

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

MEDITSIINITEADUSTE VALDKOND
BIO- JA SIIRDEMEDITSIINI INSTITUUT
RNA BIOLOOGIA UURIMISGRUPP

***TSLP* transkriptide ekspressiooni indutseerimine ja tuvastamine inimese primaarsete
keratinotsüütide koekultuuris**

Bakalaureusetöö
12 EAP
Georg-Kennet Gutman

Juhendajad PhD Martin Pook
MSc Karl Jürgenstein

TARTU 2022

***TSLP* transkriptide ekspressiooni indutseerimine ja tuvastamine inimese primaarsete keratinotsüütide koekultuuris**

Atoopiline dermatiit (AD) on krooniline põletikuline nahahaigus, mida iseloomustab krooniline Th2 tüüpi põletikuseisund. Tüümuse stromaalne lümfoepoetiin (*TSLP*) on tsütokiin, mis on kõrgelt ekspresseeritud AD patsientide keratinotsüütides ja on oluline Th2 tüüpi põletikuvastuse indutseerija. *TSLP* ekspressiooni reguleerimine võib osutada allergiliste põletikuliste haiguste nagu astma ja AD ravis oluliseks sihtmärgiks. Antud bakalaureusetöö eesmärgiks oli võrrelda *TSLP* transkriptide ekspressiooni tolmuhest ekstrakti, ADga seotud tsütokiinide (*IL-4*, *IL-13*, *TNFα*), dsRNA viiruste analoogi (poly I:C) ja vitamiin D analoogi (kaltsipotriooli) poolt esile kutsutud rakuvastustes ning hinnata kaltsipotriooli eeltötluse mõju poly I:C põhjustatud rakuvastuse tekkel. Käesoleva bakalaureusetöö tulemusena selgus, et kaltsipotriooli eeltötlus võib moduleerida *TSLP* pika isovormi ekspressiooni ja takistada vastava valgu tootmist.

Märksõnad: atoopiline dermatiit, tüümuse stromaalne lümfoepoetiin, põletik, D-vitamiin

CERCS: B500 Immunoloogia, seroloogia, transplantoloogia

Induction and detection of *TSLP* transcripts expressed in human primary keratinocyte cell culture

Atopic dermatitis (AD) is a chronic inflammatory skin disease characterized by a chronic Th2-type inflammation. Thymic stromal lymphopoietin (*TSLP*) is a cytokine that is highly expressed in keratinocytes of patients with AD and is known as an important inducer of Th2-type inflammatory response. Regulation of *TSLP* expression may be an important target in the treatment of allergic inflammatory diseases such as asthma and AD. The aim of this bachelor's thesis was to evaluate the effect of house dust mite extract, AD-associated cytokines (*IL-4*, *IL-13*, *TNFα*), dsRNA virus analog (poly I:C) and vitamin D analog (calcipotriol) induced cell responses on the expression of *TSLP* transcripts and to evaluate the effect of calcipotriol pre-treatment on poly I:C mediated cellular response. As a result of this bachelor's thesis, it was found that vitamin D analogue calcipotriol pre-treatment may modulate the expression of the long isoform of *TSLP* and inhibit the production of the corresponding protein.

Keywords: atopic dermatitis, thymic stromal lymphopoietin, inflammation, vitamin D

CERCS: B500 Immunology, serology, transplatation

SISUKORD

SISUKORD.....	3
SISSEJUHATUS	7
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	8
1.1. Nahk	8
1.2. Atoopiline dermatiit.....	10
1.2.1. Vitamiin D roll põletikumehhanismide reguleerimises atoopilise dermatiidi esinemisel	11
1.3. Tuumuse stromaalne lümfoepoetiin	13
1.3.1. <i>TSLP</i> transkriptide isovormid	16
1.3.2. <i>TSLP</i> roll atoopilises dermatiidis	18
1.3.2.1. <i>TNFα</i> , <i>IL-4</i> ja <i>IL-13</i> roll põletikuvastuses ja seos <i>TSLP</i> ekspressiooniga	19
1.3.2.2. <i>TSLP</i> ekspressioon viiruste põhjustatud põletikus.....	20
1.3.2.3. <i>TSLP</i> ekspressioon tolmuhesta indutseeritud allergilises põletikus	21
1.3.2.4. Vitamiin D ja selle analoogide roll <i>TSLP</i> regulatsioonis.....	21
2. EKSPERIMENTAALOSA.....	23
2.1. Töö eesmärgid.....	23
2.2. Materjal ja meetodika.....	23
2.2.1. Inimese primaarsete keratinotsüütide kasvatamine ja paljundamine	23
2.2.2. <i>TSLP</i> ekspressiooni indutseerimine inimese primaarsete keratinotsüütide koekultuuris.....	24
2.2.3. <i>TSLP</i> ekspressiooni indutseerimine MC903 ja poly I:C eeltötlusega	24
2.2.6. Valgu hulga detekteerimine ELISA meetodil.....	28
2.2.7. Statistiline analüüs	28
2.3. Tulemused.....	28
2.3.1. <i>IL-4</i> + <i>IL-13</i> + <i>TNFα</i> , <i>IL-4</i> + HDM, poly I:C ja kaltsipotriooli mõju <i>TSLP</i> ekspressioonile inimese primaarsete keratinotsüütide koekultuuris	28
2.3.2. Kaltsipotriooli eeltötluse mõju <i>lTSLP</i> ja <i>sTSLP</i> ekspressioonitasemete muutustele poly I:C poolt esile kutsutud varase rakuvastuse tekkel inimese primaarsete keratinotsüütide koekultuuris	33
2.3.3. Kaltsipotriooli eeltötluse mõju põletikku soodustavate tsütokiinide <i>IL8</i> , <i>CCL5</i> ja <i>CXCL10</i> ekspressioonitasemete muutustele poly I:C poolt esile kutsutud varase rakuvastuse tekkel inimese primaarsete keratinotsüütide koekultuuris	36
2.4. Arutelu	37
KOKKUVÕTE	41
TÄNUAVALDUSED	43

KASUTATUD KIRJANDUS	44
LISAD	51
LIHTLITSENTS.....	54

KASUTATUD LÜHENDID

5'UTR	5' mittetransleeriv regioon (ingl <i>5' untranslated region</i>)
AMP	antimikroobne peptiid (ingl <i>antimicrobial peptide</i>)
APC	antigeeni presenteerivad rakud (ingl <i>antigen presenting cells</i>)
cDNA	komplementaarne DNA
CFU	kolooniat moodustav üksus (ingl <i>colony-forming unit</i>)
DBD	DNA-d siduv domeen (ingl <i>DNA-binding domain</i>)
DMSO	dimetüülsulfoksiid
dsRNA	kaheaahelaline RNA (ingl <i>double-stranded RNA</i>)
FLG	filagriin
HDM	kodutolmulest (ingl <i>house dust mite</i>)
HRV	inimese rinoviirus
IgE	immuunoglobuliin E
IgG	immunoglobuliin G
IgM	immunoglobuliin M
IL	interleukiin
<i>IL-4R</i>	interleukiin-4 retseptor
<i>IL-7Rα</i>	interleukiin-7 retseptori α -ahel
INF	interferoon
JAK	Janus kinaas (ingl <i>Janus kinase</i>)
LBD	ligandi siduv domeen (ingl <i>ligand-binding domain</i>)
lftSLP	pikk <i>TSLP</i> (ingl <i>long-form TSLP</i>)
LPS	lipopolüsahhariid
MHC-II	peamine koesobivuskompleks II (ingl <i>major histocompatibility complex II</i>)
NF- κ B	tuumafaktor κ B (ingl <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>)
NK-rakud	loomulikud tapjarakud (ingl <i>natural killer cells</i>)
NLRP3	NLR perekonna püridiinidomeen 3 (ingl <i>NLR family pyrin domain containing 3</i>)
PBS	fosfaat-puhverdatud saliin (ingl <i>phosphate-buffered saline</i>)
PI-3	fosfoinosiid-3-kinaas (ingl <i>phosphoinositide 3-kinase</i>)

Poly I:C	polüinosiin-polütsütidüülhape (ingl <i>polyinosinic: polycytidylic acid</i>)
RSV	respiratoor-süntsütiaalne viirus
RV	rinoviirus
RXR	retinoid X retseptor
sfTSLP	lühike <i>TSLP</i> (ingl <i>short-form TSLP</i>)
STAT	signaali transduktsiooni ja transkriptsiooni aktivaator (ingl <i>signal transducer and activator of transcription</i>)
Th	abistaja rakk (ingl <i>T-helper</i>)
TNF	tuumori nekroosifaktor (ingl <i>tumor necrosis factor</i>)
TLR	tolli-laadne retseptor (ingl <i>toll-like receptor</i>)
TSLP	tüümuse stromaalne lümfopoetiin (ingl <i>thymic stromal lymphopoietin</i>)
TSLPR	tüümuse stromaalse lümfopoetiini retseptor
VDR	vitamiin D retseptor
γ -CR	tavalise gamma-ahela retseptor (ingl <i>common gamma chain receptor</i>)

SISSEJUHATUS

Atoopiline dermatiit on maailmas enimlevinud krooniline retsidiveeruv nahahaigus, mis esineb kuni 20% lastel ja noortel üle maailma (Kowalska-Olędzka *et al.*, 2019). Atoopilist dermatiiti iseloomustab naha sügelus, iseloomulik kuiv ja kare nahk ning põletikulised, punetavad ja ketendavad või märguvad laigud nahal (Kõivist, 2015). Atoopilise dermatiidi tekkepõhjused ei ole täielikult teada, haiguse kulgu võivad mõjutada geneetiline eelsoodumus, keskkonnatingimused, häiritud nahabarjäär ja muutused immuunsüsteemis (Egawa & Kabashima, 2016). Atoopilise dermatiidi patsientidel on iseloomulik krooniline Th2 tüüpi põletikuseisund, kõrgeenenud seerumi IgE ja eosinofiilide tase (Leung *et al.*, 2004).

Tüümuse stromaalne lümfoepoetiin on tsütokiin, mille üheks funktsiooniks on aktiveerida CD4⁺ T-rakke ja indutseerida Th2 tüüpi põletiku teket (Al-Shami *et al.*, 2005). Tüümuse stromaalne lümfoepoetiin on kõrgelt ekspresseeritud atoopilise dermatiidi patsientide keratinotsüütides ja ta mängib olulist rolli dendriitraku-vahendatud allergilise põletikuvastuse algatamisel (Soumelis *et al.*, 2002). Varasemates uuringutes on näidatud, et inimeses leidub kaks tüümuse stromaalse lümfoepoetiini isovormi (Harada *et al.*, 2009), millest ühe isovormi (*long-form TSLP*) funktsiooniks on indutseerida põletikuvastust ja teise isovormi (*short-form TSLP*) funktsiooniks arvatakse olevat homöostaasi tagamine (Dong *et al.*, 2016; Salvati *et al.*, 2021).

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärk on uurida, millised tüümuse stromaalse lümfoepoetiini transkriptid on ekspresseeritud tolmulesta ekstrakti, atoopilist dermatiiti jälgendavate tsütokiinide (*IL-4*, *IL-13*, *TNF α*), dsRNA viiruste analoogi (poly I:C) ja vitamiin D analoogi (kaltsipotriool) poolt esile kutsutud rakuvastustes ning hinnata kaltsipotriooli eeltöötamise mõju poly I:C põhjustatud rakuvastuse tekkel.

Käesolev töö on valminud bioloogia ja elustiku kaitse õppekava raames. Uurimistöö eksperimentaalsed katsed viidi läbi Tartu Ülikooli meditsiiniteaduste valdkonnas, bio- ja siirdemeditsiini instituudis, RNA bioloogia uurimisgrupis.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Nahk

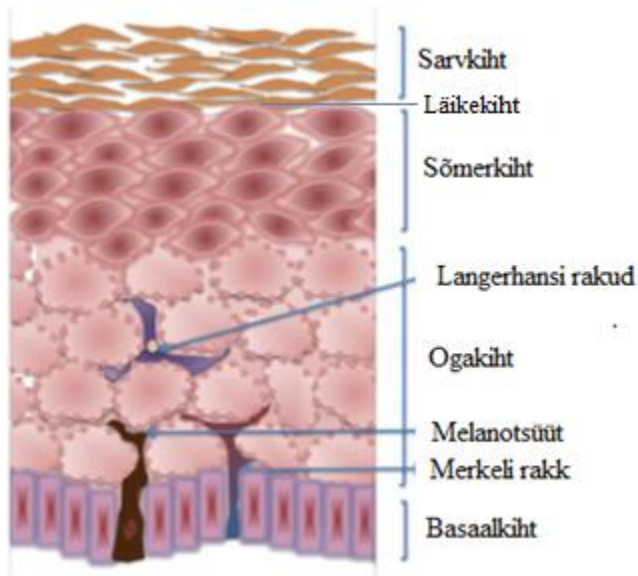
Nahk on esmane kaitsebarjäär inimese ja väliskeskkonna vahel, hoides ära patogeenide sattumist organismi ning takistades kemikaalide ja füüsiliste rünnakute mõju organismile (Proksch *et al.*, 2008). Nahk koosneb kolmest suure kihist: epidermis (marrasknahk), dermis (pärisnahk) ja hüpodermis ehk subkuut (alusnahk) (Rushmer *et al.*, 1966).

Epidermis ehk marrasknahk (Joonis 1) on naha välimine kiht, mis koosneb viiest kihist: sarvkiht (*stratum corneum*), läikekiht (*stratum lucidum*), sõmerkiht (*stratum granulosum*), ogakiht (*stratum spinosum*) ja basaalkiht (*stratum basale*) (Mesila *et al.*, 2012).

Sarvkiht on epidermise pindmine kiht, mis koosneb keratiinist ja surnud tuumadeta keratinotsüütidest. Sarvkiht on 20–30 raku paksune ja oluline abi immuunsussüsteemi esmasel võitlusel väliste patogeenidega (Menon *et al.*, 2012). Sarvkihi kaitsebarjääri normaalseks toimimiseks on vajalik valk filagriin, mis seob keratiini kiudusid (Ovaere *et al.*, 2009). Läikekiht on õhukene 2–3 raku paksune kiht, mis toodab eleidiini, andes sarvkihile tema keratiinse struktuuri ja tugevuse. Sõmerkiht koosneb 3–5 rakukihist ja sisaldab endas teemantkujulisi rakke, mis toodavad keratohüaliini. Keratohüaliin moodustab granuloosseid struktuure, mis kanduvad sarvkihi pinnale, andes sarvkihile kaitsva ja tugeva struktuuri. Ogakihi moodustavad korrapäratud hulktahksed rakud, mis seovad epidermist läbi desosoomide. Ogakihis paiknevad ka dendriitrakud. (Yousef *et al.*, 2020)

Peamised ogakihi dendriitrakud on Langerhansi rakud, mis on kõrgelt spetsialiseerunud antigeeni presenteerivad rakud (APC, ingl *antigen presenting cells*), aktiveeritud Langerhansi rakud ekspresseerivad peamise koesobivuskompleks klass II (MHC-II, ingl *major histocompatibility complex II*) molekule ja migreeruvad lümfisõlmedesse, kus nad toodavad kemokiine ja interakteeruvad T-rakkudega (Ginhoux *et al.*, 2006). Kuna Langerhansi rakud on migreeruvad, võib neid leida ka teistest rakukihtidest. Basaalkiht on epidermise kõige sügavam kiht. Basaalkiht koosneb peamiselt basaalsetest keratinotsüütidest, mis diferentseeruvad epidermise erinevateks rakkudeks. Basaalkihist võib leida Langerhansi rakke, melanotsüüte, mis toodavad melaniini, tagades naha pigmendi, ja Merkeli rakke. Merkeli rakud on seotud

närvilõpmetega ja funktsioneerivad komperetseptoritena. (Boulais & Misery, 2007; J. Xie *et al.*, 2019)



Joonis 1. Epidermise struktuur. Epidermise välimine kiht, sarvkiht, koosneb surnud keratinotsüütidest. Läikekihis asuvad tuumadeta sarvestunud rakud. Sõmerkihis paiknevad keratiiniga täitunud keratinotsüüdid. Ogakihis paiknevad dendriitrakud ja diferentseeruvad keratinotsüüdid. Basaalkiht on epidermise sisemine kiht ja koosneb diferentseerumata keratinotsüütidest, tüvirakkudest, Langerhansi ja Merkle'i rakkudest, melanotsüütidest ning dendriitrakkudest. Modifitseeritud ja tõlgitud Honari, 2017 järgi.

Dermis ehk pärisnahk on elastne rakukiht, mis tagab nahale toitaineid ja epidermisele mehaanilise toe (Daly, 1982). Dermise ülesehitus on kiuline, koosnedes kollageeni kiududest ja elastsest koest, kiuliste struktuuride vahel paiknevad erinevad glükoosaminoglükaanid nagu hüaluuronhape, proteoglükaanid ja glükoproteiinid (Green *et al.*, 2014). Dermises paiknevad veresooned, higi- ja rasunäärmed, karva folliikulid ja närvilõpmed (*Structure of the Skin: Dermis*, 2020).

Hüpodermis ehk subkuut on naha sügavaim kiht. See koosneb rasvkoest, mis kinnitab naha luude ja lihaste külge. Hüpodermises asuvad sensoorsed neuronid, veresooned ja saavad alguse karva folliikulid. (Yousef *et al.*, 2020)

Nahk toimib esmase kaitsemehhanismina organismis, tagades barjääri kiirguse, mikroorganismide, toksiinide ja allergeenide vastu. Häired naha kaitsemehhanismis võivad viia krooniliste põletikuliste haigusteni ja üldise elukvaliteedi languseni. (Yousef *et al.*, 2020)

1.2. Atoopiline dermatiit

Atoopiline dermatiit (AD) on krooniline nahapõletik, mida iseloomustab tugev naha sügelus, kuivus, punetus ja naha ketendus. Atoopilist dermatiiti esineb kuni 20% lastel ja kuni 3% täiskasvanutel ülemaailmselt (Nutten, 2015). 85% patsientidel kujunevad sümptomid välja enne viiendat eluaastat. Atoopilise dermatiidi patogenees ei ole tänapäeval täielikult teada. (Ibrahim *et al.*, 2020)

Atoopiline dermatiit on heterogeenne haigus, mis teeb selle ravimise keeruliseks (Bieber *et al.*, 2017). Haiguse kulgu mõjutavad erinevad faktorid nagu geneetiline eelsoodumus, keskkonnatingimused, häiritud naha barjäär ja muutused immuunsussüsteemis (Egawa & Kabashima, 2016).

