sup>* hiire nahas ja keratinotsüütides on miR-203 tase muutunud;
- uurida, kas miR-203 tase on muutunud miR-146a transfektsiooni korral inimese primaarsetes keratinotsüütides;
- analüüsida, kas miR-146a transfektsioon mõjutab miR-203 ekspressiooni reguleerivate faktorite avaldumise taset.

### 2.2 Materjal ja meetodika

#### 2.2.1 *In situ* hübridisatsioon

*In situ* hübridisatsioon (ISH) teostati 10 µm paksustel parafineeritud koelõikudel kasutades mikro-RNA ISH puhvrit ja 5'-DIG (digoksigeniin) ning 3'-DIG märgistatud hsa-miR-203-3p (610926-360) ja negatiivse kontrolli (699004-360) miRCURY LNA™ määramissondi. Töö teostati vastavalt tootja protokollile (Exiqon, Taani). Prehübridiseerimine, hübridiseerimine ning pesud teostati 46° C juures. Detekteerimiseks inkubeeriti koelõike aluselise fosfataasiga (AP) konjugeeritud lamba anti-DIG-AP (1:1500, Roche, Šveits) 1 tunni jooksul toatemperatuuril. Visualiseerimiseks lisati aluselise fosfataasi substraati BM Purple (Roche, Šveits). Helen Hermann valmistas töös analüüsitud *in situ* hübridisatsiooni preparaadid ning visualiseerimiseks kasutati Leica DM5500 B mikroskoopi (Leica Microsystems, Saksamaa).

#### 2.2.2 Hiire atoopilise dermatiidi mudel kasutades MC903

Hiirtega seotud katsed viidi läbi Tartu Ülikooli molekulaar- ja rakubioloogia instituudi vivaariumis. Katsed teostati algselt publikatsiooni Rebane *et al.*, 2014 jaoks. RNA-d, mis sain valmiskujul oma katsetes kasutamiseks, pärinevad Ana Rebaselt.

Lühidalt öelduna tekitati hiirtel atoopiline dermatiit kasutades MC903 (kaltsipotriooli hüdraat, C4369, Sigma-Aldrich, USA) Li *et al.*, 2006 järgi. MC903 lahustati etanoolis ja kanti hiire kõrvadele (1 nmol kõrva kohta) üle päeva 10 korda alustades 0. päevaga. Kontrollina kasutati hiiri, kelle kõrvadele kanti sama hulk etanooli. Kõrvade biopsiad võeti 19. päeval. RNA eraldati komplektiga miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Saksamaa).

## **2.2.3 Inimese ja hiire primaarsete keratinotsüütide kasvatamine ja paljundamine**

### **2.2.3.1 Inimese primaarsete keratinotsüütide kasvatamine ja paljundamine**

Töös kasutatud primaarseid normaalseid inimese epidermaalseid keratinotsüüte (NHEK, *normal human epidermal keratinocytes*) (PromoCell, Saksamaa) kasvatati *Keratinocyte-SFM* (*Keratinocyte serum-free medium*) söötmes (Invitrogen, USA), millele oli lisatud penitsilliini ja streptomütsiini (1:1000) (Lonza, Šveits). Rakke kasvatati 10 cm diameetriga koekultuuri tassidel, mida hoiti 37° kraadi juures 5% CO<sub>2</sub> ja veeauruga küllastatud keskkonnas. Rakkude eraldamiseks tassidelt kasutati trüpsiini-EDTA lahust (0,05% trüpsiini ja 0,02% EDTA-d) (GE Healthcare, UK) ning selle toime pidurdati trüpsiini neutraliseeriva lahusega (Invitrogen, USA).

### **2.2.3.2 Hiire primaarsete keratinotsüütide kasvatamine**

Hiire primaarseid keratinotsüüte eraldati ning kasvatati lühiajaliselt Lichti *et al.*, 2008 järgi. Katsetes kasutati kuue- kuni seitsmenädalasi isaseid hiiri, üks metsiktüüpi hiir ja üks *miR-146a<sup>-/-</sup>* hiir. Hiirte surmamise ja sabade eemaldamise teostas Toomas Runnel, kellel on vastav pädevustunnistus. Hiirte sabade seest eemaldati kõhr. Edasi eraldati epidermis ja dermis inkubeerides nahka dispaas II-s (Life Technologies, USA) üleöö 4° C juures. Rakususpensiooni saavutamiseks inkubeeriti epidermist 0,05% trüpsiini lahuses 37° C juures 15 minutit ning seejärel kanti proov läbi 70 µm poori suurusega rakuõela. Katsetes kasvatati rakke 24 kannuga plaatidel, umbes 20 000 – 30 000 raku kannu kohta. Rakke kasvatati lisanditega *Keratinocyte-SFM* söötmes 48 tundi enne stimuleerimist. Stimuleerimiseks kasutati samu tingimusi, mis inimese primaarsete keratinotsüütide puhul. Hiire primaarsetest keratinotsüütidest saadud RNA sain valmiskujul Helen Hermannilt.

#### **2.2.4 Rakkude stimuleerimine tsütokiinidega**

Inimese primaarsed keratinotsüüdid jagati 24 tundi enne stimuleerimist 12 kannuga plaatidele, umbes 60 000 rakku kannu kohta. Rakke loendati TC20™ automatiseeritud rakkude loenduriga (Bio-RAD, USA). Stimuleerimiseks kasutati tsütokiine TNF- $\alpha$  (lõppkontsentratsiooniga 20 ng/ml) (Biolegend, USA) ja IL-17A (lõppkontsentratsiooniga 10 ng/ml) (Peprotech, UK). Pärast 48 tundi kestnud stimulatsiooni eemaldati rakkudelt sööde, pesti PBS-iga (Lonza, Šveits) ning lisati 500  $\mu$ l TRI reagenti® (Zymo Research, USA). Lüsaati hoiti -20° C juures RNA eraldamiseni.

#### **2.2.5 Transfekterimine mikro-RNA miimidega**

Inimese keratinotsüüdid jagati 24 tundi enne transfektsiooni algust 12 kannuga plaatidele, umbes 40 000 rakku kannu kohta. Rakud loendati TC20™ automatiseeritud rakkude loenduriga (Bio-RAD, USA). Transfekterimiseks kasutati miRIDIAN miR-146a miimi (lõppkontsentratsioon 60 nM) (kataloogi number: C-300630-03-0020, GE Healthcare, UK) ning miRIDIAN mikro-RNA miimi negatiivset kontrolli nr 1 (lõppkontsentratsioon 60 nM) (CN-001000-01) (GE Healthcare, UK). Mikro-RNA-d viidi rakkudesse kasutades siPORT™ NeoFX™ transfektsioonireagenti (lõppkontsentratsioon 3  $\mu$ l/ml) (Life Technologies, USA). Pärast 48 tundi kestnud transfektsiooni eemaldati rakkudelt sööde, pesti PBS-iga (Lonza, Šveits) ning lisati 500  $\mu$ l TRI reagenti® (Zymo Research, USA). Lüsaati hoiti -20° C juures RNA eraldamiseni.

#### **2.2.6 RNA eraldamine inimese primaarsetest keratinotsüütidest**

Keratinotsüütidest RNA eraldamiseks kasutati Direct-zol™ RNA MiniPrep komplekti (Zymo Research, USA). Rakulüsaadid koguti tuubidesse ning lisati 110  $\mu$ l kloroformi (AppliChem, Saksamaa). Seejärel segati katsuteid intensiivselt 20 sekundi jooksul, inkubeeriti 2-3 minutit ning tsentrifugeeriti 15 minutit 12 000 rcf 4° C juures (Eppendorf 5424 R, FA-45-24-11 rootor, Saksamaa). Järgmiseks eraldati vesifaas, millele lisati 1,5 mahtu 100% etanooli (Naxo, Eesti) ning edasi töötati vastavalt tootja protokollile (Direct-zol™ RNA MiniPrep komplekt, Zymo Research, USA). RNA elueeriti kolonnidelt 50  $\mu$ l milliQ veega ning kontsentratsiooni ja puhtust kontrolliti NanoDrop 2000c spektrofotomeetriga (Thermo Scientific, USA).

## 2.2.7 RT-qPCR mRNA tasemete uurimiseks

RT-qPCR (*reverse transcription quantitative polymerase chain reaction*) meetodil mRNA tasemete analüüsimiseks sünteesiti RNA-le komplementaarne DNA (cDNA). Kasutatud RNA proovid olid keskmiselt kontsentratsiooniga 25 ng/μl. Komplementaarse DNA sünteesi jaoks segati 96 kannuga plaadil kokku 11,5 μl RNA proovi, 1 μl oligo(dT)<sub>18</sub> praimerit (100 μM) (TAG Copenhagen, Taani) ning 2 μl nukleotiidide segu (dNTP, 10x) (Thermo Scientific, USA) samal ajal plaati jääl hoides. Seejärel kuumutati plaati 5 minutit 65° C juures ning pärast seda töötati jääl edasi. Kannudesse lisati 4 μl RT puhvrit (5x), 1 μl RevertAid pöördtranskriptaasi ning 0,5 μl RNAasi inhibiitorit (Thermo Scientific, USA). Järgmisena asetati plaat Mastercycler® nexus termotsüklerisse (Eppendorf, Saksamaa) ning kuumutati 1 tund 42° C juures ja 10 minutit 75° C juures. cDNA lahjendati lõppmahuni 500 μl ning säilitati -20° C juures.