Funktsionaalne naha barjäär mängib olulist rolli atoopilise dermatiidi väljakujunemisel. Esimeseks indikaatoriks nahabarjääri kaitseomaduste halvenemisel on suurenenud transepidermaalne veekadu ja vähenenud veesidumisvõime (Esche *et al.*, 2004). „*Loss-of-function*” mutatsioonid filagriini (FLG) geenis tõstavad atoopilise dermatiidi kujunemise riski. Mutatsioonid proteaase kodeerivates geenides viivad vähese pro-FLG lõikamiseni, mis põhjustab naha paksenemist ja kuivust. FLG laguproduktid urokaanhape ja püroglutamiinhape on peamised sarvkihi naturaalsed niisutusfaktorid (ingl *natural moisturizing factors*), mille esinemine atoopilise dermatiidi patsientide sarvkihis, võrreldes terve patsiendi sarvkihiga, on vähenenud. (Matsui *et al.*, 2011; Simon & Kernland Lang, 2011)

Kaasasündinud immuunsüsteemi vastus epiteelkoos mängib kriitilist rolli kuidas ja millal reageeritakse kommensaalsete ning patogeensete mikroobide vastu. Häired immuunsüsteemi vastuses võivad viia ebapiisava või püsiva põletikulise seisundini organismis. Atoopilise dermatiidi patsientidel on kõrgeenenud immuunoglobuliin E (IgE) tase ning Th2-tüüpi (ingl *type 2 T-helper*) tsütokiinide (nt interleukiin (*IL*)-4, *IL*-5, *IL*-13, tuumori nekroosi faktor α (*TNF α*)). Tuumuse stromaalne lümfoepoetiin (*TSLP*) aktiveerib dendriittrakke ja indutseerib naiivseid CD4⁺ T-rakke tootma Th2-tüüpi tsütokiine. Erinevalt paljudest teistest

dendriitrakkude aktivaatoritest nagu CD40L ja LPS, mis värbavad Th1 rakke, indutseerib *TSLP*-seoseline dendriitrakkude aktivatsioon Th2 rakkude värbamist. Th2 rakud indutseerivad tugevat antikehade tootmist, eosinofiilide aktivatsiooni ja põletikulist seisundit. (Esche *et al.*, 2004, Kuo *et al.*, 2013)

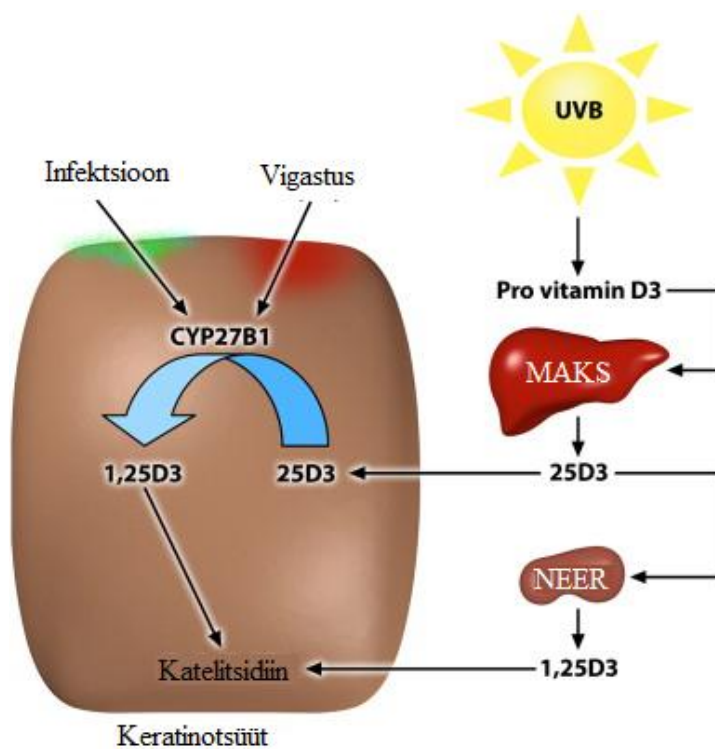
1.2.1. Vitamiin D roll põletikumehhanismide reguleerimises atoopilise dermatiidi esinemisel

D-vitamiinid on grupp rasvlahustuvaid steroidhormoone, mille üheks ülesandeks on tagada organismi kaltsiumi homöostaas (Holick, 2003). D-vitamiinide vaegus suurendab organismi krooniliste põletikuliste haiguste riski (Li *et al.*, 2019). D-vitamiin esineb toidus kahes vormis: vitamiin D₂ (ergokaltsiferool) ja vitamiin D₃ (kolekaltsiferool). Mõlemad vormid läbivad kahes etapis hüdroksüülimise, et saavutada metaboolne vorm kaltsitriool ([1 α ,25-(OH)₂D₃]). Esimene hüdroksüülimine toimub maksas, kus 25-hüdroksülaas konverteerib D-vitamiini kaltsidiooniks ([25(OH)D]). Teine etapp toimub peamiselt neerudes, kus hüdroksüülitakse kaltsidioon kaltsitriooliks. (Kim *et al.*, 2020)

Kaltsitriooli toimemehhanism avaldub läbi ligandse seondumise. Vitamiin D retseptor (VDR) koosneb kahest domeenist – N-terminaalne DNAd siduv domeen (DBD) ja C-terminaalne ligandi siduv domeen (LBD). Kaltsitriooli kõrge afiinsusega seondumine LBDle indutseerib VDRi ja retinoid X retseptori (RXR) heterodimerisatsiooni. Tekkinud VDR-RXR dimeerne kompleks seondub spetsiifilistele DNA järjestustele, mida kutsutakse D-vitamiini vastuselementideks (ingl *vitamin D responsive elements*). D-vitamiini vastuselemendid asuvad kaltsitrioolile reageerivate geenide promootorpiirkonnas. Sõltuvalt geenist, millele VDR-RXR kompleks seondub, indutseeritakse või repressseeritakse antud geeni RNA polümeraas II vahendatud transkriptsiooni. (Baeke *et al.*, 2010)

Kaltsitriooli seondumisel vitamiin D retseptorile aktiveeritakse signaalrajad, mis reguleerivad immuunrakkudes D-vitamiinseoselisi geene ja samas pärsitakse transkriptsioonifaktori NF- κ B (tuumafaktor κ B, ingl *nuclear factor kappa B*) signaalrada, mis kontrollib DNA transkriptsiooni ja tsütokiinide tootmist. Kolekaltsiferool inhibeerib makrofaagides ja T-rakkudes NLRP3-inflammasoomi aktivatsiooni läbi NF- κ B signaalraja takistamise, mis viib põletikuvastase mediaatori *IL-1 β* vähenenud tasemeni. Keratinotsüütides inhibeerib kolekaltsiferool NLRP1-inflammasoomi aktivatsiooni. (Kim *et al.*, 2020; Nakajo *et al.*, 2021)

Antimikroobset peptiidi katelitsidiini ekspresseeritakse organismis bakteriaalsete nakkuste ja nahabarjääri katkemise korral. D-vitamiin indutseerib katelitsidiini ekspressiooni keratinotsüütides, neutrofiilides ja muudes rakutüüpides. Kui peamiselt hüdroksüülitakse kaltsitriool neerudes, siis keratinotsüüdid on võimelised ekspresseerima 1 α -hüdroksülaasi (CYP27B1), mis viib läbi nahas kaltsidiooli hüdroksüülimise, bioloogiliselt aktiivse D-vitamiini vormi, kaltsitriooliks. CYP27B1 ekspressiooni reguleerib TLR2 (ingl *toll-like receptor 2*) signaalrada. Naha vigastuse või bakteriaalse infektsiooni korral käivitub CYP27B1 ekspressioon (Joonis 2), mille otsesel mõjul aktiveeritakse vitamiin D₃, et indutseerida katelitsidiini tootmine. (Schauber & Gallo, 2008)



Joonis 2. Katelitsidiini ekspressioon keratinotsüütides läbi vitamiin D₃ aktivatsiooni. Vitamiin D₃ aktiveeritakse hüdroksüülimise teel kahe etapina maksas ja neerudes. Samuti on naha vigastuse või infektsiooni korral keratinotsüüdid võimelised ekspresseerima CYP27B1, mis aktiveerib 1 α ,25-(OH)₂D₃. Aktiveeritud vitamiin D₃ indutseerib katelitsidiini tootmise. Modifitseeritud ja tõlgitud Schaubert & Gallo, 2008 järgi.

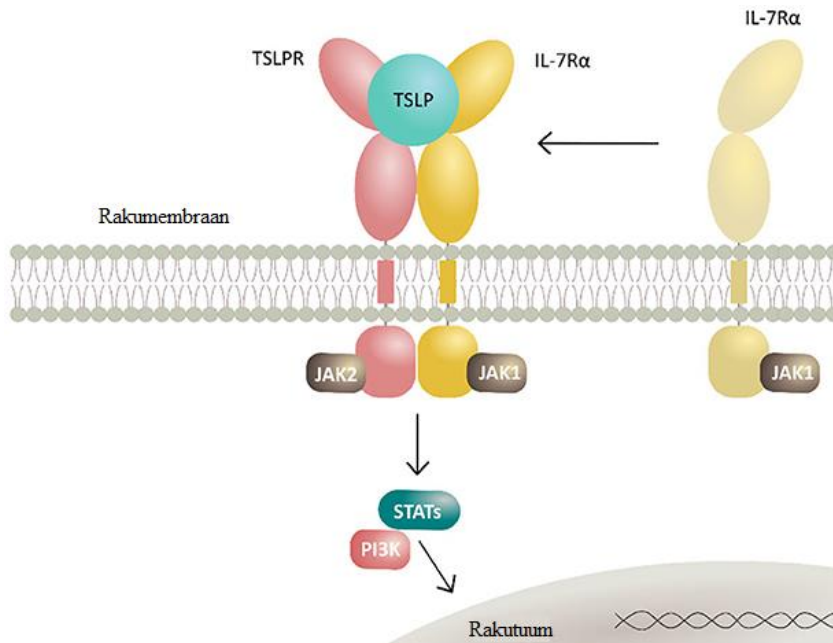
Paljudel immuunrakkudel on vitamiin D retseptorid (aktiveeritud CD4⁺ ja CD8⁺ T-rakud, B-rakud, neutrofiilid ja APCd nagu makrofaagid ja dendriitrakud). VDRi ekspressiooni

immuunrakkudel kontrollivad erinevad immuunsignaalid. Kalsitriool on oluliseks mediaatoriks nii kaasasündinud kui ka omandatud immuunsüsteemi vastusel. Kalsitriool suurendab kemotaktiliste ja fagotsüütiliste protsesside avaldumist makrofaagides ja erinevate AMPide tootmist. Omandatud immuunvastuse juures inhibeerib kalsitriool MHC-II molekulide ja kostimulaatorite ekspressiooni antigeeni presenteerivates rakkudes. Kalsitriool inhibeerib tsütokiinide IL-12 ja IL-23 tootmist, mis soodustab Th2 fenotüübiga rakkude teket. Kalsitriool blokeerib ka plasmarakkude diferentseerumist, IgG ja IgM tootmist ja B-rakkude prolifereerumist. (Baeke *et al.*, 2010)

1.3. Tuumuse stromaalne lümfoepoetiin

Tuumuse stromaalne lümfoepoetiin on IL-7 sarnane tsütokiin, mis avastati hiire tuumuse stromaalse rakuliini sekreedist (Friend *et al.*, 1994). 2001. aastal avastati inimese *TSLP* homoloog *in silico*, mille aminohappeline sarnasus oli 43% võrreldes hiire *TSLP*ga aga omas sarnast bioloogilist funktsiooni (Reche *et al.*, 2001). Üks *TSLP* peamisi funktsioone on aktiveerida immuunsüsteemi B- ja dendriittrakke. *TSLP*d toodetakse peamiselt erinevates epiteeli rakkudes, keratinotsüütides nahas, soolestikus ja kopsudes. *TSLP* düsreguleeritud ekspresseerumist on seostatud atoopiliste haiguste nagu atoopiline dermatiit ja astma tekkega. Samuti mängib *TSLP* rolli leukeemia ja reumatoidse liigesepõletiku kujunemisel (Tasian *et al.*, 2012, Tsilingiri *et al.*, 2017).

TSLP annab signaali rakule läbi heterodimeerse retseptori kompleksi, mis koosneb interleukiin-7 retseptori α -ahelast (IL-7R α) ja *TSLP* retseptorist (TSLPR) (Pandey *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2000). *TSLP* seondub *TSLP* retseptorile kõrge afiinsusega, IL-7R α aga *TSLP* retseptorile iseseisvalt ei seonu (Marković & Savvides, 2020). Kui *TSLP* on seondunud *TSLP* retseptoriga ja moodustunud on *TSLP*/TSLPR kompleks, võib antud kompleks seonduda IL-7R α ga, tekkinud moodustis on signaaliülekanne eeltingimuseks (Verstraete *et al.*, 2014, 2017). TSLPR/IL-7R α retseptorahelate dimerisatsioon *TSLP*ga seandumisel aktiveerib JAK/STAT ja PI-3 kinaasi signaali ülekanderajad ja indutseerib sihtmärkgeenide ekspressiooni (Joonis 3) (Isaksen *et al.*, 1999; Marković & Savvides, 2020). Funktsionaalne TSLPR on avaldunud peamiselt hematopoeetilistes rakkudes (dendriitrakud, T-rakud, B-rakud, NK (ingl *natural killer*) rakud, monotsüüdid, basofiilid, nuumrakud ja eosinofiilid) (Cianferoni & Spergel, 2014).



Joonis 3. TSLP-vahendatud signaalraja aktivatsioon. TSLP seondumisel TSLP retseptoriga, värvatakse IL-7Rα ja moodustub kolmekomponendine kompleks, mis aktiveerib JAK/STAT ja PI-3 kinaasi signaalrajad ning indutseeritakse sihtmärkgeenide transkriptsioon. Modifitseeritud ja tõlgitud Marković & Savvides, 2020 järgi.

Allergilise põletiku põhjustajaks võib olla Th2 rakkude reguleerimata tsütokiinide tootmine. Dendriitrakud mängivad olulist rolli efektor-T-rakkude vastuse suunamisel ja seeläbi mõjutavad immuunvastust. Dendriitrakkude suutlikus mõjutada Th1 või Th2 rakkude vastust kujuneb välja dendriitraku mitteküpses staadiumis. TSLP aktiveerib tugevalt dendriitrakke, et kutsuda esile proallergilist CD4⁺ ja CD8⁺ T-rakkude vastust. Nagu kõik teised stiimulid (nt CD40L, polüinosiin-polütsütidüülhape (poly I:C)), mis aktiveerivad küpsed dendriitrakke, reguleerib TSLP dendriitrakkude peamise koesobivuskompleksi klass II, CD54, CD80, CD86 ja DC-LAMP ekspressiooni. Erinevalt CD40L ja TLR ligandidest, ei pane TSLP dendriitrakke tootma põletikku soodustavaid tsütokiine *TNFα*, *IL-1β* ja *IL-6*. TSLP mõjutab dendriitrakke tootma kemokiine *IL-8* ja *CCL24*, mis meelitavad ligi neutrofiile ja eosinofiile. TSLP võimetus indutseerida Th1-polariseerivaid tsütokiine dendriitrakkudes on oluline omadus loomaks Th2 soodustavat mikrokeskkonda. (Liu *et al.*, 2007)

TSLP mõjutab ka basofiilide immuunvastuseid, mis viitab sellele, et lisaks tsütokiinide ekspressiooni mõjutamisele dendriitrakkudes, võivad TSLP Th2 rakkude soodustavad

omadused olla osaliselt vahendatud basofiilide kaudu. Basofiilid indutseerivad *IL-4* tootmist antigeen-spetsiifilistes CD4⁺ T-rakkudes ja püüavad immunoglobuliin E (IgE) komplekse, mis stimuleerib Th2 tsütokiinide tootmist IgE-vahendatud põletikureaktsioonis. (Ziegler & Artis, 2010)

Kõik need *TSLP* omadused näitavad, et läbi dendriitrakkude, granulotsüütide ja CD4⁺ T-rakkude, on *TSLP* suuteline soodustama Th2 rakkude diferentseerumist ja Th2 tsütokiinide-seoselist põletikuvastust.

TSLP on peamiselt ekspresseeritud naha, soolestiku ja kopsude barjääre moodustavates epiteeli rakkudes. Seepärast nakkustekitajad ja nende toodetud produktid nagu hingamisteede viirused, bakteriaalne peptidoglükaan, dsRNA, allergeenid ja trauma indutseerivad *TSLP* ekspressiooni kokkupuutunud koes. Kuigi *TSLP* ekspressiooni molekulaarsed mehhanismid ei ole tänapäeval täiesti selged, on näidatud *TSLP* transkriptsiooni sõltuvust tuumafaktori aktiivsetest T-rakkudest ja tuumafaktorist κ B hiiremudelil. (Cianferoni & Spergel, 2014)

NF- κ B aktivatsiooni aktiveerib põletikuline tsütokiin TNF α (Redhu *et al.*, 2011). *TSLP* ekspressioon on tugevalt seotud tolli-laadsete retsptoritega (TLR) (ingl *toll-like receptors*) – TLR2 agonistid ja TLR3 agonist poly I:C reguleerivad *TSLP* ekspressiooni üles (Allakhverdi *et al.*, 2007). Netheroni sündroomi mudelis on näidatud ka *TSLP* ekspressiooni indutseerimist läbi proteaas-aktiveeritud retseptor 2e. Netheroni sündroomi korral on sarvkihis tugevalt ekspresseeritud kallikreiin-5, mis aktiveerib proteaas-aktiveeritud retseptor 2e ja viib *TSLP* kõrgeks ekspressioonini. (Briot *et al.*, 2009)

TSLP ekspressiooni võivad mõjutada ka hormonaalsed ühendid. *TSLP* ekspressiooni reguleerivad ka erinevad nukleaarsed retseptorid nagu vitamiin D retseptor ja retinoid X retseptor. Seega mõjutavad *TSLP* ekspressiooni paljud erinevad endogeensed ja eksogeensed faktorid. (Li Mei *et al.*, 2006)

TSLP tagab paljudes kudedes homöostaasi ja põletikuvastast aktiivsust. *TSLP* regulatsioonihäired aga võivad põhjustada erinevaid patoloogilisi seisundeid. *TSLP* põletikku soodustav aktiivsus nahas ja kopsudes ning homöostaasi tagav aktiivsus soolestikus ja tüümuses viib paradoksini. (Tsilingiri *et al.*, 2017) 2009. aastal kirjeldas Harada *et al* kahte *TSLP* isovormi.