Saadud cDNA analüüsimiseks kasutati ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA) masinat. 384 kannuga plaadile kanti segu 4 μM F+R praimeritest (TAG Copenhagen, Taani) (1 μl kannu kohta), 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR segust (Solis Biodyne, Eesti) (2,4 μl kannu kohta) ning milliQ veest (2,6 μl kannu kohta). Seejärel lisati kannudesse 6 μl cDNA proovi ning plaad asetati ViiA™ 7 masinasse. Kasutatud praimerid ning qPCR-i programm on välja toodud vastavalt tabelites 1 ja 2. Iga proovi mõõdeti kolmes korduses ja saadud lävitsükli Ct (*threshold cycle*) väärtusi analüüsiti 2<sup>-ΔΔCt</sup> meetodit kasutades MS Excelit (Microsoft, USA). Erinevate geenide ekspressioon normaliseeriti kasutades referentsgeenina EF1A (*Elongation factor 1-alpha*).

**Tabel 1. Kasutatud praimerid**

Praimer	Produkti pikkus		Järjestus
CARD10	112 nukleotiidi	F	5' AGTGTGCCCGAGCGGAAAGCC 3'
		R	5' GATGGCCCGGATCCTGCTGC 3'
TP53	163 nukleotiidi	F	5' AGCCAAGTCTGTGACTTGCA 3'
		R	5' AACCTCCGTCATGTGCTGT 3'
EF1A	94 nukleotiidi	F	5' CCACCTTTGGGTCGCTTTGCTGT 3'
		R	5' TGCCAGCTCCAGCAGCCTTCTT 3'

**Tabel 2. qPCR-i programm**

<b>Etapp</b>	<b>Temperatuur (° C)</b>	<b>Aeg</b>	<b>Korduste arv</b>
Ensüümi aktivatsioon	95	15 minutit	1
Denaturatsioon	95	15 sekundit	40
Produkti paljundamine	60	1 minut	
Dissotsiatsioonianalüüsi etapp	95	15 sekundit	1
	60	1 minut	
	95	15 sekundit	

### 2.2.8 RT-qPCR miRNA tasemete uurimiseks

Ka miRNA tasemete uurimiseks RT-qPCR meetodil sünteesiti cDNA. 96 kannuga plaati jääl hoides pipeteeriti kannudesse tabelis 3 toodud komponendid (TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies, USA)). Plaat asetati Mastercycler® nexus termotsüklerisse (Eppendorf, Saksamaa), kus programmiks oli 30 minutit 16° C juures, 30 minutit 42° C juures ning 10 minutit 85° C juures. Saadud cDNA säilitati -20° C juures.

**Tabel 3. Reaktsioonisegu koostis**

<b>Komponent</b>	<b>Kogus 1 proovi kohta</b>
dNTP (100 mM)	0,028 µl
Pöördtranskriptaas (100 µM)	0,2 µl
RT puhver (10x)	0,6 µl
RNaasi inhibiitor	0,1 µl
MilliQ vesi	2,07 µl
RT praimer (5x)	1 µl
RNA proov	2 µl

Saadud cDNA analüüsimiseks kasutati ViiA™ 7 Real-Time PCR System masinat (Applied Biosystems, USA). 96 kannu plaadil olevatele cDNA-dele lisati 4,4 µl 5x HOT FIREPol® Probe qPCR Mix Plus (Solis Biodyne, Eesti), 1 µl 20x TaqMan® MicroRNA Assay (Life Technologies, USA) praimereid (miR-203, miR-146a või let-7a) ja 11,6 µl milliQ vett. Segu jagati laiali kahe kannu vahel 384 kannuga plaadil ning asetati ViiA 7 masinasse. Kasutatav

programm on välja toodud tabelis 4. Iga proovi mõõdeti kahes korduses ja saadud Ct väärtusi analüüsiti  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  meetodit kasutades MS Exceliga (Microsoft, USA). Erinevate geenide ekspressioon normaliseeriti kasutades referentsgeenina let-7a.

**Tabel 4. qPCR-i programm**

<b>Etapp</b>	<b>Temperatuur (° C)</b>	<b>Aeg</b>	<b>Korduste arv</b>
Ensüümi aktivatsioon	95	10 minutit	4
Denaturatsioon	95	15 sekundit	40
Produkti paljundamine	60	60 sekundit	

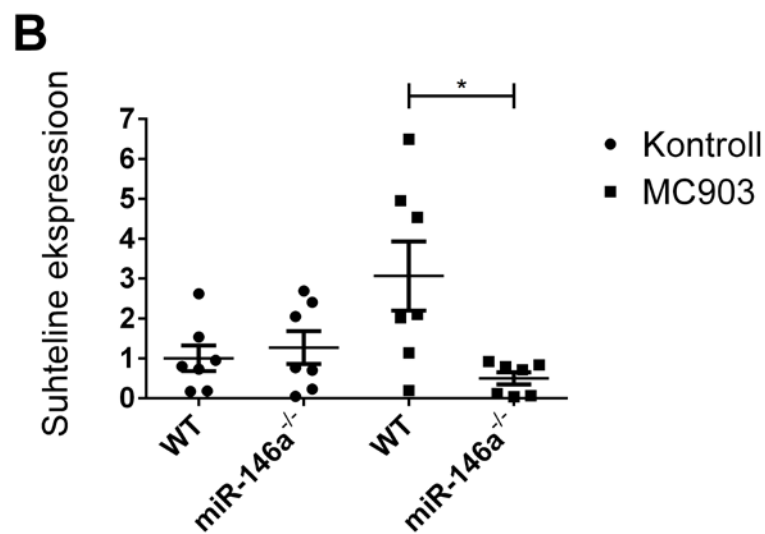
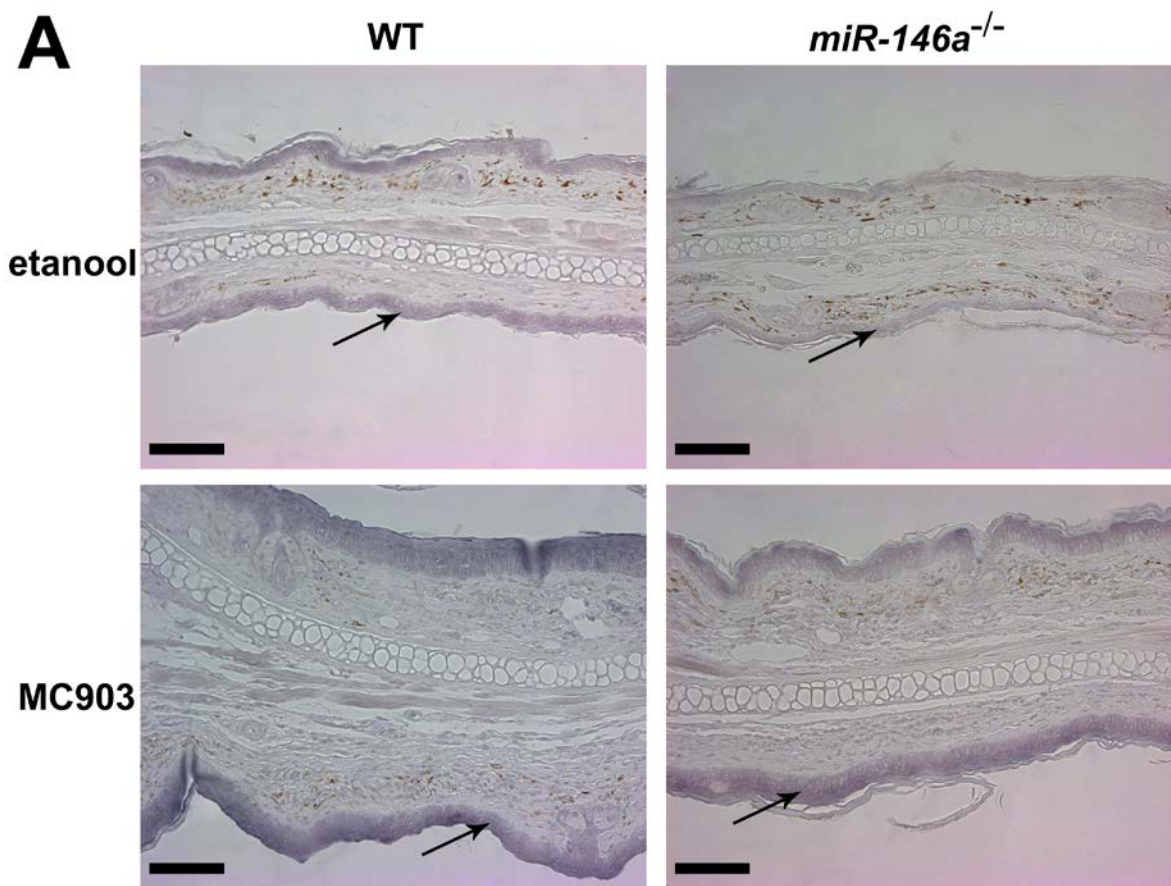
### 2.2.9 Statistiline analüüs

Tulemuste analüüsimiseks ning esitamiseks kasutati programmi GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc, USA). Statistiliseks analüüsiks kasutati sõltumatute valimite keskväärtuste võrdlemiseks mõeldud kahepoolset Studenti t-testi, eeldades andmete sarnast hajuvust. Joonistel on esitatud katse tulemused koos standardveaga (*standard error of the mean*, SEM). Tulemused loeti statistiliselt olulisteks, kui P-väärtus oli alla 0,05. Tähistused joonistel: \* P < 0,05, \*\* P < 0,01, \*\*\* P < 0,001, \*\*\*\* P < 0,0001.