1.3.1. TSLP transkriptide isovormid

TSLP isovorme kirjeldati esimest korda inimese bronhi epiteelrakkudes. Sekveneerimise tulemusena on kirjeldatud kahte *TSLP* isovormi: lühike *TSLP* (*short-form TSLP*) ja pikk *TSLP* (*long-form TSLP*). Algselt arvati, et pika ja lühikese *TSLP* isovormi määrab erinevus pre-mRNA splaissimisel. Hiljemas uuringus avastati 2 erinevat 5'-mittetransleerivat regiooni (5'UTR) inimese genoomis, mis annab aluse kahele erinevale lugemisraamile *TSLP* translatsiooniks. (Harada *et al.*, 2009, 2011)

TSLP geen asub 5. kromosoomis. Lühike *TSLP* (*sfTSLP*) transkript koosneb 2353 aluspaarist ja on valku kodeeriv (NCBI, NM_138551.5). *SfTSLP* on *TSLP* domineeriv vorm. *SfTSLP* üheks peamiseks omaduseks on antimikroobne aktiivsus. Tugevate antimikroobsete omaduste tõttu esineb teda palju suu ja naha keratinotsüütides ja sülgjes. (Bjerkan *et al.*, 2015)

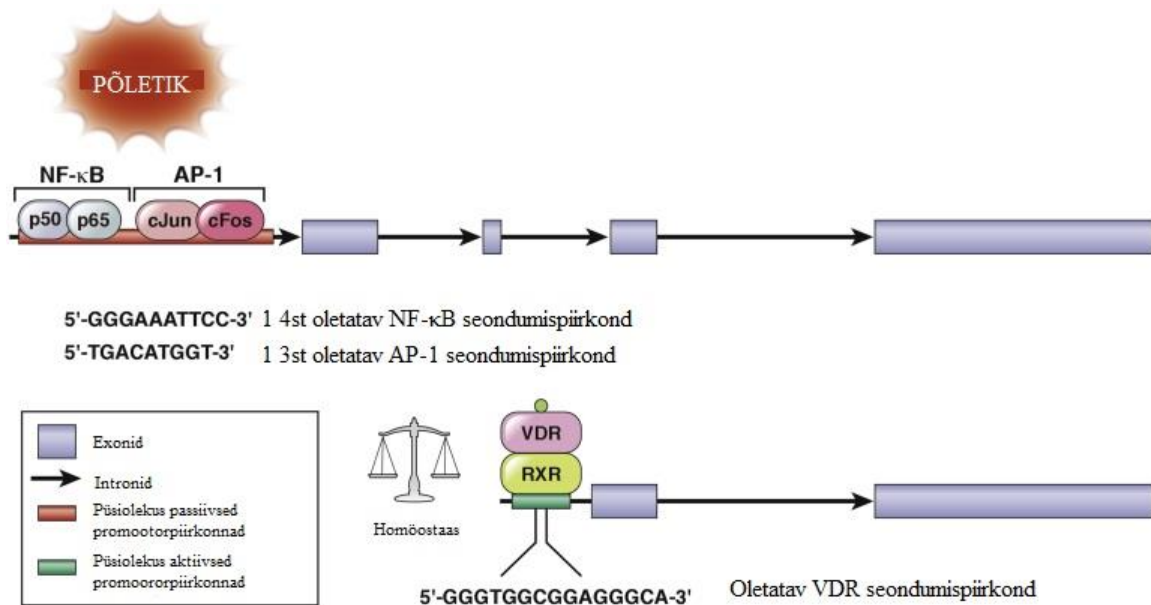
Bjerkan *et al* võrdles *sfTSLP* ja pika *TSLP* (*lfTSLP*) antimikroobset aktiivsust, kasutades erinevate bakterite ja seente (*S. mitis*, *E. coli*, *E. faecalis*, *B. cereus*, *S. epidermidis* ja *C. albicans*) paneeli. *SfTSLP* vähendas 24h kasvanud mikroobide CFU/ml (ingl *colony-forming units per ml*) tugevamini kui AMP LL-37, *lfTSLP* ei mõjutanud mikroobide kasvu üldse. Samuti indutseeris *lfTSLP* STAT5 signaali dendriitrakkudes, kuid poly I:C stimuleeritud CD1c⁺ dendriitrakkudes *sfTSLP* STAT5 aktivatsiooni ei mõjutanud. (Bjerkan *et al.*, 2015)

SfTSLP leevendab monotsüütidest pärinevate dendriitrakkude immuunvastust bakteriaalse infektsiooni korral (Fornasa *et al.*, 2015). Kui *lfTSLP* signaal on vahendatud läbi STAT5 fosforüülimise, siis *sfTSLP* põletikuvastane mõju monotsüütidest pärinevate dendriitrakkudele tuleneb p38 fosforüülimisest (Tsilingiri *et al.*, 2017). Kuna *sfTSLP* on seotud põletikumediaatori IFN- γ tootmise reguleerimisega, arvatakse, et muutused *sfTSLP* ekspressioonis võiksid teoreetiliselt mõjutada Th1 tüüpi põletikuvastust (Fornasa *et al.*, 2015).

LfTSLP koosneb 2610 aluspaarist ja on valku kodeeriv (NCBI, NM_033035.5). *LfTSLP* on oluline tsütokiin Th2 põletikuvastuse indutseerimisel. Erinevalt *sfTSLP*st esineb *lfTSLP*d bronhi epiteeli rakkudes ja keratinotsüütides normaalses olukorras väga vähe. *LfTSLP*d indutseerib tugevalt kaheahelaline RNA (dsRNA). (Harada *et al.*, 2009)

SfTSLP ja *lfTSLP* transkriptsioon saavad alguse erinevatest promootorpiirkondadest (Tsilingiri *et al.*, 2017) (Joonis 4), *lfTSLP* transkriptsioon on vahendatud läbi NF- κ B signaalraja (Cultrone

et al., 2013). Kuna varasemates uuringutes on näidatud, et *sfTSLP* on tugevalt ekspresseeritud VDRi agonistide poolt (Y. Xie et al., 2012) ja *in silico* uuringus tuvastati vitamiin D retseptori seondumispiirkond *sfTSLP* lugemisraami algusest, arvatakse, et *sfTSLP* transkriptsioon on vahendatud läbi vitamiin D retseptori (Tsilingiri et al., 2017).



Joonis 4. *lftTSLP* ja *sfTSLP* transkriptsioon saavad alguse erinevatelt promootoritelt. Erinevad transkriptsioonifaktorid seonduvad erinevatele promootoritele, et indutseerida *sfTSLP* või *lftTSLP* transkriptsiooni. Modifitseeritud ja tõlgitud Tsilingiri et al., 2017 järgi.

On teada, et *lftTSLP* seondub *TSLP* retseptorile, et indutseerida bronhi epiteeli rakkude proliferatsioon läbi STAT5 fosforüülimise (Dong et al., 2016). Hiljuti on näidatud, et *lftTSLP* soodustab keratinotsüütide proliferatsiooni samas kui *sfTSLP* seda ei tee ning *lftTSLP* on seotud karvanääpsu tüvirakuniis tekivate kiiresti jagunevate transiitrakkude proliferatsiooniga olles oluline faktor karva kasvamises (Shannon et al., 2022). TLR ligandid (poly I:C, FSL-1 ja flagelliin) indutseerivad *lftTSLP* ekspressiooni (Y. Xie et al., 2012).

lftTSLP mängib ka olulist rolli alarmiina, olles varajane initsiaator põletikukaskaadide algatamises astma patogeneesis. Kuigi *lftTSLP* ei kuulu ametlikult alarmiinide perekonda, omab ta sarnaseid funktsioone *IL-33*ga astma põletikuvastusel. (Salvati et al., 2021) *lftTSLP* võib indutseerida põletikuvastust läbi kaasasündinud ja omandatud immuunsüsteemi mehhanismide (Salvati et al., 2021). Inimese müeloidsed dendriitrakud ekspresseerivad

TSLPRi (Hanabuchi *et al.*, 2010) ja *TSLP* stimulatsioon reguleerib MHC-II ning erinevate kaasstimuleerivate molekulide (CD40, CD86, CD56, CD90, CD83 ja CD-LAMP) ekspressiooni (Liu, 2006). On huvitav, et dendriitrakud on võimelised omakorda ekspresseerima *lfTSLP*d patogeenidega kokkupuutel, mis viitab, et *TSLP* võib käituda autokriinselt, soodustades Th2 põletikuvastuse teket (Elder *et al.*, 2016; Kashyap *et al.*, 2011).

1.3.2. *TSLP* roll atoopilises dermatiidis

TSLP kõrgenenud ekspressiooni peetakse atoopilise dermatiidi arengus oluliseks patogeneetiliseks teguriks. Kui terve inimese kahjustamata nahal ei ole *TSLP* valk tuvastatav, siis ägeda ja kroonilise atoopilise dermatiidi kahjustunud nahas on *TSLP* kõrgelt ekspresseeritud. Samuti esineb korrelatsioon atoopilise dermatiidi raskusastme indeksi (SCORAD) ja *TSLP* ekspressiooni vahel. (Cianferoni & Spergel, 2014)

Allergeeniga kokkupuude allergia tekkimise algaasis, sensibiliseerumise staadiumis, on oluline nahas ekspresseeruva *TSLP* hulga suurenemiseks ja mõjutab kaudselt allergiaga seotud CD4⁺ T-rakkude aktiveerumist ning samas on teada, et selles protsessis ei ole oluline lümfisõlme rakkudes ekspresseeritav *TSLP*, vaid just nahas paiknev *TSLP* (Larson *et al.*, 2013). Tatsuno *et al* 2015. aasta uuringus mõõdeti *TSLP* retseptori ekspressiooni taset CD4⁺ T-rakkudel atoopilise dermatiidiga patsientidel. 51 uuritava patsiendi seast, kellel oli kõrgenenud CCL17/TARC tase seerumis, leiti kõrgenenud TSLPR ekspressioon CD4⁺ T-rakkudel (Tatsuno *et al.*, 2015). *CCL17/TARC* on oluline atoopilise dermatiidi biomarker (Kakinuma *et al.*, 2001). Samuti esineb korrelatsioon vere eosinofiilide hulga ja CD4⁺ T-rakkude *TSLP* retseptori ekspressiooni vahel (Tatsuno *et al.*, 2015). Tatsuno *et al* 2015. aasta uuringus raviti 2 nädala jooksul atoopilise dermatiidi patsiente suukaudse antihistamiini ja kortikosteroidsete salvidega. Ravi toimet vähenes ringlevate TSLPR+CD4⁺ T-rakkude hulk ja *CCL17/TARC* tase, näidates *TSLP* retseptori ekspressiooni mõju AD haiguse ägedusele (Tatsuno *et al.*, 2015). Atoopilise dermatiidiga patsientide kahjustunud nahas on kõrgenenud tsütokiinide *IL-1 β* , *TNF α* , *IL-4* ja *IL-13* tasemed, mis koosmõjul indutseerivad *TSLP* ekspressiooni keratinotsüütides (Bogiatzi *et al.*, 2007). *TSLP* kõrgenenud ekspressioon aga viib Th2 tüüpi põletikuseisundini, selline signaalradade ring võib omakorda tekitada kroonilise põletiku seisundi. Keratinotsüütide *TSLP* tootmine on võtmetähtsusega ajendamaks Th2 tüüpi põletikuvastust atoopilistes haigustes nagu AD, astma ja allergiline riniit. (Indra, 2013)

Fornasa *et al* 2015 aasta uuringus võrreldi *sTSLP* ja *lTSLP* ekspressiooni erinevust atoopilise dermatiidi nahas. Antud uuringus leiti, et AD patsientide lööbelises nahas oli kõrgeenenud *lTSLP* ja vähenenud *sTSLP* tase, TSLPR ekspressiooni erinevust lööbelise ja lööbeta naha võrdluses ei leitud. (Fornasa *et al.*, 2015)

1.3.2.1. *TNF α* , *IL-4* ja *IL-13* roll põletikuvastuses ja seos *TSLP* ekspressiooniga

Tsütokiinid on väikesed valgud, mis vahendavad rakkude-vahelisi signaale. Tsütokiinid toimivad läbi raku pinnal olevate retseptorite ja on väga olulised organismi immuunsüsteemi toimimiseks. Erinevad tsütokiinid vahendavad rakkude küpsemist, kasvu ja kaasasündinud ning omandatud immuunsüsteemi etappe. (Dinarello, 2000)

TNF α on põletikku soodustav tsütokiin, mis algatab tugeva põletikureaktsiooni ja tema häiritud ekspressiooni seostatakse paljude haigustega nagu psoriaas, reumatoidartriit, Crohni tõbi ja erinevad allergilised haigused nagu astma, allergiline riniit ja atoopiline dermatiit (Akdis *et al.*, 2016). *TNF α* põletikku soodustavad omadused tulenevad võimest aktiveerida transkriptsioonifaktor NF- κ B signaalirada, läbi mille aktiveeritakse põletikku tekitavate geenide transkriptsiooni (Aggarwal, 2004). Kuigi *TNF α* üks funktsioonidest on ära hoida tuumorigeneesi ja hävitada vähirakke, võib *TNF α* düsregulatsioon viia vähi tekkeni (Sethi *et al.*, 2008). *TNF α* peamisteks tootjateks on makrofaagid ja T-rakud aga ka NK-rakud, B-rakud, neutrofiilid, nuumrakud ja keratinotsüüdid (Zelová & Hošek, 2013). *TSLP* kui *TNF α* vahendatud vastuse „downstream“ molekul mängib rolli allergilise põletiku tekkel. *TSLP* aktiveerib CD11c⁺ müeloidseid dendriitrakud, mis viib CD4⁺ T-rakkude diferentseerumise *TNF α* -t toovateks Th2 rakkudeks. (Koyama *et al.*, 2007)

IL-4 ja *IL-13* on Th2 tsütokiinid, mille roll avaldub allergilise põletiku sensibiliseerumis- ja efektorfaasis (Tomkinson *et al.*, 2001). *IL-4* ja *IL-13* seondumist vahendab *IL-4* retseptor (*IL-4R*) α polüpeptiid. See polüpeptiid saab koosneda tüüp 1 *IL-4R* heterodimeerist koos tsütokiini retseptori tavalise gamma ahelga (Ingl *common gamma chain*, γ -CR) või tüüp 2 *IL-4R* heterodimeerist koos *IL-13*-siduva polüpeptiidi, *IL-13R α* -ga (Zurawski *et al.*, 1995). Seetõttu tüüp 1 *IL-4R* aktiveerib ainult *IL-4* ja tüüp 2 *IL-4R* nii *IL-4* kui ka *IL-13* (Perkins *et al.*, 2006). *IL-4* roll immuunvastuse tekkel on hästi teada. T-rakkudes, B-rakkudes ja monotsüütides on ekspresseeritud tüüp 1 *IL-4R*, mida aktiveerib *IL-4*. See soodustab põletiku teket, fibroosi ja

lima tootmist. Samuti suunab *IL-4*, kuid mitte *IL-13*, naiivseid T-rakke diferentseeruma Th2 rakkudeks. (Wills-Karp Marsha & Finkelman Fred D., 2008)

Perkins *et al* 2006. aasta uurimuses demonstreeriti, kuidas *IL-4* on võimeline indutseerima kõiki muutuseid (hingamisteede ülitundlikus, „*goblet*“ rakkude hüperplaasia) hingamisteede põletikus, mida seostatakse *IL-13*ga, küll aga ei leitud otsest seost, et just *IL-4* üksi indutseerib neid muutuseid, sest läbi *IL-4* suunatakse CD4⁺ T-rakud Th2 tüüpi rakkudeks, mis toodavad *IL-13* (Perkins *et al.*, 2006). Samuti indutseerib *IL-4* atoopilise dermatiidiga patsientidel CD4⁺ T-rakkudel TSLPR ekspressiooni ning *TSLP* omakorda amplifitseerib *IL-4R* ja γ -CR ekspressiooni CD4⁺ T-rakkudel (Tatsuno *et al.*, 2015). *IL-4* ja *IL-13* stimuleerivad ka sensoorseid neuroneid. Kuna *TSLP* aktiveerib immuunrakke, mis toodavad *IL-4* ja *IL-13*, näitab, et *TSLP*, *IL-4* ja *IL-13* vaheline koosmõju võib kaasa aidata atoopilise dermatiidi põhjustatud sügelemise ja nahabarjääri katkemise tekkele. (Mack & Kim, 2018)

1.3.2.2. *TSLP* ekspressioon viiruste põhjustatud põletikus

Viirusnakkused tekitavad põletikuseisundit organismis. Erinevate transkriptsioonifaktorite, näiteks STAT ja NF- κ B, indutseeritud põletike kontrollimine on oluline infektsioonidega võitlemise juures. Nende transkriptsioonifaktorite põhjustatud kontrollimatu põletik võib aga põhjustada immuunpuudulikkust, kroonilist põletikku ja vähi teket. (Harhaj & Shembade, 2020)

On näidatud, et erinevad hingamisteede viirused nagu inimese rinoviirus (HRV) ja respiratoor-süntsütiaalne viirus (RSV) soodustavad kroonilise põletikulise haiguse teket nagu astma (Friedlander & Busse, 2005; Sigurs *et al.*, 2005). Viirusnakkused võivad mõjutada ka *TSLP* ekspressiooni. Rinoviirused sünteesivad replikatsiooni ajal dsRNAd, mida tunneb ära TLR3. Kuna rinoviirus-16 on TLR3 ligand ja ta aktiveerib NF- κ B, indutseerib RV16 (rinoviirus 16) koos *IL-4*ga *TSLP* tootmist. Kato *et al* 2007. aasta uurimusest selgus, et kõige tugevamini indutseeris *TSLP* tootmist (valgu ja mRNA tasemel) inimese hingamisteede epiteelrakkudes TLR3 ligand poly I:C, mis on dsRNA viiruse analoog. DsRNA-aktiveeritud TLR3 aktiveerib NF- κ B signaalraja ja indutseerib põletikku soodustavate geenide transkriptsiooni. (Kato *et al.*, 2007)

Kuna *TSLP* kahte isovormi kirjeldati esimest korda 2009. aastal (Harada *et al.*, 2009) ja hiljemates uuringutes on näidatud, et viiruse analoog poly I:C indutseerib just *lfTSLP*

ekspressiooni (Y. Xie *et al.*, 2012), võib eeldada, et varasemad viirusseoselised *TSLP* uuringud on just *lTSLP* kohta.