## 2.3 Tulemused

### 2.3.1 MiR-203 ekspressioon metsiktüüpi ja *miR-146a*<sup>-/-</sup> hiire nahas

Käesolev uurimistöö sai alguse miRNA *in situ* hübridisatsiooni meetodi optimeerimise katsest, kus tehti miR-203 *in situ* hübridisatsioon metsiktüüpi (*wild type*, WT) ning miR-146a *knock-out* (*miR-146a*<sup>-/-</sup>) hiirte kõrvade koelõikudel. Kasutati varem läbi viidud katse materjale, kus WT ja *miR-146a*<sup>-/-</sup> hiirtele tekitati atoopilise dermatiidi laadne põletik kasutades MC903 lahustatuna etanoolis. Kontrollideks olid selles katses hiired, kelle kõrvadele kanti sama hulk etanooli (Rebane *et al.*, 2014). Joonisel 5A on näidatud *in situ* hübridisatsiooni tulemused koelõikudest, mis pärinesid etanooliga töödeldud WT hiirest ja *miR-146a*<sup>-/-</sup> hiirest ning MC903 töödeldud WT hiirest ja *miR-146a*<sup>-/-</sup> hiirest (Joonis 5A). Väljatoodud jooniselt on näha, et etanooliga töödeldud kõrvades oli miR-203 tase tõusnud metsiktüüpi hiirtel võrreldes *miR-146a*<sup>-/-</sup> hiirega. Sama efekt esines ka atoopilise dermatiidi mudeli puhul. Helen Hermann teostas *in situ* hübridisatsiooni, Merit Müür pildistas preparaate. Järgmisena tegime miRNA RT-qPCR-i kasutades samast hiirest pärinevat RNA-d (Joonis 5B), mis oli eraldatud Ana Rebase poolt. Jooniselt on näha, et etanooliga töötlemise puhul pole näha erinevust metsiktüüpi ja *miR-146a*<sup>-/-</sup> hiire miR-203 tasemete vahel, kuid atoopilise dermatiidi puhul oli WT hiire nahas miR-203 tase 6,1 ( $\pm$  0,9) korda kõrgem kui *miR-146a*<sup>-/-</sup> hiire nahas.

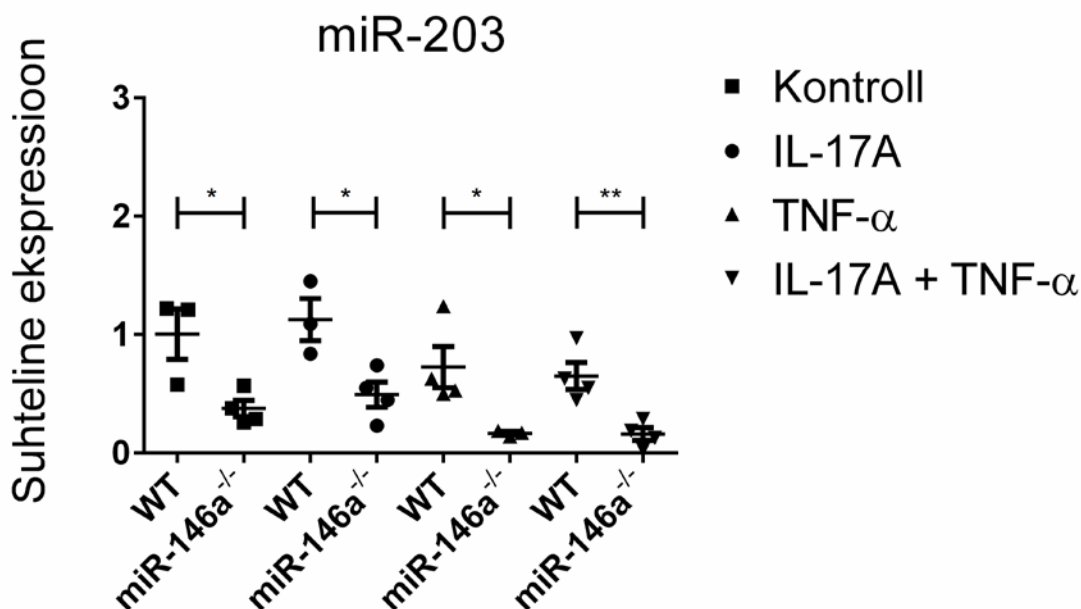


**Joonis 5. MiR-203 ekspressioon metsiktüüpi ning *miR-146a*<sup>-/-</sup> hiirte nahas.** Metsiktüüpi (WT) ja *miR-146a*<sup>-/-</sup> hiire naha miR-203 tase atoopilise dermatiidi mudeli (MC903) ja etanooliga määrimise (kontroll) korral. **A)** *In situ* hübridisatsiooni analüüs metsiktüüpi ning *miR-146a*<sup>-/-</sup> hiire kõrvade läbilõigetel. MiR-203 ekspressioon annab sinist signaali. Skaala=100 µm. **B)** MiR-203 ekspressiooni tase leiti RT-qPCR-i abil ning tulemus on normaliseeritud koduhoidja miRNA *let-7a* ja mittestimuleeritud naha (kontroll) suhtes. Joonisel on veapiiridena esitatud SEM. Tulemuste statistilise olulisuse leidmiseks kasutati Studenti t-testi. N=7, \* P < 0,05.



### 2.3.2 MiR-203 ekspressioon hiire primaarsetes keratinotsüütides

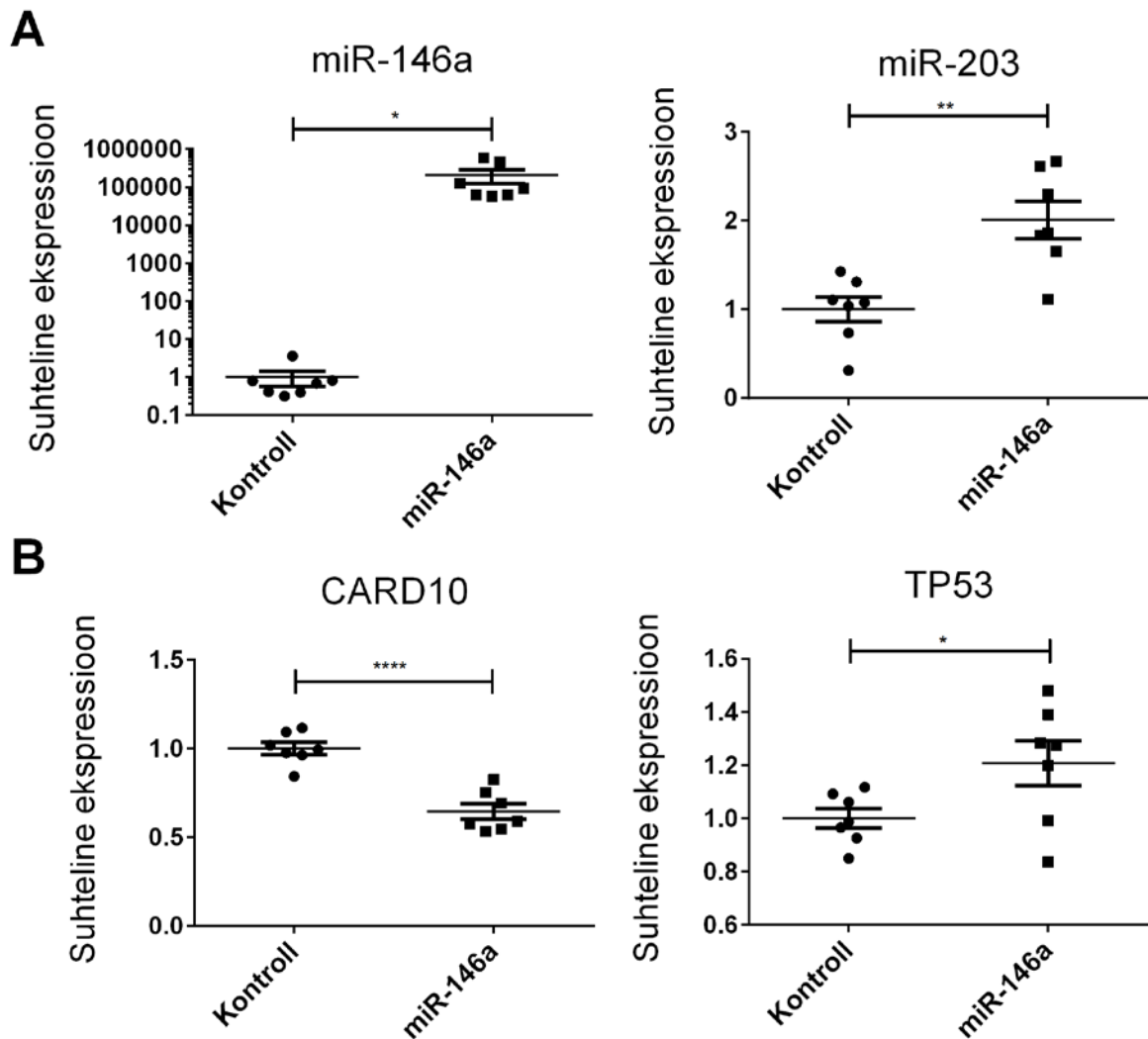
Järgmiseks soovisime uurida, kas hiire primaarsetes keratinotsüütides kehib sama seos. Hiire primaarsed keratinotsüüdid eraldati metsiktüüpi hiirelt kui ka *miR-146a*<sup>-/-</sup> hiirelt. Saadud keratinotsüüte stimuleeriti tsütokiinidega IL-17A, TNF- $\alpha$  ning mõlemaga korraga (IL-17A + TNF- $\alpha$ ). Joonisel 6 on näha, et *miR-146a*<sup>-/-</sup> hiirte keratinotsüütides oli miR-203 tase madalam nii stimulatsioonidega kui ilma, võrreldes metsiktüüpi hiire rakkudega. MiR-203 ekspressiooni tasemete vahe WT ja *miR-146a*<sup>-/-</sup> stimuleerimata keratinotsüütides oli 2,7 ( $\pm$  0,2) kordne. IL-17A-ga stimuleerides oli WT ja *miR-146a*<sup>-/-</sup> keratinotsüütides miR-203 vahe 2,3 ( $\pm$  0,2) kordne. MiR-203 ekspressiooni tasemete vahe TNF- $\alpha$ -ga stimuleeritud keratinotsüütides oli 4,4 ( $\pm$  0,2) kordne. IL-17A ja TNF- $\alpha$ -ga korraga stimuleerides oli vahe WT ja *miR-146a*<sup>-/-</sup> keratinotsüütide miR-203 tasemetes 4,0 ( $\pm$  0,1) kordne.



**Joonis 6. MiR-203 suhteline ekspressioon metsiktüüpi ja *miR-146a*<sup>-/-</sup> hiire primaarsetes keratinotsüütides erinevate tsütokiinidega stimuleerides.** Metsiktüüpi (WT) ja *miR-146a*<sup>-/-</sup> hiire keratinotsüütide miR-203 tase IL-17A, TNF- $\alpha$  ja mõlemaga koos (IL-17A + TNF- $\alpha$ ) stimuleerides ning stimuleerimata (kontroll). Stimulatsioon kestis 48 tundi. MiR-203 ekspressiooni tase leiti RT-qPCR-i abil ning tulemus normaliseeriti miRNA let-7a ja mittestimuleeritud keratinotsüütide (kontroll) suhtes. Joonisel on veapiiridena esitatud SEM. Tulemuste statistilise olulisuse leidmiseks kasutati Studenti t-testi. N=3-4, \* P < 0,05, \*\* P < 0,01.

### **2.3.3 MiR-203 ekspressioon inimese primaarsetes keratinotsüütides**

Järgnevalt sooviti näha, kas miR-203 ekspressioon on mõjutatav miR-146a poolt ka inimese primaarsetes keratinotsüütides. Selleks transfekteeriti inimese primaarseid keratinotsüüte miR-146a miimiga või vastava kontrolliga (Joonis 7). Transfektsiooni efektiivsust kontrolliti miR-146a taseme mõõtmisega ning tulemusest võib järeldada, et transfektsioon oli edukas – miR-146a tase tõusis transfektsiooni tagajärjel üle 200 000 korra. Lisaks sellele langes teadaoleva miR-146a märklaua CARD10 tase 1,6 ( $\pm 0,1$ ) korda, mis samuti näitab, et transfekteeritud miR-146a oli aktiivne. MiR-146a transfektsioon tõi keratinotsüütides kaasa miR-203 ekspressiooni 2,0 ( $\pm 0,3$ ) kordse tõusu. Ka TP53 tase tõusis 1,2 ( $\pm 0,1$ ) korda, mis annab alust arvata, et miR-146a initsieeris miR-203 tõusu selle regulaatori kaudu (Joonis 8).



**Joonis 7. MiR-146a toime miR-203, TP53 ning CARD10 ekspressioonile inimese primaarsetes keratinotsüütides.** Keratinotsüüte transfekteeeriti miR-146a miimiga (miR-146a) või vastava kontrolliga (kontroll). Transfektsioon kestis 48 tundi. **A)** Mikro-RNA-de ekspressiooni tase leiti RT-qPCR-i abil ning tulemused normaliseeriti mikro-RNA let-7a ja mittetransfekteeeritud rakkude (Kontroll) suhtes. **B)** mRNA-de ekspressiooni tase leiti RT-qPCR-i abil ning tulemused normaliseeriti EF1A mRNA ja mittetransfekteeeritud rakkude (Kontroll) järgi. Joonisel on veapiiridena esitatud SEM. Tulemuste statistilise olulisuse leidmiseks kasutati Studenti t-testi. N=7, \* P < 0,05, \*\* P < 0,01, \*\*\*\* P < 0,0001.

## 2.4 Arutelu

Käesolev bakalaureusetöö keskendus kahele mikro-RNA-le – miR-146a ja miR-203. Töös uuriti, kas miR-146a mõjutab miR-203 taset hiire nahas ja hiire ning inimese naha keratinotsüütides. MiR-146a on oluline immuunsüsteem inhibeerija ning miR-203 vastutab keratinotsüütide diferentseerumise eest. Käesolev töö annab informatsiooni nahas toimuvatest molekulaarsetest sündmustest ja seda on võimalik ära kasutada põletikuliste nahahaiguste edasiseks uurimiseks ning kaugemas perspektiivis ravimite väljatöötamiseks.

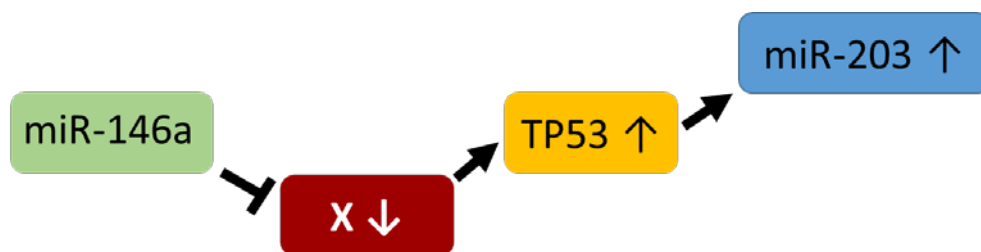
Arvestades et mikro-RNA-d reguleerivad üle 60% inimese valke kodeerivatest geenidest ning mikro-RNA-de geenide transkriptsiooni mõjutatakse samamoodi nagu teistegi geenide transkriptsiooni, on mikro-RNA-de mõju teistele mikro-RNA-de geenidele vähe uuritud (Matkovich *et al.*, 2013). Käesolev bakalaureusetöö näitab samuti, et seosed mikro-RNA-de ekspressioonitasemete vahel on olemas.

Bakalaureusetöö üheks eesmärgiks oli uurida miR-146a mõju miR-203 ekspressioonile hiire nahas ning hiire ja inimese primaarsetes keratinotsüütides. Lisaks sooviti analüüsida, milliste geenide kaudu võib miR-146a mõjutada miR-203 taset. Optimeerides *in situ* hübridisatsiooni meetodit, leidsime juhuslikult, et *miR-146a<sup>-/-</sup>* hiire nahas oli miR-203 tase madalam kui metsiktüüpi hiire nahas ning sama efekti nähti ka juhul kui hiirtele oli rakendatud atoopilise dermatiidi mudelit. Kui samades katsetingimustes mõõdeti RT-qPCR-i abil hiire naha miR-203 taset, leiti, et miRNA tase ei erinenud metsiktüüpi ja *miR-146a<sup>-/-</sup>* hiire nahas kontrolltingimustel. Selle põhjuseks võib olla metsiktüüpi hiirte naha rühma miR-203 tasemete suur varieeruvus. Atoopilise dermatiidi mudelist pärit materjali korral oli WT hiire nahas miR-203 tase kõrgem kui kontrolltingimustes. Sonkoly *et al.* näitas 2010. aastal analoogilist muutust, kasvatades inimese primaarseid keratinotsüüte vitamiin D3 keskkonnas. Käesolevas töös leiti, et *miR-146a<sup>-/-</sup>* hiirtes ei muutunud atoopilise dermatiidi mudelit rakendades miR-203 tase, mis viitab sellele, et miR-146a võib mõjutada keratinotsüütides miR-203 taset põletikulises olukorras.