1.3.2.3. *TSLP* ekspressioon tolmulesta indutseeritud allergilises põletikus

Kodutolmulestad (HDM, ingl *house dust mite*) tekitavad inimese hingamisteedes kroonilist astmat. HDMi sissehingamisel võib tekkida tüüpiline astmaatiline seisund – hingamisteede ülitundlikkus, põletikuseisund, seerumi kõrgeenenud IgE tase ja tasakaalust väljas Th1/Th2 immuunvastus (Dong *et al.*, 2016). Inimese bronhi epiteeli rakkudes suurendab HDM *TSLP* ekspressiooni läbi fosfoinosiid-3-kinaas/Akt signaalraja. Samuti vähendab HDM e-kaderiini ja β -kateniini tootmist epiteelrakkudes, mis viib nahabarjääri häireteni. (Hu *et al.*, 2017)

Dong *et al* 2016 uuringus selgus, et *TSLP* lühike ja pikk isovorm reageerivad HDMi mõjutusel erinevalt. Selles uuringus näidati, et *lTSLP* ekspressioon lõhub hingamisteede epiteeli barjääri ja *sfTSLP* leevendab HDM-indutseeritud hingamisteede põletikku ja hoiab ära epiteeli barjääri katkemise. Leiti, et *lTSLP* ekspressioon on STAT5-sõltuv, kus STAT5 inhibitsioon vähendab *lTSLP* ekspressiooni. Samuti näidati *sfTSLP* kõrgeenenud ekspressiooni läbi kaltsitriooli lisamise rakkudele, mis viitab võimalusele, et *sfTSLP* ülesregulatsioon võib olla põletikuvastastest vahendajatest sõltuv ja potentsiaalne kandidaat astma ja muude põletikuliste haiguste ennetamiseks. (Dong *et al.*, 2016)

1.3.2.4. Vitamiin D ja selle analoogide roll *TSLP* regulatsioonis

Vitamiin D üheks funktsiooniks on tugevdada organismi kaitsevõimet mikroobsete sissetungijate eest väliskeskkonnast. Vitamiin D metaboliit kaltsitriool käitub kui intrakriinne hormoon läbi VDR, et tekitada kaasasündinud immuunvastus. Kaltsitriool aktiveerib T-rakke ja B-rakke, et aktiveerida tsütokiinide tootmist (Adams & Hewison, 2010). Vitamiin D ja VDR mängivad ka rolli nahabarjääri tagamisel läbi keratinotsüütide stimuleerimise (Landheer *et al.*, 2015). Kaltsitriool vähendab hingamisteede põletikku ja hoiab ära epiteelbarjääri häired (Li *et al.*, 2015). *TSLPd*, peamiselt *sfTSLPd*, reguleerivad üles VDRi agonistid (Dong *et al.*, 2016). On huvitav, et hiire epidermises *TSLP* indutseerimine kaltsitriooliga tekitab AD-sarnase fenotüübi – nahka liiguvad CD4⁺ Th2 T-rakud, dendriitrakud, eosinofiilid ja nuumrakud, samuti ekspresseeritakse põletikulisi tsütokiine nagu *IL-4*, *IL-5*, *IL-13*, *IL-31* ja *IFN- γ* ja tõuseb seerumi IgG ning IgE tase (Li Mei *et al.*, 2006). Hiirtel tekib kaltsitriooli kasutades letaalne

hüperkaltseemia, mistõttu kasutatakse katsetes hiirte peal vitamiin D analoogi kaltsipotriool (MC903), mis hüperkaltseemiat sellisel määral ei põhjusta ning see on kasutusel psoriaasi ravimina (Calberg, 2003). Vitamiin D agonistid kaltsitriool ja kaltsipotriool indutseerivad inimese keratinotsüütides peamiselt *sfTSLP* ekspressiooni (Y. Xie *et al.*, 2012).

Kuigi hiires ja inimeses leidub *TSLP* geen, erinevad need transkriptide ja osaliselt ka funktsiooni poolest (Landheer *et al.*, 2015), kui inimese *TSLP* geenis esineb 3 transkripti – transkript 1 (*lfTSLP* valku-kodeeriv), transkript 2 (*sfTSLP* valku-kodeeriv) ja transkript 3 (mitte-kodeeriv) (NCBI, 85480), siis hiire *TSLP* geenis esineb 2 transkripti – transkript 1 (*TSLP* valku-kodeeriv) ja transkript 2 (mitte-kodeeriv) (NCBI, 53603). Kui kaltsipotriooliga stimuleeritud inimese keratinotsüütides ei avaldu *lfTSLP* valgu tootmine ega mRNA ekspressioon, siis hiire nahka kaltsipotriooliga stimuleerides kasvas *TSLP* valgu ekspresseerimine (Landheer *et al.*, 2015). Kuna kaltsipotriooli kasutatakse hiiremudelil atoopilise dermatiidi indutseerimiseks (Moosbrugger-Martinz *et al.*, 2017), arvatakse, et hiire *TSLP* valk omab sarnast efekti inimese *lfTSLP* valguga ja kuna hiire *TSLP* geenis on ainult 1 valku-kodeeriv transkript, puudub hiires inimese *sfTSLP* analoog (Landheer *et al.*, 2015).

Li Mei *et al* 2006 uuringus näidati, et hiire keratinotsüütides indutseeritakse *TSLP* ekspressioon MC903ga mõjutamisel läbi VDR/RXR kompleksi (Li Mei *et al.*, 2006). Fornasa *et al* 2015 aasta uuringus mõjutati inimese keratinotsüüte vitamiin D₃ga. Leiti, et sellise mõjutamise korral olid aktiveeritud nii *sfTSLP* kui ka *lfTSLP* promootorpiirkonnad kuid indutseeriti ainult *sfTSLP* ekspressiooni. (Fornasa *et al.*, 2015)

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärk oli välja selgitada *lftSLP* ja *sfTSLP* suhtelised ekspresioonitasemed *IL-4* + *IL-13* + *TNF α* , *IL-4* + HDM, poly I:C ja kaltsipotriooli poolt esile kutsutud rakuvastuses 6h, 18h ja 30h ajapunktides inimese primaarsete keratinotsüütide koekultuuris ning hinnata kaltsipotriooli eeltötluse mõju poly I:C poolt esile kutsutud rakuvastuse tekkel.

Bakalaureuseöö täpsemad eesmärgid olid:

- 1) Võrrelda *IL-4* + *IL-13* + *TNF α* , *IL-4* + HDM, poly I:C ja kaltsipotriooli poolt indutseeritud *lftSLP* ja *sfTSLP* transkriptide ekspresioonitasemete muutusi 6h, 18h ja 30h ajapunktides RT-qPCR metoodikaga, et teada saada, millistel tingimustel on kõige rohkem vastavate transkriptide ekspressioon detekteeritav.
- 2) Tuvastada, kas kaltsipotriooli eeltötlusel võiks olla mõju *lftSLP* ja *sfTSLP* ekspresioonitasemete muutustele poly I:C poolt esile kutsutud varase rakuvastuse tekkel RT-qPCR metoodikaga.
- 3) Tuvastada, kas kaltsipotriooli eeltötlusel võiks olla mõju *lftSLP* valgu sekreteerimise hulgalet poly I:C poolt esile kutsutud varase rakuvastuse tekkel ELISA metoodikaga.

2.2. Materjal ja metoodika

2.2.1. Inimese primaarsete keratinotsüütide kasvatamine ja paljundamine

Eksperimentides kasutati normaalseid inimese epidermaalseid keratinotsüüte (NHEK, *normal human epidermal keratinocytes*) (PromoCell, Saksamaa), mida kasvatati *Keratinocyte-SFM* (*Keratinocyte serum-free medium*) söötmes (Life Technologies, USA). Söötmele oli lisatud veise ajuripatsi ekstrakti (BPE, *bovine pituitary extract*, kontsentratsioon 50 $\mu\text{g/ml}$), inimese epidermaalset kasvufaktorit (hEGF, *human epidermal growth factor*, kontsentratsioon 5 ng/ml), penitsilliini (5 U/ml) ja streptomütsiini (5 $\mu\text{g/ml}$). Rakke kasvatati 10 cm diameetriga koekultuuri tassidel 37°C juures, 5,0 % CO₂ ja veeauruga küllastunud inkubaatoris. Rakkude kogumiseks plaadilt pesti rakud 5 ml PBSiga (*phosphate buffered saline*) ning lisati 1,5 ml trüpsiin-EDTA (Trypsin-EDTA 0.1%, no phenol red, Gibco™, USA) lahust ja inkubeeriti 5

minutit 37°C juures. Reaktsiooni peatamiseks lisati 3 ml trüpsiini neutraliseerijat (Trypsin Neutralizer Solution, Gibco™, USA). Rakud koguti 15 ml tuubi ja tsentrifuugiti toatemperatuuril 300 g juures 5 minutit. Rakkudelt aspireeriti supernatant ja suspendeeriti 10 ml lõppmahus *Keratinocyte-SFM* söötmes. Seejärel kanti suspendeeritud rakud uutele 10 cm diameetriga koekultuuri plaatidele.

2.2.2. *TSLP* ekspressiooni indutseerimine inimese primaarsete keratinotsüütide koekultuuris

Keratinotsüüdid jagati enne stimuleerimist 12 kannusele plaadile, 40000 rakku kannu kohta, 1ml *Keratinocyte-SFM* söötmes. Järgmisel päeval vahetati sööde ja oodati 48h enne stimulatsioonide alustamist. Rakke stimuleeriti *IL-4+IL-13+TNF α* , *IL-4+HDM*, Poly I:C (LMW, *low molecular weight*) ja kaltsipotriooliga (MC903). MC903 oli lahustatud DMSOs, ülejäänud kemikaalid steriilses vees või füsioloogilises lahuses (poly I:C lahustatuna NaCl 0.9% vesilahuses, Invivogen, USA). *IL-4+IL-13+TNF α* (lõppkontsentratsioon söötmes vastavalt 30 ng/ml, 30 ng/ml, 3,5 ng/ml) mõjutuse jaoks segati antud kemikaalid eelnevalt kokku ja lisati igale vastavale kannule 5 μ l. *IL-4+HDM* (lõppkontsentratsioon söötmes vastavalt 30 ng/ml, 50 μ g/ml) mõjutuse jaoks segati antud kemikaalid eelnevalt kokku ja lisati igale vastavale kannule 10 μ l. Poly I:Cd (lõpp kontsentratsiooniga söötmes 1 μ g/ml) lisati igale vastavale kannule 5 μ l. Kaltsipotriooli (MC903, lõpp kontsentratsioon söötmes 10 μ M) lisati igale vastavale kannule 1 μ l ja kaltsipotriooli lahustit DMSOt igale vastavale kannule 1 μ l lõppkogusega 0.001 % söötmes. Vastavalt 6h, 18h ja 30h möödudes koguti rakkudelt supernatant, mis tsentrifuugiti 600g juures 10 minutit, et eemaldada rakujäätused. Plaadil olevad rakud lüüsiiti TRIzol™ lüüsilahuses (Life Technologies, USA) ning saadud proovid hoiustati -80°C juures.

2.2.3. *TSLP* ekspressiooni indutseerimine MC903 ja poly I:C eeltöötlusega

Antud töö teise mõjutamiskatse korral jagati keratinotsüüdid 12 kannusele plaadile, 35000 rakku kannu kohta 1 ml *Keratinocyte-SFM* söötmes. Järgmise päeval vahetati sööde ja oodati 48h enne stimulatsioonide alustamist. Rakke stimuleeriti Poly I:C (LMW, ingl *low molecular weight*) ja kaltsipotriooli ehk MC903ga. Negatiivse kontrollina MC903 puhul kasutati DMSO lahustikontrolli ja Poly I:C puhul, vastavalt tootja soovitusel, füsioloogilist lahust (NaCl 0.9%, Invivogen, USA). Rakke stimuleeriti 12h mõjutusperioodi jooksul (Tabel 1.). Rakkudele

lisati vastavat stimulatsioonilahust, inkubeeriti 6 tundi ja lisati järgmine stimulatsioonilahus. 12 tunni möödudes koguti rakkudelt supernatant, mis tsentrifuugiti 600g juures 10 minutit rakujäänuste eemaldamiseks, plaadil olevad rakud lüüsi TRIzol™ lüüsilahuses ning saadud proovid hoiustati -80°C juures.

Tabel 1. Keratinotsüütide stimuleerimismudel

Esmane stimuleerimine 6 tundi:	6 tunni möödudes lisati:
Füsioloogiline lahus	Kaltsipotriool (MC903, 10 µM)
Kaltsipotriool (MC903, 10 µM)	Füsioloogiline lahus
DMSO (lõppkogus 0,001%)	Poly I:C (LMW, 1 µg/ml)
Poly I:C (LMW, 1 µg/ml)	DMSO (lõppkogus 0,001%)
Kaltsipotriool (MC903, 10 µM)	Poly I:C (LMW, 1 µg/ml)
Poly I:C (LMW, 1 µg/ml)	Kaltsipotriool (MC903, 10 µM)
Töötlemata kontroll	Töötlemata kontroll

2.2.4. RNA eraldamine inimese primaarsetest keratinotsüütidest

RNA eraldamiseks kasutati Total RNA Zol-Out komplekti (A&A Biotechnology, Poola). Rakulüüsi, mis olid eelnevalt hoiul -80°C juures, sulatati toatemperatuurile ja segati vorteksil. 500 µl TRIzol™ lahuse kohta lisati 110 µl kloroformi, proove segati vorteksil ja inkubeeriti 3 minutit toatemperatuuril. Seejärel tsentrifuugiti proove 15 minutit 12000 g 4°C juures. 300 µl tekkinud vesifaasi tõsteti uude 1,5 ml tuubi ja lisati 300 µl isopropanooli. Proove segati vorteksil ja kanti mikrokolonnidele. Edasi järgiti tootjapoolset protokollit (A&A Biotechnology, Poola). RNA elueeriti 40 µl milliQ veega ja kontsentratsiooni mõõdeti NanoDrop 2000c spektrofotomeetriga (Thermo Scientific, USA).

2.2.5. RT-qPCR mRNA ekspressiooni tuvastamiseks

Muutuste tuvastamiseks ekspresseeritavate mRNAde hulgas kasutati RT-qPCR meetodit. Võimaliku saastuse ja võõr-DNA eemaldamiseks tehti proovidele DNAasi töötlus. Kasutati DNase I, Rnase-free komplekti (DNase I, Rnase-free EN0521, Thermo Scientific, USA). Proovidele, kus totaalse RNA kogus oli 600 ng, lisati DNAasi, RNAaside inhibiitorit Ribolocki ja milliQd vastavalt tootja soovitatud protokollit järgi reaktsioonimahu 10,5 µl kohta. Proove

inkubeeriti 37°C juures 30 minutit, seejärel lisati reaktsiooni peatamiseks 1,05 µl EDTAd ja inkubeeriti 65°C juures 10 minutit.

Peale DNAasi tötlust sünteesiti RNAle komplementaarne DNA (cDNA). 96 kannuga plaadil segati ühe proovi kohta kokku 11,5 µl RNAd (600 ng), 1 µl Oligo(dT) praimerit (100 µM, TAG Copenhagen, Taani) ja 2 µl nukleotiidide segu (dNTP *mix*, 10 mM, Thermo Scientific, USA). Plaat kaeti kilega, segati vorteksil, tsentrifuugiti ja kuumutati 5 minutit 65°C juures RNA sekundaarstruktuuride eemaldamiseks ja praimerite paremaks seondumiseks. Seejärel lisati proovidele reaktsioonisegu, mis koosnes 4 µl RT puhvrast, 1 µl RevertAid ensüümist ja 0,5 µl RNAasi inhibiitorist (Thermo Scientific, USA). Plaat kaeti kilega, segati vorteksil ja tsentrifuugiti. Pöördtranskriptsiooni teostati Mastercycler® nexus (Eppendorf, Saksamaa) termotsükleris 60 minutit 42°C juures ja reaktsioon peatati kuumutades 10 minutit 75°C juures.

384 kannuga plaadile lisati igasse kannu reaktsioonisegu, mis koosnes 2,4 µl 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR segust (Solis Biodyne, Eesti), 2,6 µl milliQ veest ja 1 µl praimerit segust (4 µM F + 4 µM R, praimerid tabelis 2.). Kannu lisati 6 µl eelnevalt valmistatud cDNAd (16,5 ng, arvutatuna algsest RNA hulgast lähtuvalt), plaati segati vorteksil ning tsentrifuugiti 300g juures 1 min enne ViiA™7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA) masinasse asetamist. Igat proovi analüüsiti kolmes tehnilises korduses. Kasutatud programm on kirjeldatud Tabelis 3. Suhtelised ekspressiooni muutused arvutati 2^{(-Delta Delta C(T))} meetodikat kasutades (Livak & Schmittgen, 2001) MS Exceli (Microsoft, USA) programmis. Ekspressiooni väärtused normaliseeriti koduhoidja geeni EEF1A1 suhtes.