Eelnevad tulemused leiti hiire nahas ning järgnevalt sooviti teada saada, kas antud seos esineb ka hiire primaarsetes keratinotsüütides. Kuna varem nähti erinevust põletikulises olukorras, siis stimuleeriti metsiktüüpi ning *miR-146a<sup>-/-</sup>* hiire primaarseid keratinotsüüte erinevate tsütokiinidega või jäeti stimuleerimata. Erinevalt eelnevast tulemusest leiti, et *miR-146a<sup>-/-</sup>* hiire keratinotsüütides oli miR-203 tase madalam kui metsiktüüpi hiire keratinotsüütides ka stimuleerimata olukorras. Erinevus võib tuleneda sellest, et nahk koosneb erinevas arenguetapis olevatest keratinotsüütidest kui ka lõplikult diferentseerunud rakkudest (Celli *et*

al., 2011) ning need kõik ei pruugi reageerida miR-146a puudumisele. Kuna rakukultuuris on rakud sarnases diferentseerumisastmes, siis katses oli ka vähem varieeruvust. Antud tsütokiinid ise ei mõjutanud märkimisväärselt miR-203 taset. Kõigi stimulatsioonide korral oli miR-146a puudumisel miR-203 tase madalam. Ka Sonkoly *et al.* näitas 2010. aastal, et miR-203 ei reageeri tavalistele põletikulistele tsütokiinidele.

Antud töös uurisime ka, kas hiires leitud seos miR-146a ja miR-203 ekspressiooni vahel kehtib ka inimese primaarsetes keratinotsüütides. Selleks transfekteeriti inimese epidermaalseid keratinotsüüte miR-146a-ga. Transfektsiooni tulemusel tõusis inimese primaarsetes keratinotsüütides miR-203 tase, mis viitab sellele, et hiires ja inimeses toimib antud mehhanism sarnaselt. Täpsema regulatsiooni väljaselgitamiseks mõõdeti teadaoleva miR-203 positiivse regulaatori TP53 ekspressiooni (McKenna *et al.*, 2010) ning leiti, et ka TP53 tase oli kõrgem miR-146a-ga transfekteeritud rakkudes. Seetõttu võib järeldada, et miR-146a tõstab miR-203 ekspressiooni ning see võib toimida läbi TP53 taseme regulatsiooni. Käesoleva bakalaureusetöö raames analüüsiti ka võimalust, et miR-146a reguleerib TP53 otse, kuid bioinformaatilisest analüüsist otsene seos välja ei tulnud. Seega võib arvata, et miR-146a mõju TP53 tasemele toimib läbi mõne teise teguri, mida siinkohal hetkel ei uuritud. Antud informatsioonist võib järeldada, et miR-146a mõju TP53 tasemele on kaudne (Joonis 8).



**Joonis 8. Molekulaarne seos miR-146a ning miR-203 vahel.** McKenna *et al.*, 2010 ning käesoleva bakalaureusetöö eksperimentaalses osas leitud informatsioon põhjal võib välja pakkuda, et miR-146a inhibeerib faktorit X, soodustades seeläbi TP53 ekspressiooni, mis omakorda tõstab miR-203 taset.

Kokkuvõttes leiti käesoleva bakalaureusetöö tulemusena, et miR-146a puudumine hiire nahas ja keratinotsüütides viis miR-203 taseme vähenemisele ja miR-146a miimide transfektsiooniga kaasnes miR-203 kõrgem ekspressioon. Samuti näidati, et miR-146a mõjutab positiivselt ühe miR-203 võimaliku regulaatorgeeni, TP53 ekspressiooni taset keratinotsüütides. MiR-146a ja TP53 vahelise täpsema regulatsiooni uurimine võiks olla üheks edasiseks uurimissuunaks, et selgitada välja, milliste vahemolekulide kaudu miR-146a miR-203 taset mõjutab.

## KOKKUVÕTE

Atoopiline dermatiit on krooniline põletikuline nahahaigus, millega kaasnevad punakad nahalaigud ja sügelus. Mikro-RNA-d on lühikesed üheaheelalised RNA molekulid, mille funktsiooniks on komplementaarsuse alusel paarduvate mRNA-de transkriptsioonijärgne regulatsioon. Mikro-RNA-d osalevad mitmetes bioloogilistes protsessides ning nende regulatsiooni vigu seostatakse haigustega.

Käesoleva töö eesmärgiks oli välja selgitada, kas on olemas seos miR-146a taseme muutuse ning miR-203 ekspressiooni vahel. Töö sai alguse tähelepanekust, et *miR-146a<sup>-/-</sup>* hiirtel on madalam miR-203 ekspressiooni tase nahas kui metsiktüüpi hiirtel. See tulemus leidis kinnitamist miRNA ekspressiooni analüüsil kasutades RT-qPCR meetodit ja materjali hiirtest, millele oli rakendatud hiire AD mudelit. Lisaks näitasime, et miR-203 oli kõrgeenenud ekspressiooniga miR-146a juuresolekul ka hiire ja inimese primaarsetes keratinotüütides.

Lisaks analüüsimise, kas miR-146a soodustab ka miR-203 positiivse regulaatori TP53 ekspressiooni tõusu. Kuna bioinformaatilise analüüsi tulemusel ei leitud, et miR-146a võiks TP53 otseselt reguleerida, siis võib eeldada, et miR-146a mõjutab TP53 läbi mõne teise teguri. See tulemus annab alust arvata, et miR-146a soodustab miR-203 kaudselt TP53 taset tõstes.

# MiR-146a Regulates Epidermis-Specific MiR-203 Level in Keratinocytes

Merit Müür

## Summary

Atopic dermatitis is a chronic inflammatory skin disease which is characterized by lesions and pruritus. MicroRNAs are short (21-25 nucleotides long) single-stranded RNA molecules which function as mRNAs posttranscriptional repressors. Their deregulation is shown to be involved in many diseases. Because of a fortuitous finding, we hypothesized that there could be a connection between two microRNAs, miR-146a and miR-203. The main goal of the thesis was to confirm and investigate this link.

Firstly, it was shown that in normal conditions that the level of miR-203 in wild type and *miR-146a*<sup>-/-</sup> mice skin was approximately the same but when the mice skin was treated with MC903 to develop atopic dermatitis-like inflammation, the wild type mouse skin expressed miR-203 at enhanced levels but *miR-146a*<sup>-/-</sup> mouse skin did not show increased expression of miR-203.

This finding was further studied in mouse keratinocytes which were stimulated with cytokines to model inflammation. It was found that wild type mice keratinocytes expressed miR-203 at higher levels than *miR-146a*<sup>-/-</sup> mice keratinocytes in all investigated occasions. We wanted to check if there was the same link in human keratinocytes as well. To address this, human primary keratinocytes were transfected with miR-146a. As a result, we saw that miR-203 level was higher in miR-146a transfected human primary keratinocytes.

In literature, it was shown that TP53 raises the level of miR-203. We proposed that it is a putative factor through which miR-146a raises the level of miR-203. The level of TP53 was measured in control and miR-146a transfected human keratinocytes and its increased expression was detected. According to these data, we can infer that miR-146a has the capacity to control the level of miR-203, most probably through regulating TP53 among other genes.

## TÄNUSÕNAD

Soovin tänada eelkõige oma juhendajaid Helen Hermanni, Ana Rebast ning Martin Pooki. Eriliselt tahan välja tuua Helen Hermanni, kes aitas katsete läbiviimisel, analüüsimisel ning töö koostamisel. Samuti tänan kõiki RNA bioloogia töögrupi liikmeid, kes mind alati aitasid, nõustasid ja õpetasid.



# KASUTATUD KIRJANDUS

## Kirjanduse loetelu

- Alexander, V., Ke, K., Xu, Z., Islam, M., Freeman, M., Pitt, B., Welsh, M. ja Orringer, J. (2011). Photothermolysis of Sebaceous Glands in Human Skin Ex Vivo with a 1,708 nm Raman Fiber Laser and Contact Cooling. *Laser Surg Med*, 43: 470–480.
- Ando, Y., Maida, Y., Morinaga, A., Burroughs, A. M., Kimura, R., Chiba, J., Suzuki, H., Masutomi, K. ja Hayashizaki, Y. (2011). Two-step cleavage of hairpin RNA with 5' overhangs by human DICER. *BMC Mol Biol*, 12: 6.
- Baek, D., Villén, J., Shin, C., Camargo, F. D., Gygi, S. P. ja Bartel, D. P. (2008). The impact of microRNAs on protein output. *Nature*, 455: 64–71.
- Behrens, D. T., Villone, D., Koch, M., Brunner, G., Sorokin, L., Robenek, H., Bruckner-Tuderman, L., Bruckner, P. ja Hansen, U. (2012). The Epidermal Basement Membrane Is a Composite of Separate Laminin- or Collagen IV-containing Networks Connected by Aggregated Perlecan, but Not by Nidogens. *J Biol Chem*, 287: 18700–18709.
- Bermudez, Y., Benavente, C. A., Meyer, R. G., Coyle, W. R., Jacobson, M. K. ja Jacobson, E. L. (2011). Nicotinic Acid Receptor Abnormalities in Human Skin Cancer: Implications for a Role in Epidermal Differentiation. *PLOS ONE*, 6(5): e20487.
- Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M. ja Hannon, G. J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 409: 363–366.
- Blacksin, M. F., Ha, D.-H., Hameed, M. ja Aisner, S. (2006). Superficial Soft-Tissue Masses of the Extremities. *RadioGraphics*, 26: 1289–1304.
- Blaydon, D. C. ja Kelsell, D. P. (2014). Defective channels lead to an impaired skin barrier. *J Cell Sci*, 127: 4343–4350.
- Bogunia-Kubik, K., Wysoczańska, B., Piątek, D., Iwazsko, M., Ciechomska, M. ja Świerkot, J. (2016). Significance of Polymorphism and Expression of miR-146a and *NFκB1* Genetic Variants in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 64 (Suppl 1): S131–S136.
- Brandner, J. M., Haftek, M. ja Niessen, C. M. (2010). Adherens Junctions, Desmosomes and Tight Junctions in Epidermal Barrier Function. *Open Dermatol J*, 4: 14–20.
- Breitkreutz, D., Mirancea, N., Schmidt, C., Beck, R., Werner, U., Stark, H.-J., Gerl, M. ja Fusenig, N. E. (2004). Inhibition of basement membrane formation by a nidogen-binding laminin gamma1-chain fragment in human skin-organotypic cocultures. *J Cell Sci*, 117: 2611–2622.
- Celli, A., MacKenzie, D. S., Crumrine, D. S., Tu, C. L., Hupe, M., Bikle, D. D., Elias, P. M. ja Mauro, T. M. (2011). ER Ca<sup>2+</sup> Depletion Activates XBP1 and Controls Terminal Differentiation in Keratinocytes and Epidermis. *Br J Dermatol*, 164(1): 16–25.
- Chen, C.-Z., Li, L., Lodish, H. F. ja Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs Modulate Hematopoietic Lineage Differentiation. *Science*, 303: 83–86.

- Chen, H.-L., Chiang, P.-C., Lo, C.-H., Lo, Y.-H., Hsu, D. K., Chen, H.-Y. ja Liu, F.-T. (2016). Galectin-7 Regulates Keratinocyte Proliferation and Differentiation through JNK-miR-203-p63 Signaling. *J Invest Dermatol*, 136: 182–91.
- Choi, J., Kim, J. R., Kim, H., Kim, Y. A., Lee, H. J., Kim, J. ja Lee, K. W. (2013). The Atopic Dermatitis-Like Symptoms Induced by MC903 Were Alleviated in JNK1 Knockout Mice. *Toxicol Sci*, 136(2): 443–449.
- Coleman, J. W. (2002). Nitric oxide: A regulator of mast cell activation and mast cell-mediated inflammation. *Clin Exp Immunol*, 129: 4–10.
- Combadiere, B. ja Liard, C. (2011). Transcutaneous and intradermal vaccination. *Hum Vaccines*, 7(8): 811–827.
- Connerty, P., Ahadi, A. ja Hutvagner, G. (2015). RNA Binding Proteins in the miRNA Pathway. *Int J Mol Sci*, 17, 31.
- Czarnowicki, T., Krueger, J. G. ja Guttman-Yassky, E. (2014). Skin Barrier and Immune Dysregulation in Atopic Dermatitis: An Evolving Story with Important Clinical Implications. *J Aller Cl Imm-Pract*, 2(4): 371–379.
- Deppe, J., Steinritz, D., Santovito, D., Egea, V., Schmidt, A., Weber, C. ja Ries, C. (2016). Upregulation of miR-203 and miR-210 affect growth and differentiation of keratinocytes after exposure to sulfur mustard in normoxia and hypoxia. *Toxicol Lett*, 244: 81–87.
- Di Grazia, A., Cappiello, F., Imanishi, A., Mastrofrancesco, A., Picardo, M., Paus, R. ja Mangoni, M. L. (2015). The Frog Skin-Derived Antimicrobial Peptide Esculentin-1a(1-21)NH<sub>2</sub> Promotes the Migration of Human HaCaT Keratinocytes in an EGF Receptor-Dependent Manner: A Novel Promoter of Human Skin Wound Healing? *PLOS ONE*, 10(6): e0128663.
- Esaki, H., Ewald, D. A., Ungar, B., ... Guttman-Yassky, E. (2015). Identification of Novel Immune and Barrier Genes in Atopic Dermatitis by Laser Capture Micro-dissection. *J Allergy Clin Immunol*, 135(1): 153-163.
- Eulalio, A., Huntzinger, E. ja Izaurralde, E. (2008). GW182 interaction with Argonaute is essential for miRNA-mediated translational repression and mRNA decay. *Nat Struct Mol Biol*, 15(4): 346–353.
- Fabian, M. R. ja Sonenberg, N. (2012). The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC. *Nat Struct Mol Biol*, 19(6): 586–593.
- Felli, N., Fontana, L., Pelosi, E., ... Peschle, C. (2005). MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down-modulation. *P Natl Acad Sci USA*, 102(50): 18081–18086.
- Friedman, R. C., Farh, K. K.-H., Burge, C. B. ja Bartel, D. P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*, 19: 92–105.
- Fulkerson, P. C., Schollaert, K. L., Bouffi, C. ja Rothenberg, M. E. (2014). IL-5 triggers a cooperative cytokine network that promotes eosinophil precursor maturation. *J Immunol*, 193(8): 4043–4052.
- Gagna, C. E., Chan, N. J., Farnsworth, P. N., ... Lambert, W. C. (2009). Localization and quantification of intact, undamaged right-handed double-stranded B-DNA, and denatured

- single-stranded DNA in normal human epidermis and its effects on apoptosis and terminal differentiation (denucleation). *Arch Dermatol Res*, 301: 659–672.
- Garmhausen, D., Hagemann, T., Bieber, T., Dimitriou, I., Fimmers, R., Diepgen, T. ja Novak, N. (2013). Characterization of different courses of atopic dermatitis in adolescent and adult patients. *Allergy*, 68(4): 498–506.
- Gong, J., Zhang, J.-P., Li, B., Zeng, C., You, K., Chen, M.-X., Yuan, Y. ja Zhuang, S.-M. (2012). MicroRNA-125b promotes apoptosis by regulating the expression of Mcl-1, Bcl-w and IL-6R. *Oncogene*, 32(25): 3071-3079.
- Gonzalez-Ramos, A., Cooper, K. D. ja Hammerberg, C. (1996). Identification of a Human Dermal Macrophage Population Responsible for Constitutive Restraint of Primary Dermal Fibroblast Proliferation. *J Invest Dermatol*, 106: 305–311.
- Gu, S., Jin, L., Zhang, F., Huang, Y., Grimm, D., Rossi, J. J. ja Kay, M. A. (2011). Thermodynamic stability of small hairpin RNAs highly influences the loading process of different mammalian Argonautes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 108(22): 9208–9213.
- Guo, H., Ingolia, N. T., Weissman, J. S. ja Bartel, D. P. (2010). Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature*, 466(7308): 835–840.
- Han, J., Lee, Y., Yeom, K.-H., Kim, Y.-K., Jin, H. ja Kim, V. N. (2004). The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Gene Dev*, 18: 3016–3027.
- Hermann, H. (2015). miR-146a ja miR-146b roll psoriaasis ja keratinotsüütide proliferatsiooni regulatsioonis.
- Higgins, C. A., Chen, J. C., Cerise, J. E., Jahoda, C. A. B. ja Christiano, A. M. (2013). Microenvironmental reprogramming by three-dimensional culture enables dermal papilla cells to induce de novo human hair-follicle growth. *Proc Natl Acad Sci USA*, 110(49): 19679–19688.
- Holgate, S. T. (2012). Innate and adaptive immune responses in asthma. *Nat Med*, 18: 673–683.
- Hu, H. Y., Yan, Z., Xu, Y., Hu, H., Menzel, C., Zhou, Y. H., Chen, W. ja Khaitovich, P. (2009). Sequence features associated with microRNA strand selection in humans and flies. *BMC Genomics*, 10:413.
- Huntzinger, E. ja Izaurralde, E. (2011). Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat Rev Genet*, 12: 99–110.
- Izaurralde, E. (2015). Breakers and blockers – miRNAs at work. *Science*, 349: 380–382.
- Iwasaki, S., Kobayashi, M., Yoda, M., Sakaguchi, Y., Katsuma, S., Suzuki, T. ja Tomari, Y. (2010). Hsc70/Hsp90 Chaperone Machinery Mediates ATP-Dependent RISC Loading of Small RNA Duplexes. *Mol Cell*, 39: 292–299.
- Jackson, S. J., Zhang, Z., Feng, D., Flagg, M., O’Loughlin, E., Wang, D., Stokes, N., Fuchs, E. ja Yi, R. (2013). Rapid and widespread suppression of self-renewal by microRNA-203 during epidermal differentiation. *Development*, 140: 1882–1891.
- Janas, M. M., Wang, B., Harris, A. S., ... Novina, C. D. (2012). Alternative RISC assembly: Binding and repression of microRNA-mRNA duplexes by human Ago proteins. *RNA*, 18: 2041–2055.