Tabel 2. Praimerid

Praimer		Järjestus
<i>TSLP</i>	F	5' ATGTTTCGCCATGAAAACCTAAGGC 3'
	R	5' GCGACGCCACAATCCTTGTA 3'
<i>sfTSLP</i> (short)	F	5' GCCTATGAGCAGCCACATTG 3'
	R	5' TGCCTGAGTAGCATTATCTGAGT 3'
<i>lfTSLP</i> (long)	F	5' CTTGTAGGGCTGGTGTAACTTAC 3'
	R	5' CTCGGTACTTTTGGTCCCCTC 3'
<i>CCL5</i>	F	5' AGTCGTCTTTGTCACCCGAAA 3'
	R	5' TCTCCATCCTAGCTCATCTCCAA 3'
<i>CXCL8</i>	F	5' GCAGCTCTGTGTGAAGGTGCAGTT 3'
	R	5' TTCTGTGTTGGCGCAGTGTGGTC 3'
<i>CXCL10</i>	F	5' AAGCAGTTAGCAAGGAAAGGTCTA 3'
	R	5' GCCTCTGTGTGGTCCATCC 3'

Tabel 3. RT-qPCR programm

Etapp	Temperatuur °C	Aeg	Korduste arv
Võimaliku kontaminatsiooni eemaldus	50	2 minutit	1
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	

2.2.6. Valgu hulga detekteerimine ELISA meetodil

TSLP valgu hulga tuvastamiseks kasutati ELISA meetodit. Selleks kasutati ELISA MAXTM Deluxe Set Human *TSLP* komplekti (Biolegend, USA). Esmalt valmistati inimese *TSLP* standard vastavalt tootja protokollile. 96 kannusele NuncTM MaxiSorpTM ELISA plaadile (Biolegend, USA) kanti 100 µl „capture“ antikeha ja inkubeeriti üleöö 4°C juures. Plaat pesti neli korda 300 µl PBSi ja 0.05% TweenTM 20 Surfact-AmpsTM Detergent (Thermo Scientific, USA) lahusega. Seejärel kanti igasse kannu 200 µl 1X Assay Diluent A lahust mittespetsiifilise seondumise blokeerimiseks ja inkubeeriti 1 tund toatemperatuuril Mini-Shaker PSU-2T (500 rpm, 0.3 cm orbiit, Biosan, Läti) loksutil. Plaat pesti neli korda nagu eelnevalt kirjeldatud, seejärel lisati kannudesse 100 µl proovi ja inkubeeriti 3 tundi loksutil toatemperatuuril. Järgnevalt lisati igasse kannu 100 µl Detection Antibody ja inkubeeriti 1 tund loksutil toatemperatuuril. Plaat pesti 4 korda ning seejärel lisati igasse kannu 100 µl Avidin-HRP lahust. Plaati inkubeeriti 30 minutit toatemperatuuril loksutil. Seejärel pesti plaati 5 korda, peale igat pesulahuse kannu kandmist oodati 1 minut. Järgmisena kanti igasse kannu 100 µl Substrate Solution Fi ja inkubeeriti 40 minutit pimedas. Reaktsioon lõpetati 100 µl väävelhappega ja tulemusi loeti 450 nm ja 570 nm juures Ledetect 96 Microplate lugejaga (Labexim Products, Austria). Valgu hulga muutused analüüsiti MS Exceli (Microsoft, USA) programmis.

2.2.7. Statistiline analüüs

Andmete statistiliseks analüüsiks ja graafikute esitamiseks kasutati programmi GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc, USA). Statistiliseks analüüsiks kasutati ühe-suunalist ANOVA testi (*one-way ANOVA*), Tukey testiga (*Tukey's multiple comparison test*). Statistiliselt oluliseks arvestati tulemused, mille korral P-väärtus oli väiksem kui 0,05.

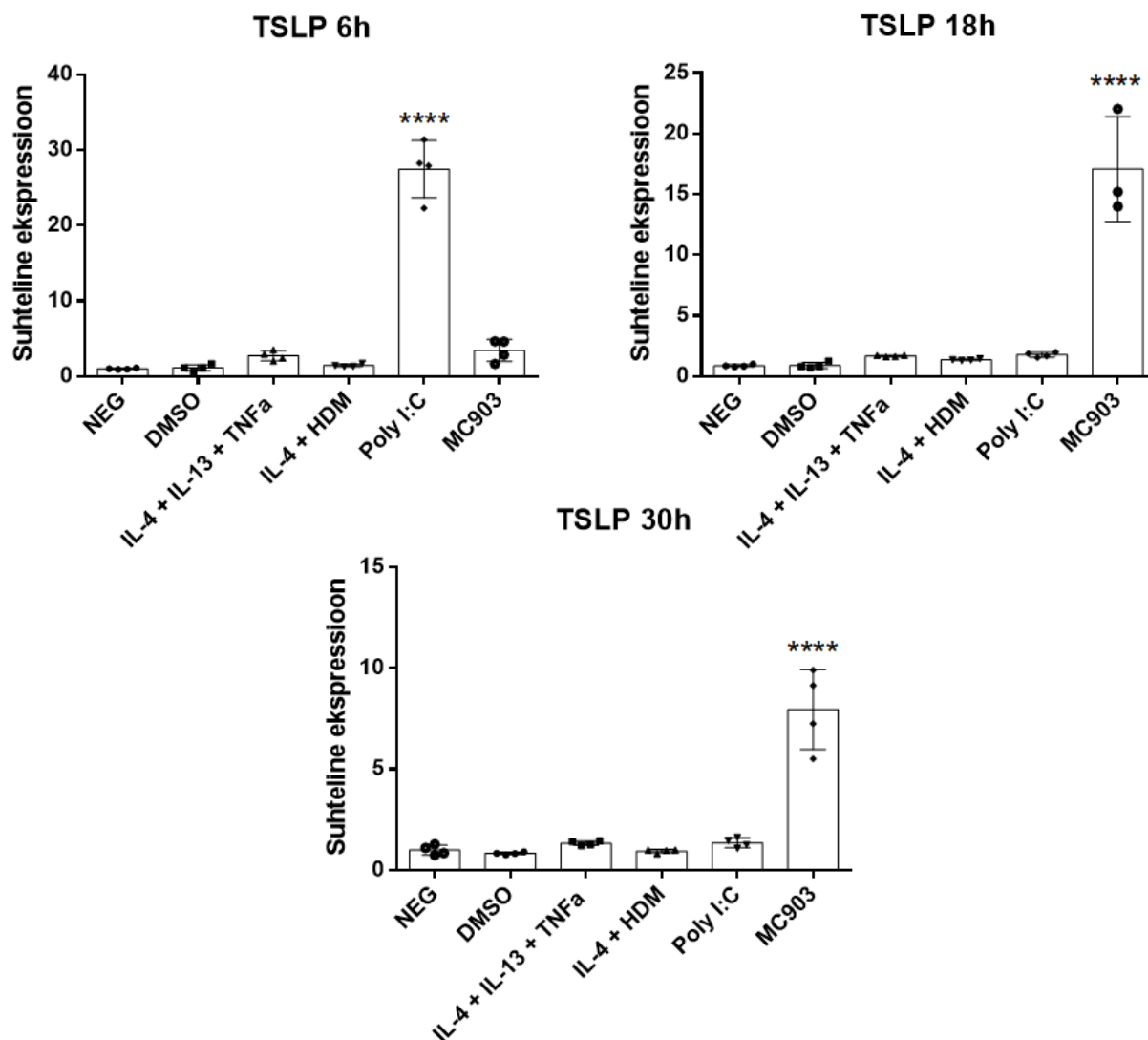
2.3. Tulemused

2.3.1. *IL-4* + *IL-13* + *TNFα*, *IL-4* + HDM, poly I:C ja kaltsipotriooli mõju *TSLP* ekspressioonile inimese primaarsete keratinotsüütide koekultuuris

Antud töö esimeseks ülesandeks oli uurida, kuidas mõjutab ADga seotud tsütokiinide (*IL-4* + *IL-13* + *TNFα*) ja levinud allergeeni, tolmulesta, esile kutsutud rakuvastus *TSLP* (*lfTSLP* ja *sfTSLP*) ekspressiooni inimese primaarsete keratinotsüütide koekultuuris võrrelduna poly I:C

või kaltsipotriooli esile kutsutud rakuvastuses, et teada saada, millistel tingimustel on kõige rohkem vastavate transkriptide ekspressioon detekteeritav. Selleks stimuleeriti inimese primaarseid keratinotsüüte *IL-4 + IL-13 + TNF α* , *IL-4 + HDM*, poly I:C ja MC903ga. *IL-4 + IL-13 + TNF α* on tsütokiinide kompleks, mille kasutamine võiks vähemalt osaliselt jäljendada inimese keratinotsüütide rakukultuuris atoopilise dermatiidiga seotud rakuvastust (Y. Xie *et al.*, 2012). Eelkatsena analüüsiti tsütokiinide *IL-8*, *CXCL10* ja *CCL5* ekspressiooni antud stimulatsioonide korral, et näha kas stimulatsioonid töötavad ja kutsuvad esile põletikuvastust keratinotsüütides (Lisa 3). *CCL5* ja *CXCL10* ekspressioon oli statistiliselt oluliselt suurenenud 6h, 18h ja 30h ajapunktis poly I:Cga töötusel. Samuti oli suurenenud *CCL5* ekspressioon tuvastatav 6h ajapunktis *IL-4 + IL-13 + TNF α* ga stimulatsioonil. *IL-8* puhul esines statistiliselt olulist ekspressiooni suurenemist 6h ajapunktis *IL-4 + IL-13 + TNF α* ja MC903ga stimulatsioonil. MC903 ja poly I:C töötusel oli suurenenud *IL-8* ekspressioon ka 18h ajapunktis

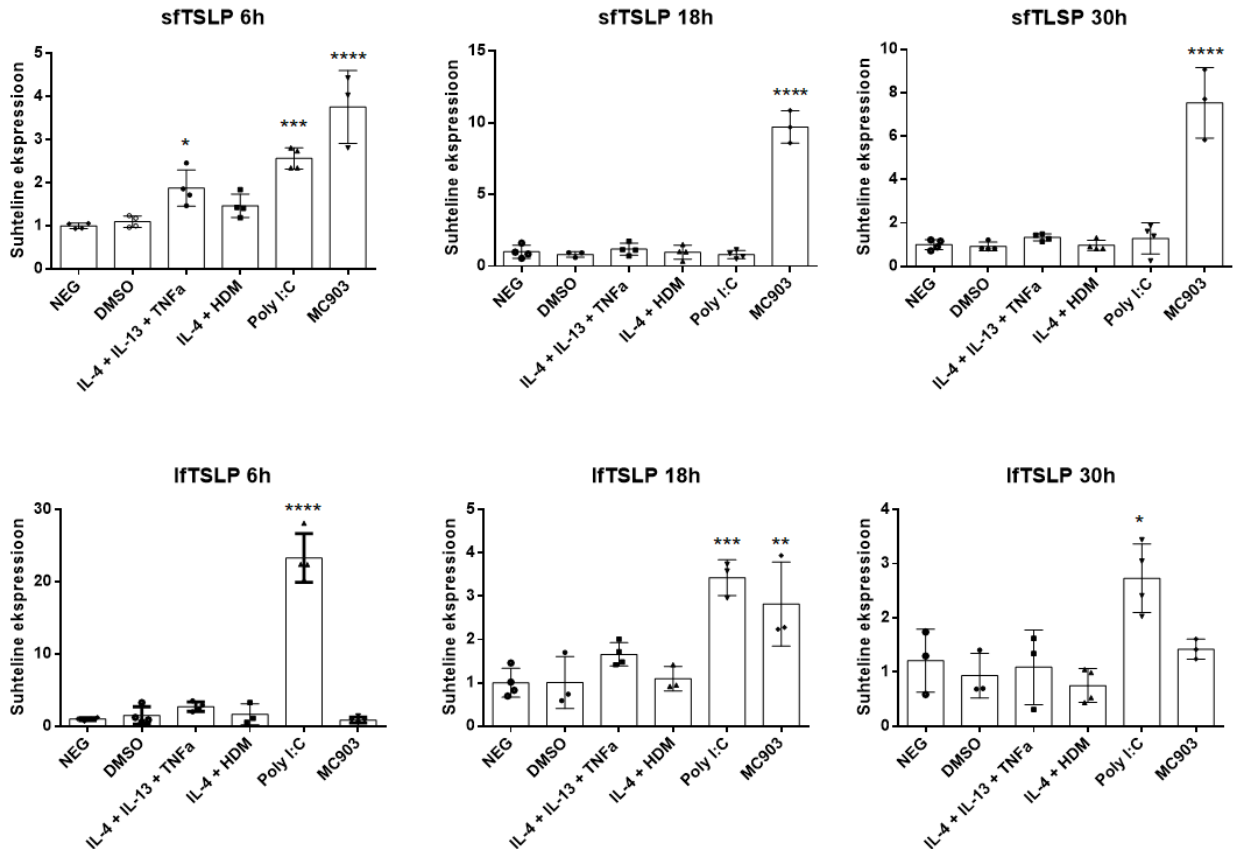
RT-qPCR *TSLP* transkriptide tuvastamiseks viidi läbi kolme erineva praimerikomplektiga, millest esimene tuvastas samaaegselt nii *sfTSLP*d kui ka *lfTSLP*d (*TSLP*) ilma transkriptse eristamata, teine *sfTSLP* ja kolmas *lfTSLP* transkripte. Geeniekspressiooni analüüsi tulemusena selgus, et 6h ajapunktis oli *TSLP* ekspressioon kõrgeenenud ainult poly I:C stimulatsiooni korral ja 18h ning 30h ajapunktis ainult MC903 stimulatsiooni korral (Joonis 5). Statistiliselt olulist *TSLP* ekspressiooni muutust võrreldes negatiivse kontrolliga ei esinenud *IL-4 + IL-13 + TNF α* ja *IL-4 + HDM* stimulatsioonil nii 6h, 18h kui ka 30h ajapunktis (Joonis 5).



Joonis 5. TSLP (*lfTSLP* + *sfTSLP*, transkripte eristamata) ekspressioon inimese primaarsete keratinotsüütide koekultuuris 6h, 18h ja 30h ajapunktil *IL-4* + *IL-13* + *TNFα*, *IL-4* + HDM, poly I:C ja MC903 stimuleerimisel. Inimese primaarseid keratinotsüüte stimuleeriti 6, 18 või 30 tundi *IL-4* + *IL-13* + *TNFα*, *IL-4* + HDM, poly I:C ja MC903ga. Negatiivse kontrollina (NEG) kasutati stimuleerimata rakke, MC903 negatiivse kontrollina kasutati DMSOt. Geeniekspressiooni muutusi tuvastati RT-qPCRi abil ja CT väärtused normaliseeriti *EEF1A1* ning negatiivse kontrolli suhtes. Statistiliseks analüüsiks kasutati ühesuunalist ANOVA testi, väärtuste omavaheliseks võrdlemiseks kasutati Tukey testi (*Tukey's multiple comparison test*) Graafikutulemused on esitatud koos standardveaga. N=3-4; ** P < 0.0001.**

Järgmisena uuriti, millise stimulatsiooni puhul on milline *TSLP* isovorm (*sfTSLP* või *lfTSLP*) ekspresseeritud. Selleks kasutati RT-qPCRi analüüsil *sfTSLP* ja *lfTSLP* praimereid, mis amplifitseerivad vastavaid *TSLP* isovorme. Geeniekspressiooni analüüsist selgus, et *sfTSLP* on statistiliselt oluliselt ekspresseeritud, võrreldes negatiivse kontrolliga, 6 tunni ajapunktis *IL-4* + *IL-13* + *TNF α* , poly I:C ja kaltsipotriooliga stimuleeritud rakkudes, kuid enim kaltsipotriooliga stimuleeritud rakkudes. (Joonis 6). MC903 mõjutuse korral oli *sfTSLP* võrreldes kontrolliga kõrgelt ekspresseeritud ka 18h ja 30h ajapunktis (Joonis 6). *IL-4* + *IL-13* + *TNF α* , *IL-4* + HDM ja poly I:C stimulatsiooni korral ei esinenud aga 18h ja 30h ajapunktis statistiliselt olulist ekspressiooni muutust (Joonis 6).

LfTSLP suurenenud ekspressioon esines poly I:Cga mõjutades kõikides ajapunktides (Joonis 6). 18h ajapunktis esines *lfTSLP* ekspressiooni suurenemine ka MC903ga töödeldud rakkudes (Joonis 6). Kuigi *lfTSLP* ekspressioon oli suurenenud poly I:Cga töötamise puhul 6h, 18h ja 30h ajapunktis, on märgata suhtelise ekspressiooni langust ajas võrreldes negatiivse kontrolliga (Joonis 6). *IL-4* + *IL-13* + *TNF α* ja *IL-4* + HDM töödeldud rakkudes statistiliselt olulist *lfTSLP* ekspressiooni muutust ei tuvastatud 6h, 18h ega ka 30h ajapunktis (Joonis 6).



Joonis 6. *SfTSLP* ja *lfTSLP* ekspressioon inimese primaarsete keratinotsüütide koekultuuris 6h, 18h ja 30h ajapunktil *IL-4* + *IL-13* + *TNFα*, *IL-4* + HDM, Poly I:C ja MC903 stimuleerimisel. Inimese primaarseid keratinotsüüte stimuleeriti 6, 18 või 30 tundi *IL-4* + *IL-13* + *TNFα*, *IL-4* + HDM, poly I:C ja MC903ga. Negatiivse kontrollina kasutati stimuleerimata rakke. MC903 negatiivse kontrollina kasutati DMSOt. Geeniekspressiooni muutusi tuvastati RT-qPCRi abil ja CT väärtused normaliseeriti *EEF1A1* ning negatiivse kontrolli suhtes. Statistiliseks analüüsiks kasutati ühe-suunalist ANOVA testi, väärtuste omavaheliseks võrdlemiseks kasutati Tukey testi (*Tukey's multiple comparison test*) Graafikutulemused on esitatud koos standardveaga. N=3-4; * P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001; **** P < 0.0001.

Kokkuvõttes selgus RT-qPCR tulemustest, et inimese primaarsetes keratinotsüütides suurenes statistiliselt olulisel määral *TSLP* ekspressioon vaid poly I:C ja MC903 stimuleerimiste tulemusena ning esines erinevusi transkriptide isovormide tasemel sõltuvalt kasutatud stimulatsioonist (Joonis 5 ja 6). *LfTSLP* oli kõige rohkem ekspresseeritud poly I:C stimulatsiooni korral 6 tunni ajapunktis ning ka *sfTSLP* oli indutseeritud sama stimulatsiooni korral kuid vähemal määral 6h ajapunktis (Joonis 6). Kuigi *sfTSLP* ekspressiooni muutus oli tuvastatav juba 6h ajapunktis, oli see rohkem ekspresseeritud kaltsipotriooli stimulatsiooni korral hilisemates 18h ja 30h ajapunktides (Joonis 6). Saadud tulemused näitasid, et nii *sfTSLP*

kui ka *lfTSLP* suurenenud ekspressioon oli tuvastatav varases rakuvastuses 6h möödudes sõltuvalt mõjutusest, kus vaid poly I:C indutseeris põletikuga seotud *lfTSLP* ekspressiooni (Joonis 6). Võrreldes teiste mõjutustega, olid *TSLP* erinevate transkriptide ekspressioonitasemed enim indutseeritud MC903 ja poly I:C korral, mistõttu keskenduti edasistes katsetes ainult nende stimulatsioonide uurimisele *sfTSLP* ja *lfTSLP* ekspressiooni muutuste tuvastamisel.