- Jazdzewski, K., Murray, E. L., Franssila, K., Jarzab, B., Schoenberg, D. R. ja de la Chapelle, A. (2008). Common SNP in *pre-miR-146a* decreases mature miR expression and predisposes to papillary thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105(20): 7269–7274.
- Jonas, S. ja Izaurralde, E. (2015). Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nat Rev Genet*, 16(7): 421–433.
- Kawamata, T., Yoda, M. ja Tomari, Y. (2011). Multilayer checkpoints for microRNA authenticity during RISC assembly. *EMBO Rep*, 12(9): 944–949.
- Kelleher, M., Dunn-Galvin, A., Hourihane, J. O'B., Murray, D., Campbell, L. E., McLean, W. H. I. ja Irvine, A. D. (2015). Skin barrier dysfunction measured by transepidermal water loss at 2 days and 2 months predates and predicts atopic dermatitis at 1 year. *J Allergy Clin Immunol*, 135(4): 930–935.
- Kingo, K. 2010. Naha ehitus ja funktsioonid, lk. 9-15. Kaur, S., Silm, H., Kingo, K., Karelson, M. ja Abram, K, Nahahaigused. Tartu Ülikooli Kirjastus, Tartu.
- Konishi, H., Tsutsui, H., Murakami, T., ... Mizutani, H. (2002). IL-18 contributes to the spontaneous development of atopic dermatitis-like inflammatory skin lesion independently of IgE/stat6 under specific pathogen-free conditions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99(17): 11340–11345.
- Kriehuber, E., Breiteneder-Geleff, S., Groeger, M., Soleiman, A., Schoppmann, S. F., Stingl, G., Kerjaschki, D. ja Maurer, D. (2001). Isolation and Characterization of Dermal Lymphatic and Blood Endothelial Cells Reveal Stable and Functionally Specialized Cell Lineages. *J Exp Med*, 194(6): 797–808.
- Kwak, P. B. ja Tomari, Y. (2012). The N domain of Argonaute drives duplex unwinding during RISC assembly. *Nat Struct Mol Biol*, 19(2): 145–151.
- Larjava, H., Plow, E. F. ja Wu, C. (2008). Kindlins: essential regulators of integrin signalling and cell–matrix adhesion. *EMBO Rep*, 9(12): 1203–1208.
- Lee, H. ja Kimelman, D. (2002). A Dominant-Negative Form of p63 Is Required for Epidermal Proliferation in Zebrafish. *Dev Cell*, 2: 607–616.
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., ... Kim, V. N. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 425: 415–419.
- Li, M., Hener, P., Zhang, Z., Ganti, K. P., Metzger, D. ja Chambon, P. (2008). Induction of Thymic Stromal Lymphopoietin Expression in Keratinocytes Is Necessary for Generating an Atopic Dermatitis upon Application of the Active Vitamin D3 Analogue MC903 on Mouse Skin. *J Invest Dermatol*, 129: 498–502.
- Li, M., Hener, P., Zhang, Z., Kato, S., Metzger, D. ja Chambon, P. (2006). Topical vitamin D3 and low-calcemic analogs induce thymic stromal lymphopoietin in mouse keratinocytes and trigger an atopic dermatitis. *Proc Natl Acad Sci*, 103: 11736–11741.
- Li, M., Messaddeq, N., Teletin, M., Pasquali, J.-L., Metzger, D. ja Chambon, P. (2005). Retinoid X receptor ablation in adult mouse keratinocytes generates an atopic dermatitis triggered by thymic stromal lymphopoietin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102: 14795–14800.
- Li, N., Long, B., Han, W., Yuan, S. ja Wang, K. (2017). microRNAs: important regulators of stem cells. *Stem Cell Res Ther*, 8: 110.

- Lichti, U., Anders, J. ja Yuspa, S. H. (2008). Isolation and short-term culture of primary keratinocytes, hair follicle populations and dermal cells from newborn mice and keratinocytes from adult mice for in vitro analysis and for grafting to immunodeficient mice. *Nat Protoc*, 3: 799–810.
- Liu, X.-J., Mu, Z.-L., Zhao, Y. ja Zhang, J.-Z. (2016). Topical Tetracycline Improves MC903-induced Atopic Dermatitis in Mice through Inhibition of Inflammatory Cytokines and Thymic Stromal Lymphopoietin Expression. *Chin Med J*, 129: 1483-1490.
- Lohcharoenkal, W., Harada, M., Loven, J., ... Pivarcsi, A. (2016). MicroRNA-203 Inversely Correlates with Differentiation Grade, Targets c-MYC, and Functions as a Tumor Suppressor in cSCC. *J Invest Dermatol*, 136: 2485–2494.
- Lyons, J. J., Milner, J. D. ja Stone, K. D. (2015). Atopic Dermatitis in Children: Clinical Features, Pathophysiology and Treatment. *Immunol Allergy Clin*, 35: 161–183.
- Ma, D., Chua, A. W. C., Yang, E., Teo, P., Ting, Y., Song, C., Lane, E. B. ja Lee, S. T. (2015). Breast cancer resistance protein identifies clonogenic keratinocytes in human interfollicular epidermis. *Stem Cell Res Ther*, 6:43.
- Manevski, N., Balavenkatraman, K. K., Bertschi, B., ... Litherland, K. (2014). Aldehyde Oxidase Activity in Fresh Human Skin. *Drug Metab Dispos*, 42:2049–2057.
- Martínez-Mora, C., Mrowiec, A., García-Vizcaíno, E. M., Alcaraz, A., Cenis, J. L. ja Nicolás, F. J. (2012). Fibroin and Sericin from *Bombyx mori* Silk Stimulate Cell Migration through Upregulation and Phosphorylation of c-Jun. *PLOS ONE*, 7(7):e42271.
- Matkovich, S. J., Hu, Y. ja Dorn II, G. W. (2013). Regulation of Cardiac microRNAs by Cardiac microRNAs. *Circ Res*, 113(1): 62–71.
- McKenna, D. J., McDade, S. S., Patel, D. ja McCance, D. J. (2010). MicroRNA 203 Expression in Keratinocytes is Dependent on Regulation of p53 Levels by E6. *J Virol*, 84: 10644–10652.
- Meisgen, F., Xu Landén, N., Wang, A., ... Pivarcsi, A. (2014). MiR-146a Negatively Regulates TLR2-Induced Inflammatory Responses in Keratinocytes. *J Invest Dermatol*, 134: 1931–1940.
- Meister, G., Landthaler, M., Patkaniowska, A., Dorsett, Y., Teng, G. ja Tuschl, T. (2004). Human Argonaute2 Mediates RNA Cleavage Targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell*, 15: 185–197.
- Milovanovic, M., Drozdenko, G., Weise, C., Babina, M. ja Worm, M. (2010). Interleukin-17A Promotes IgE Production in Human B Cells. *J. Invest. Dermatol.*, 130: 2621–2628.
- Nakanishi, K. (2016). Anatomy of RISC: how do small RNAs and chaperones activate Argonaute proteins? *WIREs RNA*, 7: 637–660.
- Navarro, A., Pairet, S., Álvarez-Larrán, A., ... Bellosillo, B. (2016). miR-203 and miR-221 regulate *SOCS1* and *SOCS3* in essential thrombocythemia. *Blood Cancer J*, 6: e406.
- Noguchi, S., Kumazaki, M., Mori, T., Baba, K., Okuda, M., Mizuno, T. ja Akao, Y. (2016). Analysis of microRNA-203 function in CREB/MITF/RAB27a pathway: comparison between canine and human melanoma cells. *Vet Comp Oncol*, 14: 384–394.