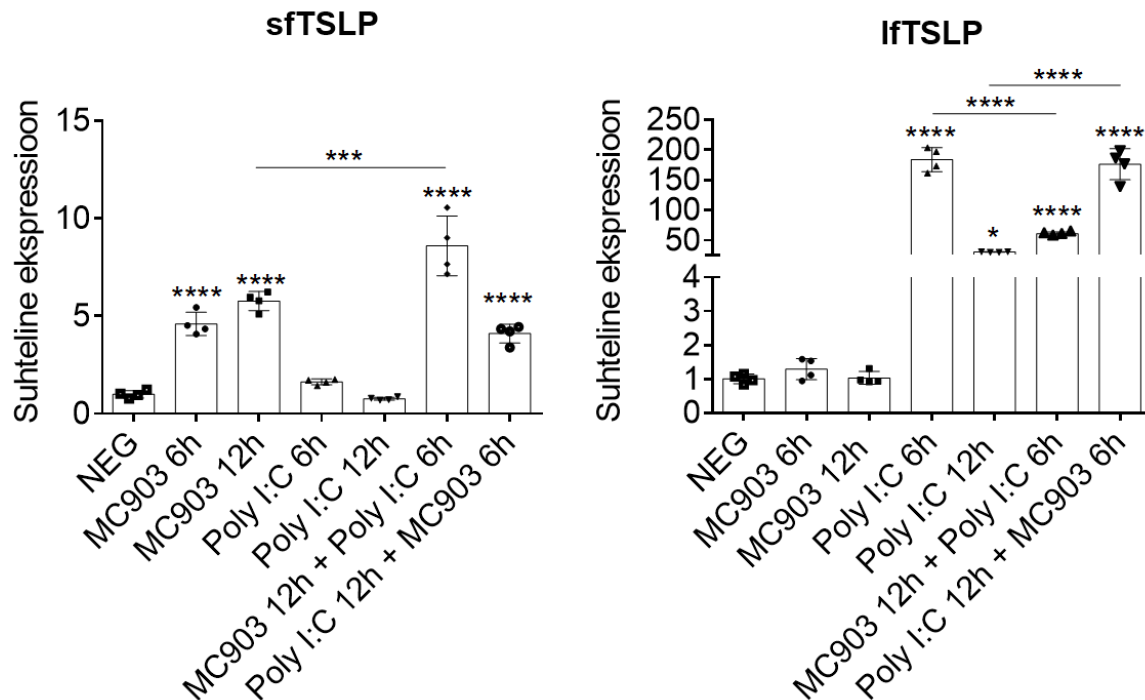
2.3.2 Kaltsipotriooli eeltötluse mõju *lfTSLP* ja *sfTSLP* ekspressioonitasemete muutustele poly I:C poolt esile kutsutud varase rakuvastuse tekkel inimese primaarsete keratinotsüütide koekultuuris

Eelnevate katse tulemustest selgus, et keratinotsüütide stimuleerimisel vitamiin D analoogi MC903ga oli peamiselt suurenenud *sfTSLP* kuid mitte *lfTSLP* ekspressioon (Joonis 6). Kuna arvatakse, et *sfTSLP* on rakus homöostaatiline efekt (Tsilingiri *et al.*, 2017) ja *lfTSLP* kutsub esile peamist põletikuvastust (Harada *et al.*, 2009) ning kopsuepiteeli rakkude koekultuuris on eelnevalt näidatud MC903 mõju põletikulise vastuse vähendamisel (Dong *et al.*, 2016), oli järgmiseks eesmärgiks tuvastada, kas kaltsipotriooli eeltötlusel on mõju *lfTSLP* ja *sfTSLP* ekspressioonitasemete muutustele poly I:C poolt esile kutsutud varase rakuvastuse tekkel.

Eeltötlusega inimese primaarsete keratinotsüütide stimuleerimised teostati nagu on toodud Tabelis 1. Eeltötlus teostati 6h jooksul, mille järel lisati rakkudele vastavalt järgmist stimulatsioonilahust 6h jooksul mõjutamiseks. Proove analüüsiti 12h ajapunktis. Stimulatsioonil MC903ga on *sfTSLP* ekspressioon indutseeritud nii 6h kui ka 12h ajapunktis (Joonis 7). Poly I:Cga stimulatsioonil statistiliselt olulist *sfTSLP* ekspressiooni muutust ei tuvastatud 6h ega 12h ajapunktis (Joonis 7). On huvitav, et MC903 eeltötlusega stimulatsioonile 6 tunni ajapunktis poly I:C lisamine tõstis *sfTSLP* ekspressiooni võrreldes ainult MC903 12 tunni stimulatsiooniga (Joonis 7). MC903 lisamine poly I:C stimulatsioonile statistiliselt olulist *sfTSLP* ekspressiooni muutust ei avaldanud (Joonis 7).

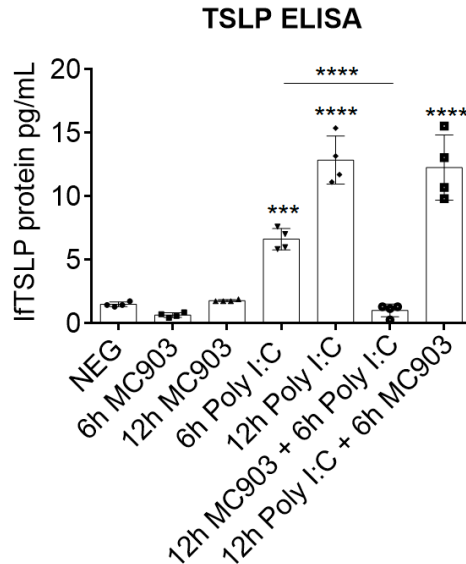
lfTSLP oli poly I:Cga stimulatsioonil ekspresseeritud nii 6h kui ka 12h ajapunktis, *lfTSLP* ekspressioonis MC903ga stimulatsioonil statistiliselt olulist muutust ei esinenud (Joonis 7). MC903 eeltötlusega stimulatsioonil, kuhu 6h ajapunktil lisati poly I:C esines *lfTSLP* ekspressiooni langus võrreldes ainult poly I:C 6h stimulatsiooniga (Joonis 7). Lisades poly I:C

12h stimulatsioonile 6h ajapunktis MC903e suurenes *lftSLP* ekspressioon võrreldes ainult poly I:C 12 tunni *lftSLP* ekspressiooniga (Joonis 7).



Joonis 7. *SfTSLP* ja *lftSLP* ekspressioon poly I:C või MC903 eeltöötusega stimulatsioonil. Inimese primaarseid keratinotsüüte stimuleeriti 12 tunni vältel, 6h poly I:C või MC903ga eeltöötusega. Rakkudele lisati MC903, poly I:C või vastavaid kontrollid (MC903 puhul DMSO, poly I:C puhul füsioloogilist lahust) ning 6 tunni möödudes lisati rakkudele uus stimulatsioonisegu (vt. Tabel 1.) Negatiivse kontrollina (NEG) kasutati stimuleerimata rakke. Geeniekspressioon muutusi tuvastati RT-qPCR meetodil ja väärtused normaliseeriti *EEF1A1* ja negatiivse kontrolli suhtes. Graafikutulemused on esitatud koos standardveaga. statistiliseks analüüsiks kasutati ühe-suunalist ANOVA testi, väärtuste omavaheliseks võrdlemiseks kasutati Tukey testi (*Tukey's multiple comparison test*) Graafikul on toodud peamised katses oluliste võrdluste statistilised ekspresseerimisvõrdlused, kogu statistiline analüüs on välja toodud tabelis Lisa 1, *TSLP* (*sfTSLP* ja *lftSLP*, transkripte eristamata) ekspressioon toodud välja graafikul Lisa 2. N=4, * P < 0.05; *** P < 0.001; **** P < 0.0001.

Järgmisena oli eesmärgiks välja selgitada, kas *lftSLP* mRNA ekspressioon viib *lftSLP* valgu tootmiseni ning kas MC903 eeltöötus mõjutab lisaks mRNA tasemele ka vastava valgu hulga muutust (Joonis 8).

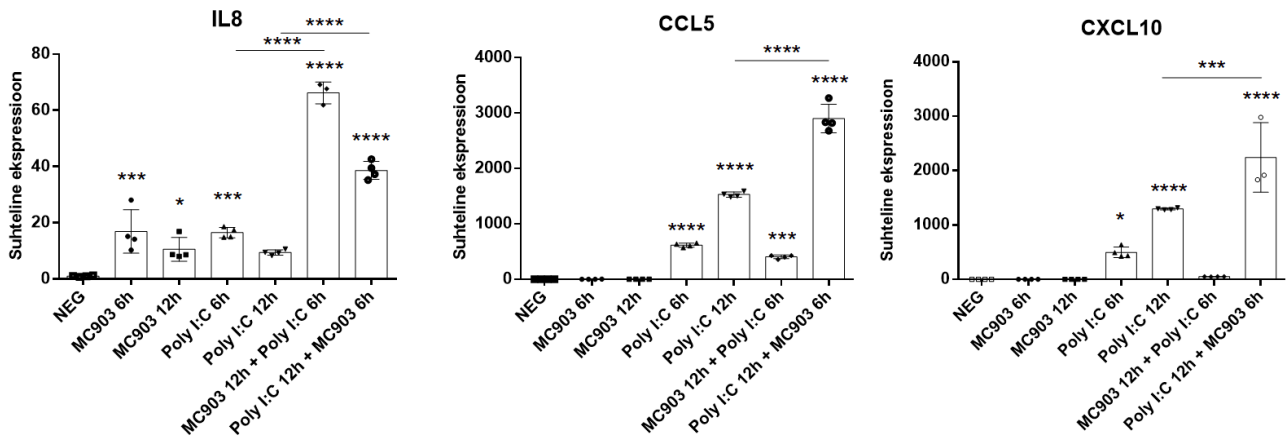


Joonis 8. lFTSLP valgu hulk inimese primaarsete keratinotsüütide koekultuuri söötmes poly I:C või MC903 eeltöötlusega stimulatsioonil. Inimese primaarseid keratinotsüüte stimuleeriti poly I:C või MC903 eeltöötlusega. Negatiivse kontrollina (NEG) kasutati töötlemata rakke. Rakkudele lisati MC903, poly I:C või vastavaid kontrollid (MC903 puhul DMSO, poly I:C puhul füsioloogilist lahust) ning 6 tunni möödudes lisati rakkudele uus stimulatsioonisegu (vt. Tabel 1.) Valgu hulka määriti ELISA meetodil. Statistiliseks analüüsiks kasutati ühe-suunalist ANOVA testi, väärtuste omavaheliseks võrdlemiseks kasutati Tukey testi (*Tukey's multiple comparison test*). Graafikul on toodud peamised katses oluliste võrdluste statistilised valgu hulga muutused. N=4, *** P < 0.001; ***** P < 0.0001.

TSLP valgu tuvastamiseks kasutati rakkudelt kogutud söötme supernatandi proove, mis pärinesid samast katsest, mille puhul teostati eelnevalt kirjeldatud RT-qPCR analüüs. ELISA meetodil valgu hulga tuvastamine näitas, et lFTSLP valk on ekspresseeritud vaid poly I:Cga stimuleerimisel (Joonis 8). MC903ga rakkude töötlemisel lFTSLP valku ei tuvastatud. On tähelepanuväärne, et eelneval katsel tuvastati 12h MC903 + 6h poly I:C stimulatsioonil *lFTSLP* mRNA ekspressiooni vähenemine, võrreldes 6h poly I:C stimulatsiooniga (Joonis 7) ning see muutus on tuvastatav ka valgu tasemel (Joonis 8). Samas on huvitav, et 12h poly I:C + 6h MC903 stimulatsioonil täheldatud *lFTSLP* mRNA ekspressiooni suurenemine võrreldes poly I:C 12h stimulatsiooniga (Joonis 7) TSLP valgu hulga muutust sellisel kujul 12h ajapunktis ei põhjustanud (Joonis 8).

2.3.3 Kaltsipotriooli eeltötluse mõju põletikku soodustavate tsütokiinide *IL8*, *CCL5* ja *CXCL10* ekspressioonitasemete muutustele poly I:C poolt esile kutsutud varase rakuvastuse tekkel inimese primaarsete keratinotsüütide koekultuuris

Lisaks *TSLP* transkriptide ekspressioonile analüüsiti ka põletikku soodustavate tsütokiinide *IL-8*, *CCL5* ja *CXCL10* mRNA ekspressiooni muutusi MC903 või poly I:C eeltötlusega stimulatsioonikatses, et hinnata, kas keratinotsüütides indutseeritakse põletikuvastus (Joonis 9).



Joonis 9. Põletikuliste tsütokiinide ekspressioon poly I:C ja MC903 eeltötlusega stimulatsioonil. Inimese primaarseid keratinotsüüte stimuleeriti 12 tunni vältel poly I:C või MC903ga eeltötlusega. Rakkudele lisati MC903, poly I:C või vastavaid kontrollid (MC903 puhul DMSO, poly I:C puhul füsioloogilist lahust) ning 6 tunni möödudes lisati rakkudele uus stimulatsioonisegu (vt. Tabel 1.) Negatiivse kontrollina (NEG) kasutati stimuleerimata rakke. *IL-8*, *CCL5* ja *CXCL10* geeniekspressioon tase määrati RT-qPCR meetodil ja väärtused normaliseeriti *EEF1A1* ja negatiivse kontrolli suhtes. Graafikutulemused on esitatud koos standardveaga, statistiliseks analüüsiks kasutati ühe-suunalist ANOVA testi. Graafikul on toodud peamised katses oluliste võrdluste statistilised ekspresseerimismuutused. N=3-4, * P < 0.05; *** P < 0.001; **** P < 0.0001.

Joonisel 9 toodud analüüsi tulemuste põhjal selgus, et *IL-8* ekspressioon on indutseeritud statistilise olulisusega kõikide stimulatsioonide puhul välja arvatud poly I:C töötlusel 12 tunni ajapunktis. Kõige rohkem oli *IL-8* ekspresseerunud MC903 12h + poly I:C 6h stimulatsioonil. On märkimisväärne, et stimulatsioonil MC903 12h + poly I:C 6h on *IL-8* ekspressioon suurenenud võrreldes poly I:C 6h töötlusel. Samuti kasvas *IL-8* ekspressioon poly I:C 12h + MC903 6h stimulatsioonil võrreldes poly I:C 12h stimulatsiooniga. *CCL5* ekspressioon oli indutseeritud poly I:C töötlusel 6h ja 12h ajapunktis ning ka MC903 12h + poly I:C 6h ja

poly I:C 12h + MC903 6h stimulatsioonil. Ainult MC903ga rakkude töötlemisel *CCL5* ekspressiooni suurenemist ei tuvastatud, mis on huvitav, sest stimulatsioonil, kus rakke töödeldi poly I:Cga ja 6h ajapunktis lisati MC903 (poly I:C 12h + MC903), on *CCL5* ekspressioon võrreldes ainult poly I:C 12h stimulatsiooniga kasvanud. *CXCL10* ekspressioon oli statistiliselt olulisel määral suurenenud poly I:C stimulatsioonil 6h ja 12h ajapunktis ning poly I:C 12h + MC903 6h stimulatsioonil. MC903ga rakkude töötlemine *CXCL10* ekspressiooni ei indutseerinud. Sarnaselt *CCL5* ekspressioonimuutusele oli ka *CXCL10* ekspressioon suurenenud poly I:C 12h + MC903 6h stimulatsioonil võrreldes ainult poly I:C 12h rakkude töötlusega. Erinevalt *CCL5* ekspressioonimuutustest polnud aga MC903 12h + poly I:C 6h stimulatsiooni korral *CXCL10* ekspressiooni muutust töötlemata rakkude suhtes näha.

2.4. Arutelu

2009. aastal tuvastati *in silico* meetodil *TSLP* 2 mRNA isovormi *sfTSLP* ja *lfTSLP* (Harada *et al.*, 2009). Arvatakse, et *lfTSLP* üheks funktsiooniks on indutseerida kehas põletikuvastust ja *sfTSLP* funktsiooniks arvatakse olevat homöostaasi tagamine (Dong *et al.*, 2016; Salvati *et al.*, 2021). Varasemas kirjanduses on tekkinud vastuolusid *sfTSLP* ja *lfTSLP* ekspressiooni esinemisel erinevate põletikutekitajate põhjustatud rakuvastustes ning üheks vastuoludega seotud mõjutajaks on olnud vitamiin D ja selle analoogid (Dong *et al.*, 2016; Indra, 2013; Landheer *et al.*, 2015). *In vitro* katsete tulemused inimese primaarsete keratinotsüütide koekultuuris võivad teatud määral erineda erinevate laborite vahel sõltudes rakkude kasvatamisprotokollist ja söötmetingimustest. Seepärast oli antud bakalaureusetöö esimeses etapis soov korrata juba eelnevalt publitseeritud katseid erinevate stimulatsioonidega, mis võiksid *TSLP* ekspressiooni mõjutada.

Käesolevas bakalaureusetöös kasutati esmalt *TSLP* ekspressioonimuutuste uurimiseks praimerikomplekti, mis võimaldas amplifitseerida nii *lfTSLP*d kui ka *sfTSLP*d, mis ühtlasi peegeldab paljudes varasemates publitseeritud töödes teostatud analüüsi, kus *TSLP* erinevaid transkripte ei eristatud. Sellist praimerikomplekti kasutati, et üldistades tuvastada, kas *TSLP* on ekspresseerunud erinevate põletikutekitajate põhjustatud rakuvastuses. Võrreldes antud praimerikomplekti RT-qPCR geeniekspressiooni tulemusi *sfTSLP* ja *lfTSLP* praimerikomplektidega, on näha, et kui vaadelda ainult üldist *TSLP* ekspressiooni, siis nende

tulemuste analüüs võib viia valejäreldustele ning näitlikustab kuidas saavad kergesti tekkida vastuolulised teadustulemused *TSLP* pro- ja antiinflammatoorsetest mõjudest.

Töös kinnitati, et inimese primaarsetes keratinotsüütides on atoopilise dermatiidi „kokteili“ (*IL-4 + IL-13 + TNF α*), dsRNA viiruse analoogi (poly I:C) ja vitamiin D analoogi (MC903) stimulatsiooni puhul *TSLP* ekspresseeritud (Kinoshita *et al.*, 2009; Y. Xie *et al.*, 2012). Katsete tulemusel leiti kinnitust, et *lfTSLP* on peamiselt ekspresseeritud põletikuvastust indutseerivate stimulatsioonide (*IL-4 + IL-13 + TNF α* ja poly I:C) korral ja *sfTSLP* on ekspresseeritud vitamiin D analoogi MC903 puhul, mida kinnitavad ka varasemad publikatsioonid (Dong *et al.*, 2016; Y. Xie *et al.*, 2012).

Varasemates publikatsioonides on näidatud vitamiin D antiinflammatoorseid omadusi ja tugevat seost immuunsüsteemi regulatsioonis (L Bishop *et al.*, 2021). Lisaks keratinotsüütidele on enamustes immuunrakkudes, eriti APCdes, on ekspresseeritud vitamiin D retseptorid, mis näitab vitamiin D või tema agonistide olulisust immuunvastuse reguleerimisel (Bikle, 2012; Veldman *et al.*, 2000). Kuna *sfTSLP* transkriptsioon arvatakse olevat vahendatud läbi VDRi (Tsilingiri *et al.*, 2017), otsustati antud bakalaureusetöö raames katsetada vitamiin D analoogi kaltsipotriooli eeltötluse mõju poly I:C vahendatud rakuvastusele, et teada saada, kas toimub muutusi ka *TSLP* transkriptide ekspressiooni tasemel.

Kuna nii *lfTSLP* kui ka *sfTSLP* ekspressiooni muutus olid tuvastatavad varases rakuvastuses 6h ajapunktis, otsustati uurida MC903 vahendatud rakuvastuse mõju poly I:C põhjustatud põletikuvastusele just katseskeemiga 6h+6h stimulatsiooniga. Et jäljendada võimalikult elulist situatsiooni inimkehas, ei vahetatud 6h ajapunktis enne uut stimulatsiooni rakkudel söödet.

SfTSLP ekspressiooni indutseeris MC903 nii 6h kui ka 12h ajapunktis. On huvitav, et stimulatsioonil, kus MC903le lisati 6h ajapunktis poly I:Cd kasvas *sfTSLP* ekspressioon võrreldes 12h MC903 kontrolliga. Selline *sfTSLP* kõrgeenenud ekspressioon viitab, et poly I:C vahendatud rakuvastus võib võimendada *sfTSLP* ekspressiooni kui *sfTSLP* on juba eelnevalt MC903 poolt indutseeritud. *LfTSLP* oli ekspresseeritud 6h ja 12h poly I:C stimulatsioonide korral, kuid MC903 puhul mitte. On tähelepanuväärne, et stimulatsioonil, kuhu oli esmalt lisatud MC903 ja 6h ajapunktis poly I:C, oli *lfTSLP* ekspressioon võrreldes 6h poly I:C stimulatsiooniga langenud ning sarnane tulemus saadi ka *TSLP* valgu hulga tuvastamisel. See viitab, et MC903 eeltötlus võib olla oluline faktor dsRNA (poly I:C) poolt esile kutsutud

põletikuvastuse moduleerimisel. Kuna hiire bronhi epiteelirakkudes on näidatud kaltsitriooli ja *sfTSLP* mõju põletikuvastuse alla surumisel (Dong *et al.*, 2016) ning kaltsitriool vähendab põletikku soodustavate tsütokiinide ja kemokiinide tootmist (Barrea *et al.*, 2017), võib vitamiin D analoog MC903 olla potentsiaalne kemikaal ka AD ravis. Erinevused hiire ja inimese *TSLP* transkriptide ja valgu isovormide funktsioonide vahel annavad alust arvata, et *TSLP*-fokuseeritud uuringute tulemused hiiremodelis, kus MC903 soodustab AD fenotüübi teket, ei ole otseselt üle kantavad inimese jaoks (Landheer *et al.*, 2015).

On huvitav, et olukorras, kus rakke stimuleeriti esmalt poly I:Cga ja 6 tunni ajapunktis MC903ga, nähti *lfTSLP* ekspressiooni kasvu võrreldes poly I:C 12h kontrolliga, mis viitab võimalusele, et MC903 võib võimendada ka *lfTSLP* ekspressiooni, kui see on eelnevalt juba poly I:C poolt indutseeritud. Kuigi *lfTSLP* mRNA tase antud stimulatsioonil kasvas, ei esinenud muutust *lfTSLP* valgu tootmises võrreldes poly I:C 12h ajapunktiga. Et erinevust *lfTSLP* valgu tootmises 12h ajapunktis ei tuvastatud, ei saa välistada *lfTSLP* valgu hulga sekreteerimise suurenemist hilisemates ajapunktides.

Käesoleva bakalaureusetöö käigus analüüsiti ka põletikku soodustavate tsütokiinide *IL8*, *CCL5* ja *CXCL10* ekspressioonimuutust MC903 või poly I:C eeltötluse korral. *CCL5* ja *CXCL10* on põletikku soodustavad tsütokiinid, seetõttu olid nad ekspresseerunud peamiselt poly I:Cga stimulatsioonil. MC903 rakkude eeltötlus enne 6h poly I:C stimulatsiooni ei muutnud statistiliselt oluliselt *CCL5* ega ka *CXCL10* ekspressiooni võrreldes ainult 6h poly I:C töötlustega. Küll aga hoopis suurenes nende ekspressioon kui MC903 lisati rakkudele pärast eelnevat poly I:C töötlust. See viitab, et kaltsipotriool võib suurendada põletikuvastust juhul kui see on juba eelnevalt indutseeritud. *IL8* ekspressiooni puhul suurenes ekspressioon nii MC903 lisamisel poly I:Cga eeltöödeldud rakkudele kui ka MC903 eeltötluse korral. *IL8* on tsütokiin, mille üheks funktsiooniks on kutsuda kohale ja aktiveerida neutrofiile (Hammond *et al.*, 1995), seega võib MC903 kasutamine *in vivo* tingimustel teoreetiliselt soodustada neutrofiilide aktivatsiooni.

Antud bakalaureusetöö käigus avastati eelnevalt kirjeldamata fenomen, kus MC903 eeltötlus võib muuta poly I:C poolt esile kutsutud põletikuvastust inimese primaarsetes keratinotsüütides. Selleks, et antud tulemust täpsemalt kinnitada, on edaspidistest katsetes vaja aga analüüsida ka pikemaajajunkte nii mRNA kui ka valgu tasemel detekteerimisel ja

analüüsida lisaks ka MC903 ja poly I:C koosmõju kogu stimulatsiooni vältel. Antud bakalaureusetöö tulemused tõstatasid uusi küsimusi ning antud teema edasine uurimine võib kunagi tuua kasu põletikulise haiguse nagu atoopiline dermatiit ravimisel. Kuigi antud töö tulemustest selgus, et MC903 omab mõju *TSLP* transkriptide ekspressioonile, ei saa nende tulemuste põhjal öelda, et *sfTSLP* otseselt inhibeerib *lfTSLP*-indutseeritud põletikuvastust. Et eristada *sfTSLP* ja MC903 eeltöötamise mõju *lfTSLP* valguga ekspressioonile tuleb järgnevates uuringutes teha kindlaks, kas *sfTSLP* on suuteline inhibeerima *lfTSLP* ekspressiooni ka ilma MC903 eeltöötamiseta.

KOKKUVÕTE

Atoopiline dermatiit (AD) on maailmas enimlevinud krooniline retsiveeruv nahahaigus, mis esineb kuni 20% lastel ja noortel üle maailma (Kowalska-Oleđzka *et al.*, 2019). AD on heterogeenne haigus, mis teeb selle ravimise keeruliseks (Bieber *et al.*, 2017). AD patsientidel on iseloomulik krooniline Th2 tüüpi põletikuseisund, kõrgeenenud seerumi IgE ja eosinofiilide tase (Leung *et al.*, 2004). *TSLP* on tsütokiin, mis aktiveerib CD4⁺ T-rakke ja dendriittrakke ning soodustab Th2 põletikuseisundi teket (Al-Shami *et al.*, 2005). Atoopilise dermatiidi patsientide nahas on kõrgelt ekspresseerunud *TSLP* (Soumelis *et al.*, 2002).

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärk oli välja selgitada *lfTSLP* ja *sfTSLP* suhtelised ekspressioonitasemed *IL-4 + IL-13 + TNF α* , *IL-4 + HDM*, poly I:C ja kaltsipotriooli poolt esile kutsutud rakuvastuses inimese primaarsete keratinotsüütide koekultuuris ning hinnata kaltsipotriooli eeltötluse mõju poly I:C poolt esile kutsutud rakuvastuse tekkel.

Läbiviidud katsete tulemused näitasid, et *lfTSLP* on peamiselt ekspresseeritud põletikuvastust indutseerivate stimulatsioonide (*IL-4 + IL-13 + TNF α* ja poly I:C) korral ja *sfTSLP* on peamiselt ekspresseeritud vitamiin D analoogi MC903 stimulatsiooni puhul. Samuti leiti, et inimese epidermaalsete keratinotsüütide MC903 eeltötlusega suruti alla poly I:C poolt esile kutsutud varajases rakuvastuses *lfTSLP* ekspressioon. Kui aga stimuleeriti poly I:C eeltötlusega rakke MC903ga, võimendus *lfTSLP* ekspressioon. Järgnevalt analüüsiti *lfTSLP* valgu hulga muutust poly I:C või MC903 eeltötlusega stimulatsioonil. Katse tulemustest selgus, et *lfTSLP* valk oli ekspresseeritud poly I:Cga stimulatsioonil, kuid on huvitav, et MC903 eeltötlusega keratinotsüütides poly I:C lisamisel *lfTSLP* valgu hulga muutust võrreldes töötlemata rakkudega enam ei tuvastatud. Kõikide nende tulemuste põhjal selgus antud bakalaureusetöö raames, et MC903 omab mõju *TSLP* transkriptide ekspressioonile, *lfTSLP* valgu ekspressioonile ja põletikuvastuse tekkele inimese primaarsete keratinotsüütide koekultuuris.

Induction and detection of *TSLP* transcripts expressed in human primary keratinocyte cell culture

Georg-Kennet Gutman

Summary

Atopic dermatitis (AD) is the most common chronic recurrent skin disease in the world, affecting up to 20% of children and adolescents worldwide (Kowalska-Olędzka *et al.*, 2019). AD is characterized by a chronic Th2-type inflammatory condition, elevated serum IgE, and eosinophil levels (Leung *et al.*, 2004). *TSLP* is a cytokine that activates CD4 + T cells and dendritic cells to induce the development of a Th2 inflammatory state (Al-Shami *et al.*, 2005). *TSLP* is highly expressed in the skin of patients with AD (Soumelis *et al.*, 2002).

The aim of this bachelor's thesis was to determine the relative expression levels of *lfTSLP* and *sfTSLP* in the cell response elicited by *IL-4 + IL-13 + TNF α* , *IL-4 + HDM*, poly I:C and calcipotriol in human primary keratinocyte tissue culture and to evaluate the effect of calcipotriol pretreatment in the development of a cellular response elicited by poly I:C.

The results of the experiments showed that *lfTSLP* was mainly expressed in stimulations that induce an inflammatory response (*IL-4 + IL-13 + TNF α* and poly I:C) and that *sfTSLP* was mainly expressed upon stimulation with vitamin D analogue MC903. It was also found that MC903 pretreatment suppressed *lfTSLP* expression in the poly I:C-induced early cellular response. However, when poly I:C pretreated cells were stimulated with MC903, *lfTSLP* expression was enhanced. Subsequently, the change in *lfTSLP* protein upon poly I: C or MC903 pretreatment stimulation was analyzed. The results of the experiment showed that the *lfTSLP* protein was highly expressed upon stimulation with poly I: C, but interestingly, MC903 pretreatment reduced the amount of *lfTSLP* protein to a similar level as in untreated cells. Based on all of these results, MC903 was found to influence the expression of *TSLP* transcripts, *lfTSLP* protein and the development of an inflammatory response in human primary keratinocyte tissue culture.

TÄNUAVALDUSED

Soovin tänada oma juhendajat Martin Pooki, kes abistas katsete planeerimisel ja tulemuste analüüsimisel ning andis kogu bakalaureusetöö vältel vahetut tagasisidet. Lisaks soovin tänada oma juhendajat Karl Jürgensteini ja RNA bioloogia töögrupi liikmeid, kes mind aitasid ja toetasid.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Adams, J. S., & Hewison, M. (2010). Update in Vitamin D. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 95(2), 471–478. <https://doi.org/10.1210/jc.2009-1773>
- Aggarwal, B. B. (2004). Nuclear factor- κ B: The enemy within. *Cancer Cell*, 6(3), 203–208. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2004.09.003>
- Akdis, M., Aab, A., Altunbulakli, C., Azkur, K., Costa, R. A., Cramer, R., Duan, S., Eiwegger, T., Eljaszewicz, A., Ferstl, R., Frei, R., Garbani, M., Globinska, A., Hess, L., Huitema, C., Kubo, T., Komlosi, Z., Konieczna, P., Kovacs, N., ... Akdis, C. A. (2016). Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor β , and TNF- α : Receptors, functions, and roles in diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 138(4), 984–1010. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.06.033>
- Allakhverdi, Z., Comeau, M. R., Jessup, H. K., Yoon, B.-R. P., Brewer, A., Chartier, S., Paquette, N., Ziegler, S. F., Sarfati, M., & Delespesse, G. (2007). Thymic stromal lymphopoietin is released by human epithelial cells in response to microbes, trauma, or inflammation and potently activates mast cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 204(2), 253–258.
- Al-Shami, A., Spolski, R., Kelly, J., Keane-Myers, A., & Leonard, W. J. (2005). A role for TSLP in the development of inflammation in an asthma model. *Journal of Experimental Medicine*, 202(6), 829–839. <https://doi.org/10.1084/jem.20050199>
- Baeke, F., Takiishi, T., Korf, H., Gysemans, C., & Mathieu, C. (2010). Vitamin D: modulator of the immune system. *Cancer/Immunomodulation*, 10(4), 482–496. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2010.04.001>
- Barrea, L., Savanelli, M. C., Di Somma, C., Napolitano, M., Megna, M., Colao, A., & Savastano, S. (2017). Vitamin D and its role in psoriasis: An overview of the dermatologist and nutritionist. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 18(2), 195–205. <https://doi.org/10.1007/s11154-017-9411-6>
- Bieber, T., D'Erme, A. M., Akdis, C. A., Traidl-Hoffmann, C., Lauener, R., Schäppi, G., & Schmid-Grendelmeier, P. (2017). Clinical phenotypes and endophenotypes of atopic dermatitis: Where are we, and where should we go? *Meeting the Challenges of Atopic Dermatitis*, 139(4, Supplement), S58–S64. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.01.008>
- Bikle, D.D. (2012) Vitamin D and the skin: Physiology and pathophysiology. *Rev Endocr Metab Disord* 13, 3-19. <https://doi.org/10.1007/s11154-011-9194-0>
- Bjerkas, L., Schreurs, O., Engen, S. A., Jahnsen, F. L., Baekkevold, E. S., Blix, I. J., & Schenck, K. (2015). The short form of TSLP is constitutively translated in human keratinocytes and has characteristics of an antimicrobial peptide. *Mucosal Immunology*, 8(1), 49–56. <https://doi.org/10.1038/mi.2014.41>
- Bogiatzi, S. I., Fernandez, I., Bichet, J.-C., Marloie-Provost, M.-A., Volpe, E., Sastre, X., & Soumelis, V. (2007). Cutting Edge: Proinflammatory and Th2 Cytokines Synergize to Induce Thymic Stromal Lymphopoietin Production by Human Skin Keratinocytes. *The Journal of Immunology*, 178(6), 3373. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.6.3373>
- Boulaïs, N., & Misery, L. (2007). Merkel cells. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 57(1), 147–165. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2007.02.009>
- Briot, A., Deraison, C., Lacroix, M., Bonnart, C., Robin, A., Besson, C., Dubus, P., & Hovnanian, A. (2009). Kallikrein 5 induces atopic dermatitis-like lesions through PAR2-mediated thymic stromal lymphopoietin expression in Netherton syndrome. *Journal of Experimental Medicine*, 206(5), 1135–1147.
- Carlberg C. (2003). Molecular basis of the selective activity of vitamin D analogues. *Journal of cellular biochemistry*, 88(2), 274–281. <https://doi.org/10.1002/jcb.10337>
- Cianferoni, A., & Spergel, J. (2014). The importance of TSLP in allergic disease and its role as a potential therapeutic target. *Expert Review of Clinical Immunology*, 10(11), 1463–1474.