- Novak, N. ja Bieber, T. (2003). Allergic and nonallergic forms of atopic diseases. *J Allergy Clin Immunol*, 112: 252–262.
- Nöske, K., Stark, H.-J., Nevaril, L., Berning, M., Langbein, L., Goyal, A., Diederichs, S. ja Boukamp, P. (2016). Mitotic Diversity in Homeostatic Human Interfollicular Epidermis. *Int J Mol Sci*, 17, 167.
- Olsen, P. H. ja Ambros, V. (1999). The *lin-4* Regulatory RNA Controls Developmental Timing in *Caenorhabditis elegans* by Blocking LIN-14 Protein Synthesis after the Initiation of Translation. *Dev Biol*, 216: 671–680.
- Paczynska, P., Grzemski, A. ja Szydłowski, M. (2015). Distribution of miRNA genes in the pig genome. *BMC Genet*, 16: 6.
- Primo, M. N., Bak, R. O., Schibler, B. ja Mikkelsen, J. G. (2012). Regulation of pro-inflammatory cytokines TNF $\alpha$  and IL24 by microRNA-203 in primary keratinocytes. *Cytokine*, 60: 741–748.
- Rebane, A., Runnel, T., Aab, A., ... Akdis, C. A. (2014). MicroRNA-146a alleviates chronic skin inflammation in atopic dermatitis through suppression of innate immune responses in keratinocytes. *J Allergy Clin Immunol*, 134: 836–847.
- Reche, P. A., Soumelis, V., Gorman, D. M., ... Bazan, J. F. (2001). Human Thymic Stromal Lymphopoietin Preferentially Stimulates Myeloid Cells. *J Immunol*, 167: 336–343.
- Rozalski, M., Rudnicka, L. ja Samochocki, Z. (2016). MiRNA in atopic dermatitis. *Adv Dermatol Allergol*, 33: 157–162.
- Sano, S., Chan, K. S., Carbajal, S., Clifford, J., Peavey, M., Kiguchi, K., Itami, S., Nickoloff, B. J. ja DiGiovanni, J. (2005). Stat3 links activated keratinocytes and immunocytes required for development of psoriasis in a novel transgenic mouse model. *Nat Med*, 11: 43–49.
- Schirle, N. T. ja MacRae, I. J. (2012). The Crystal Structure of Human Argonaute2. *Science*, 336: 1037–1040.
- Schmid(-Grendelmeier), P., Simon, D. ja Simon, H.-U., Akdis, C. A. ja Wüthrich, B. (2001). Epidemiology, clinical features, and immunology of the “intrinsic” (non-IgE-mediated) type of atopic dermatitis (constitutional dermatitis). *Allergy*, 56: 841–849.
- Schwarz, D. S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N. ja Zamore, P. D. (2003). Asymmetry in the Assembly of the RNAi Enzyme Complex. *Cell*, 115: 199–208.
- Sevrain, D., Le Grand, Y., Buhé, V., Jeanmaire, C., Pauly, G., Carré, J. L., Misery, L. ja Lebonvallet, N. (2013). Two-photon microscopy of dermal innervation in a human re-innervated model of skin. *Exp Dermatol*, 22: 290–291.
- Shreffler, W. G., Castro, R. R., Kucuk, Z. Y., Charlop-Powers, Z., Grishina, G., Yoo, S., Burks, A. W. ja Sampson, H. A. (2006). The Major Glycoprotein Allergen from *Arachis hypogaea*, Ara h 1, Is a Ligand of Dendritic Cell-Specific ICAM-Grabbing Nonintegrin and Acts as a Th2 Adjuvant In Vitro. *J Immunol*, 177: 3677–3685.
- Smith, F. J. D., Irvine, A. D., Terron-Kwiatkowski, A., ... McLean, W. H. I. (2006). Loss-of-function mutations in the gene encoding filaggrin cause ichthyosis vulgaris. *Nat Genet*, 38: 337–342.

- Sonkoly, E., Lovén, J., Xu, N., ... Pivarcsi, A. (2012). MicroRNA-203 functions as a tumor suppressor in basal cell carcinoma. *Oncogenesis*, 1, e3.
- Sonkoly, E. ja Pivarcsi, A. (2011). MicroRNAs in inflammation and response to injuries induced by environmental pollution. *Mutat Res-Fund Mol M*, 717: 46–53.
- Sonkoly, E., Stähle, M. ja Pivarcsi, A. (2008). MicroRNAs: Novel regulators in skin inflammation. *Clin Exp Dermatol*, 33: 312–315.
- Sonkoly, E., Wei, T., Janson, P. C. J., ... Pivarcsi, A. (2007). MicroRNAs: Novel Regulators Involved in the Pathogenesis of Psoriasis? *PLOS ONE*, 2: e610.
- Sonkoly, E., Wei, T., Loriè, E. P., Suzuki, H., Kato, M., Törmä, H., Stähle, M. ja Pivarcsi, A. (2010). Protein Kinase C-Dependent Upregulation of miR-203 Induces the Differentiation of Human Keratinocytes. *J Invest Dermatol*, 130: 124–134.
- Soumelis, V., Reche, P. A., Kanzler, H., ... Liu, Y.-J. (2002). Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nat Immunol*, 3: 673–680.
- Stanczyk, J., Ospelt, C., Karouzakis, E., ... Kyburz, D. (2011). Altered Expression of MicroRNA-203 in Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts and Its Role in Fibroblast Activation. *Arthritis Rheum*, 63: 373–381.
- Starczynowski, D. T., Kuchenbauer, F., Argiropoulos, B., ... Karsan, A. (2010). Identification of miR-145 and miR-146a as mediators of the 5q- syndrome phenotype. *Nat Med*, 16: 49–58.
- Stücker, M., Struk, A., Altmeyer, P., Herde, M., Baumgärtl, H. ja Lübbers, D. W. (2002). The cutaneous uptake of atmospheric oxygen contributes significantly to the oxygen supply of human dermis and epidermis. *J Physiol*, 538: 985–994.
- Sugino, M., Todo, H., Suzuki, T., Nakada, K., Tsuji, K., Tokunaga, H., Jinno, H. ja Sugibayashi, K. (2014). Safety prediction of topically exposed biocides using permeability coefficients and the desquamation rate at the stratum corneum. *J Toxicol Sci*, 39: 475–485.
- Šahmatova, L., Tankov, S., Prans, E., ... Rebane, A. (2016). MicroRNA-155 is Dysregulated in the Skin of Patients with Vitiligo and Inhibits Melanogenesis-associated Genes in Melanocytes and Keratinocytes. *Acta Derm-Venereol*, 96: 742–747.
- Zhang, L., Stokes, N., Polak, L. ja Fuchs, E. (2011). Specific MicroRNAs Are Preferentially Expressed by Skin Stem Cells To Balance Self-Renewal and Early Lineage Commitment. *Cell Stem Cell*, 8: 294–308.
- Zhang, W., Yi, X., Guo, S., ... Li, C. (2014). A single-nucleotide polymorphism of miR-146a and psoriasis: An association and functional study. *J Cell Mol Med*, 18: 2225–2234.
- Zhu, X., Xiao, L., Huo, R., ... Li, N. (2013). Cyr61 is involved in neutrophil infiltration in joints by inducing IL-8 production by fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*, 15: R187.
- Taganov, K. D., Boldin, M. P., Chang, K.-J. ja Baltimore, D. (2006). NF-κB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103: 12481–12486.
- Tang, Y., Luo, X., Cui, H., ... Shen, N. (2009). MicroRNA-146a Contributes to Abnormal Activation of the Type I Interferon Pathway in Human Lupus by Targeting the Key Signaling Proteins. *Arthritis Rheum*, 60: 1065–1075.

Urgard, E., Lorents, A., Klaas, M., ... Rebane, A. (2016). Pre-administration of PepFect6-microRNA-146a nanocomplexes inhibits inflammatory responses in keratinocytes and in a mouse model of irritant contact dermatitis. *J Control Release*, 235: 195–204.

Watt, F. M. (1989). Terminal differentiation of epidermal keratinocytes. *Curr Opin Cell Biol*, 1: 1107–1115.

Wei, T., Xu, N., Meisgen, F., Stähle, M., Sonkoly, E. ja Pivarsci, A. (2013). Interleukin-8 is regulated by miR-203 at the posttranscriptional level in primary human keratinocytes. *Eur J Dermatol*, DOI: 10.1684/ejd.2013.1997.

Weidinger, S., Willis-Owen, S. A. G., Kamatani, Y., ... Moffatt, M. F. (2013). A genome-wide association study of atopic dermatitis identifies loci with overlapping effects on asthma and psoriasis. *Hum Mol Genet*, 22: 4841–4856.

Viticchiè, G., Lena, A. M., Cianfarani, F., Odorisio, T., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Melino, G. ja Candi, E. (2012). MicroRNA-203 contributes to skin re-epithelialization. *Cell Death Dis*, 3: e435.

Xiao, H., Li, H., Yu, G., ... Xu, H. (2014). MicroRNA-10b promotes migration and invasion through KLF4 and HOXD10 in human bladder cancer. *Oncol Rep*, 31: 1832–1838.

Yi, R., Poy, M. N., Stoffel, M. ja Fuchs, E. (2008). A skin microRNA promotes differentiation by repressing 'stemness'. *Nature*, 452: 225-229.

Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G. ja Cullen, B. R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev*, 17: 3011–3016.

## **Kasutatud veebiaadressid**

1. mikro-RNA-de arv inimese genoomis, miRBase andmebaas, külastatud 24.05.17, <http://www.mirbase.org/cgi-bin/browse.pl?org=hsa>
2. miR-146a asukoht genoomis, miRBase andmebaas, külastatud 24.05.17, [http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna\\_summary.pl?org=hsa](http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_summary.pl?org=hsa)
3. miR-146a järjestus, miRBase andmebaas, külastatud 24.05.17, [http://www.mirbase.org/cgi-bin/get\\_seq.pl?acc=MIMAT0000449](http://www.mirbase.org/cgi-bin/get_seq.pl?acc=MIMAT0000449)
4. miR-203 asukoht genoomis, miRBase andmebaas, külastatud 24.05.17, [http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna\\_summary.pl?org=hsa](http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_summary.pl?org=hsa)
5. miR-203 järjestus, miRBase andmebaas, külastatud 24.05.17, [http://www.mirbase.org/cgi-bin/get\\_seq.pl?acc=MIMAT0000264](http://www.mirbase.org/cgi-bin/get_seq.pl?acc=MIMAT0000264)



## LIHTLITSENTS

Mina, Merit Müür (sünnikuupäev: 18. juuli 1995)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose  
„MiR-146a reguleerib epidermise-spetsiifilise miR-203 taset keratinotsüütides“,  
mille juhendajad on Helen Hermann, Ana Rebane ning Martin Pook,
  - 1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
  - 1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 29.05.2017