- Cultrone, A., de Wouters, T., Lakhdari, O., Kelly, D., Mulder, I., Logan, E., Lapaque, N., Doré, J., & Blottière, H. M. (2013). The NF- κ B binding site located in the proximal region of the TSLP promoter is critical for TSLP modulation in human intestinal epithelial cells. *European Journal of Immunology*, 43(4), 1053–1062.
- Daly, C. H. (1982). Biomechanical Properties of Dermis. *Journal of Investigative Dermatology*, 79(1, Supplement), 17–20. <https://doi.org/10.1038/jid.1982.4>
- Dinareello, C. A. (2000). Proinflammatory Cytokines. *Chest*, 118(2), 503–508. <https://doi.org/10.1378/chest.118.2.503>
- Dong, H., Hu, Y., Liu, L., Zou, M., Huang, C., Luo, L., Yu, C., Wan, X., Zhao, H., Chen, J., Xie, Z., Le, Y., Zou, F., & Cai, S. (2016). Distinct roles of short and long thymic stromal lymphopoietin isoforms in house dust mite-induced asthmatic airway epithelial barrier disruption. *Scientific Reports*, 6(1), 39559. <https://doi.org/10.1038/srep39559>
- Egawa, G., & Kabashima, K. (2016). Multifactorial skin barrier deficiency and atopic dermatitis: Essential topics to prevent the atopic march. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 138(2), 350–358.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.06.002>
- Elder, M. J., Webster, S. J., Williams, D. L., Gaston, J. S. H., & Goodall, J. C. (2016). TSLP production by dendritic cells is modulated by *IL-1 β* and components of the endoplasmic reticulum stress response. *European Journal of Immunology*, 46(2), 455–463. <https://doi.org/10.1002/eji.201545537>
- Esche, C., de Benedetto, A., & Beck, L. A. (2004). Keratinocytes in Atopic dermatitis: Inflammatory signals. *Current Allergy and Asthma Reports*, 4(4), 276–284. <https://doi.org/10.1007/s11882-004-0071-8>
- Fornasa, G., Tsilingiri, K., Caprioli, F., Botti, F., Mapelli, M., Meller, S., Kislat, A., Homey, B., Di Sabatino, A., Sonzogni, A., Viale, G., Diaferia, G., Gori, A., Longhi, R., Penna, G., & Rescigno, M. (2015). Dichotomy of short and long thymic stromal lymphopoietin isoforms in inflammatory disorders of the bowel and skin. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 136(2), 413–422. PubMed. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.04.011>
- Friedlander, S. L., & Busse, W. W. (2005). The role of rhinovirus in asthma exacerbations. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 116(2), 267–273. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2005.06.003>
- Friend, S. L., Hosier, S., Nelson, A., Foxworthe, D., Williams, D. E., & Farr, A. (1994). A thymic stromal cell line supports in vitro development of surface IgM+ B cells and produces a novel growth factor affecting B and T lineage cells. *Experimental Hematology*, 22(3), 321–328.
- Ginhoux, F., Tacke, F., Angeli, V., Bogunovic, M., Loubeau, M., Dai, X.-M., Stanley, E. R., Randolph, G. J., & Merad, M. (2006). Langerhans cells arise from monocytes in vivo. *Nature Immunology*, 7(3), 265–273. <https://doi.org/10.1038/ni1307>
- Green, E. M., Mansfield, J. C., Bell, J. S., & Winlove, C. P. (2014). The structure and micromechanics of elastic tissue. *Interface Focus*, 4(2), 20130058–20130058. PubMed. <https://doi.org/10.1098/rsfs.2013.0058>
- Hammond, M. E., Lapointe, G. R., Feucht, P. H., Hilt, S., Gallegos, C. A., Gordon, C. A., Giedlin, M. A., Mullenbach, G., & Tekamp-Olson, P. (1995). IL-8 induces neutrophil chemotaxis predominantly via type I IL-8 receptors. *The Journal of Immunology*, 155(3), 1428.
- Hanabuchi, S., Ito, T., Park, W.-R., Watanabe, N., Shaw, J. L., Roman, E., Arima, K., Wang, Y.-H., Voo, K. S., Cao, W., & Liu, Y.-J. (2010). Thymic stromal lymphopoietin-activated plasmacytoid dendritic cells induce the generation of FOXP3+ regulatory T cells in human thymus. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 184(6), 2999–3007. PubMed. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0804106>
- Harada, M., Hirota, T., Jodo, A. I., Doi, S., Kameda, M., Fujita, K., Miyatake, A., Enomoto, T., Noguchi, E., Yoshihara, S., Ebisawa, M., Saito, H., Matsumoto, K., Nakamura, Y., Ziegler, S. F., & Tamari, M. (2009). Functional Analysis of the Thymic Stromal Lymphopoietin Variants in Human Bronchial

- Epithelial Cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 40(3), 368–374. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2008-0041OC>
- Harada, M., Hirota, T., Jodo, A. I., Hitomi, Y., Sakashita, M., Tsunoda, T., Miyagawa, T., Doi, S., Kameda, M., Fujita, K., Miyatake, A., Enomoto, T., Noguchi, E., Masuko, H., Sakamoto, T., Hizawa, N., Suzuki, Y., Yoshihara, S., Adachi, M., ... Tamari, M. (2011). Thymic stromal lymphopoietin gene promoter polymorphisms are associated with susceptibility to bronchial asthma. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 44(6), 787–793. PubMed. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2009-0418OC>
- Harhaj, E. W., & Shembade, N. (2020). Lymphotropic Viruses: Chronic Inflammation and Induction of Cancers. *Biology*, 9(11). <https://doi.org/10.3390/biology9110390>
- Holick, M. F. (2003). Vitamin D: A millenium perspective. *Journal of Cellular Biochemistry*, 88(2), 296–307.
- Honari, G., Andersen, R., Maibach, H.-I. (2017). *Sensitive Skin Syndrome 2nd Edition*, Boca Raton: CRC Press
- Hu, Y., Dong, H., Zou, M., Huang, C., Luo, L., Yu, C., Chen, J., Xie, Z., Zhao, H., Le, Y., Zou, F., Liu, L., & Cai, S. (2017). TSLP signaling blocking alleviates E-cadherin dysfunction of airway epithelium in a HDM-induced asthma model. *Cellular Immunology*, 315, 56–63. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2017.02.003>
- Ibrahim, H. M., El-Taieb, M. A., Hassan, M. H., Mohamed, A. A. E., Kotop, E. A., Abd-ellah, O. H., & Hegazy, E. M. (2020). Relations between vitamin D3, total and specific IgE for house dust mites in atopic dermatitis patients. *Scientific Reports*, 10(1), 21000. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77968-1>
- Indra, A. K. (2013). Epidermal TSLP: a trigger factor for pathogenesis of atopic dermatitis. *Expert Review of Proteomics*, 10(4), 309–311. PubMed. <https://doi.org/10.1586/14789450.2013.814881>
- Isaksen, D. E., Baumann, H., Trobridge, P. A., Farr, A. G., Levin, S. D., & Ziegler, S. F. (1999). Requirement for Stat5 in Thymic Stromal Lymphopoietin-Mediated Signal Transduction. *The Journal of Immunology*, 163(11), 5971.
- Kakinuma, T., Nakamura, K., Wakugawa, M., Mitsui, H., Tada, Y., Saeki, H., Torii, H., Asahina, A., Onai, N., Matsushima, K., & Tamaki, K. (2001). Thymus and activation-regulated chemokine in atopic dermatitis: Serum thymus and activation-regulated chemokine level is closely related with disease activity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 107(3), 535–541. <https://doi.org/10.1067/mai.2001.113237>
- Kashyap, M., Rochman, Y., Spolski, R., Samsel, L., & Leonard, W. J. (2011). Thymic Stromal Lymphopoietin Is Produced by Dendritic Cells. *The Journal of Immunology*, 187(3), 1207. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100355>
- Kato, A., Favoreto, S., Avila, P. C., & Schleimer, R. P. (2007). TLR3-and Th2 cytokine-dependent production of thymic stromal lymphopoietin in human airway epithelial cells. *The Journal of Immunology*, 179(2), 1080–1087.
- Kim, D.-H., Meza, C. A., Clarke, H., Kim, J.-S., & Hickner, R. C. (2020). Vitamin D and endothelial function. *Nutrients*, 12(2), 575.
- Kinoshita, H., Takai, T., Anh Le, T., Kamijo, S., Ling Wang, X., Ushio, H., Hara, M., Kawasaki, J., Tuan Vu, A., Ogawa, T., Gunawan, H., Ikeda, S., Okumura, K., & Ogawa, H. (2009). Cytokine milieu modulates release of thymic stromal lymphopoietin from human keratinocytes stimulated with double-stranded RNA. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 123(1), 179–186. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2008.10.008>
- Kowalska-Olędzka, E., Czarnecka, M., & Baran, A. (2019). Epidemiology of atopic dermatitis in Europe. *Journal of Drug Assessment*, 8(1), 126–128. <https://doi.org/10.1080/21556660.2019.1619570>

- Koyama, K., Ozawa, T., Hatsushika, K., Ando, T., Takano, S., Wako, M., Suenaga, F., Ohnuma, Y., Ohba, T., Katoh, R., Sugiyama, H., Hamada, Y., Ogawa, H., Okumura, K., & Nakao, A. (2007). A possible role for TSLP in inflammatory arthritis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 357(1), 99–104. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.03.081>
- L Bishop, E., Ismailova, A., Dimeloe, S., Hewison, M., & White, J. H. (2021). Vitamin D and Immune Regulation: Antibacterial, Antiviral, Anti-Inflammatory. *JBMR Plus*, 5(1), e10405. <https://doi.org/10.1002/jbm4.10405>
- Landheer, J., Giovannone, B., Sadekova, S., Tjabringa, S., Hofstra, C., Dechering, K., Bruijnzeel-Koomen, C., Chang, C., Ying, Y., de Waal Malefyt, R., Hijnen, D., & Knol, E. (2015). TSLP is differentially regulated by vitamin D3 and cytokines in human skin. *Immunity, Inflammation and Disease*, 3(1), 32–43. PubMed. <https://doi.org/10.1002/iid3.48>
- Larson, R. P., Comeau, M. R., & Ziegler, S. F. (2013). Cutting Edge: Allergen-Specific CD4 T Cells Respond Indirectly to Thymic Stromal Lymphopoietin To Promote Allergic Responses in the Skin. *The Journal of Immunology*, 190(9), 4474. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201677>
- Leung, D. Y. M., Boguniewicz, M., Howell, M. D., Nomura, I., & Hamid, Q. A. (2004). New insights into atopic dermatitis. *The Journal of Clinical Investigation*, 113(5), 651–657. <https://doi.org/10.1172/JCI21060>
- Li Mei, Hener Pierre, Zhang Zhikun, Kato Shigeaki, Metzger Daniel, & Chambon Pierre. (2006). Topical vitamin D3 and low-calcemic analogs induce thymic stromal lymphopoietin in mouse keratinocytes and trigger an atopic dermatitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(31), 11736–11741. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604575103>
- Li, W., Dong, H., Zhao, H., Song, J., Tang, H., Yao, L. ... Cai, S. (2015). 1,25-Dihydroxyvitamin D3 prevents toluene diisocyanate-induced airway epithelial barrier disruption. *International Journal of Molecular Medicine*, 36, 263–270. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2015.2214>
- Li, X.-X., Liu, Y., Luo, J., Huang, Z.-D., Zhang, C., & Fu, Y. (2019). Vitamin D deficiency associated with Crohn's disease and ulcerative colitis: A meta-analysis of 55 observational studies. *Journal of Translational Medicine*, 17(1), 323. <https://doi.org/10.1186/s12967-019-2070-5>
- Liu, Y.-J. (2006). Thymic stromal lymphopoietin: Master switch for allergic inflammation. *Journal of Experimental Medicine*, 203(2), 269–273. <https://doi.org/10.1084/jem.20051745>
- Liu, Y.-J., Soumelis, V., Watanabe, N., Ito, T., Wang, Y.-H., de Waal Malefyt, R., Omori, M., Zhou, B., & Ziegler, S. F. (2007). TSLP: An Epithelial Cell Cytokine that Regulates T Cell Differentiation by Conditioning Dendritic Cell Maturation. *Annual Review of Immunology*, 25(1), 193–219. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141718>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ Method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Mack, M. R., & Kim, B. S. (2018). The Itch–Scratch Cycle: A Neuroimmune Perspective. *Trends in Immunology*, 39(12), 980–991. <https://doi.org/10.1016/j.it.2018.10.001>
- Marković, I., & Savvides, S. N. (2020). Modulation of Signaling Mediated by TSLP and IL-7 in Inflammation, Autoimmune Diseases, and Cancer. *Frontiers in Immunology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01557>
- Matsui, T., Miyamoto, K., Kubo, A., Kawasaki, H., Ebihara, T., Hata, K., Tanahashi, S., Ichinose, S., Imoto, I., Inazawa, J., Kudoh, J., & Amagai, M. (2011). SASPase regulates stratum corneum hydration through profilaggrin-to-filaggrin processing. *EMBO Molecular Medicine*, 3(6), 320–333. PubMed. <https://doi.org/10.1002/emmm.201100140>

- Menon, G. K., Cleary, G. W., & Lane, M. E. (2012). The structure and function of the stratum corneum. *International Journal of Pharmaceutics*, 435(1), 3–9. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.06.005>
- Mesila, I., Jõeste, E., Reintam, M.-A., Tamm, H., Riispre, Ž., Murde, M., Roosipuu, R. (2012). *Patoanatoomia*. Tartu: Tartu Ülikooli Kirjastus.
- Moosbrugger-Martinz, V., Schmuth, M., & Dubrac, S. (2017). A Mouse Model for Atopic Dermatitis Using Topical Application of Vitamin D3 or of Its Analog MC903. *Methods Mol Biol*, 1559, 91–106. PubMed. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6786-5_8
- Nakajo, T., Katayoshi, T., Kitajima, N., & Tsuji-Naito, K. (2021). 1,25-Dihydroxyvitamin D3 attenuates *IL-1β* secretion by suppressing NLRP1 inflammasome activation by upregulating the NRF2-HO-1 pathway in epidermal keratinocytes. *Redox Biology*, 48, 102203. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.102203>
- Nutten, S. (2015). Atopic Dermatitis: Global Epidemiology and Risk Factors. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 66(suppl 1)(Suppl. 1), 8–16. <https://doi.org/10.1159/000370220>
- Ovaere, P., Lippens, S., Vandenabeele, P., & Declercq, W. (2009). The emerging roles of serine protease cascades in the epidermis. *Trends in Biochemical Sciences*, 34(9), 453–463. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2009.08.001>
- Pandey, A., Ozaki, K., Baumann, H., Levin, S. D., Puel, A., Farr, A. G., Ziegler, S. F., Leonard, W. J., & Lodish, H. F. (2000). Cloning of a receptor subunit required for signaling by thymic stromal lymphopoietin. *Nature Immunology*, 1(1), 59–64. <https://doi.org/10.1038/76923>
- Park, L. S., Martin, U., Garka, K., Gliniak, B., Di Santo, J. P., Muller, W., Largaespada, D. A., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., & Farr, A. G. (2000). Cloning of the murine thymic stromal lymphopoietin (TSLP) receptor: Formation of a functional heteromeric complex requires interleukin 7 receptor. *The Journal of Experimental Medicine*, 192(5), 659–670.
- Perkins, C., Wills-Karp, M., & Finkelman, F. D. (2006). *IL-4* induces *IL-13*–independent allergic airway inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 118(2), 410–419. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2006.06.004>
- Proksch, E., Brandner, J. M., & Jensen, J.-M. (2008). The skin: An indispensable barrier. *Experimental Dermatology*, 17(12), 1063–1072.
- Reche, P. A., Soumelis, V., Gorman, D. M., Clifford, T., Liu, M., Travis, M., Zurawski, S. M., Johnston, J., Liu, Y.-J., & Spits, H. (2001). Human thymic stromal lymphopoietin preferentially stimulates myeloid cells. *The Journal of Immunology*, 167(1), 336–343.
- Redhu, N. S., Saleh, A., Halayko, A. J., Ali, A. S., & Gounni, A. S. (2011). Essential role of NF-κB and AP-1 transcription factors in TNF-α-induced TSLP expression in human airway smooth muscle cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 300(3), L479–L485.
- Rushmer, R. F., Konrad J. K. Buettner, Short, J. M., & Odland, G. F. (1966). The Skin. *Science*, 154(3747), 343–348. JSTOR.
- Salvati, L., Maggi, L., Annunziato, F., & Cosmi, L. (2021). Thymic stromal lymphopoietin and alarmins as possible therapeutic targets for asthma. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 21(6). https://journals.lww.com/co-allergy/Fulltext/2021/12000/Thymic_stromal_lymphopoietin_and_alarmins_as.11.aspx
- Schauber, J., & Gallo, R. L. (2008). Antimicrobial peptides and the skin immune defense system. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 122(2), 261–266. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2008.03.027>
- Sethi, G., Sung, B., & Aggarwal, B. B. (2008). TNF: a master switch for inflammation to cancer. *Front Biosci*, 13(2), 5094–5107.

- Shannon, J. L., Corcoran, D. L., Murray, J. C., Ziegler, S. F., MacLeod, A. S., & Zhang, J. Y. (2022). Thymic stromal lymphopoietin controls hair growth. *Stem Cell Reports*, 17(3), 649–663. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2022.01.017>
- Sigurs, N., Gustafsson, P. M., Bjarnason, R., Lundberg, F., Schmidt, S., Sigurbergsson, F., & Kjellman, B. (2005). Severe respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy and asthma and allergy at age 13. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 171(2), 137–141.
- Simon, D., & Kernland Lang, K. (2011). Atopic dermatitis: From new pathogenic insights toward a barrier-restoring and anti-inflammatory therapy. *Current Opinion in Pediatrics*, 23(6). https://journals.lww.com/co-pediatrics/Fulltext/2011/12000/Atopic_dermatitis__from_new_pathogenic_insights.14.aspx
- Soumelis, V., Reche, P. A., Kanzler, H., Yuan, W., Edward, G., Homey, B., Gilliet, M., Ho, S., Antonenko, S., Lauerma, A., Smith, K., Gorman, D., Zurawski, S., Abrams, J., Menon, S., McClanahan, T., Waal-Malefyt, R. de, Bazan, F., Kastelein, R. A., & Liu, Y.-J. (2002). Human epithelial cells trigger dendritic cell-mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nature Immunology*, 3(7), 673–680. <https://doi.org/10.1038/ni805>
- Structure of the Skin: Dermis*. (2020, May 25). <https://med.libretexts.org/@go/page/7415>
- Tasian, S. K., Doral, M. Y., Borowitz, M. J., Wood, B. L., Chen, I.-M., Harvey, R. C., Gastier-Foster, J. M., Willman, C. L., Hunger, S. P., & Mullighan, C. G. (2012). Aberrant STAT5 and PI3K/mTOR pathway signaling occurs in human CRLF2-rearranged B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 120(4), 833–842.
- Tatsuno, K., Fujiyama, T., Yamaguchi, H., Waki, M., & Tokura, Y. (2015). TSLP Directly Interacts with Skin-Homing Th2 Cells Highly Expressing its Receptor to Enhance IL-4 Production in Atopic Dermatitis. *Journal of Investigative Dermatology*, 135(12), 3017–3024. <https://doi.org/10.1038/jid.2015.318>
- Tomkinson, A., Duez, C., Cieslewicz, G., Pratt, J. C., Joetham, A., Shanafelt, M.-C., Gundel, R., & Gelfand, E. W. (2001). A murine IL-4 receptor antagonist that inhibits IL-4 and IL-13-induced responses prevents antigen-induced airway eosinophilia and airway hyperresponsiveness. *The Journal of Immunology*, 166(9), 5792–5800.
- Tsilingiri, K., Fornasa, G., & Rescigno, M. (2017). Thymic stromal lymphopoietin: To cut a long story short. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 3(2), 174–182.
- Veldman, C. M., Cantorna, M. T., & DeLuca, H. F. (2000). Expression of 1, 25-dihydroxyvitamin D3 receptor in the immune system. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 374(2), 334–338.
- Verstraete, K., Peelman, F., Braun, H., Lopez, J., Van Rompaey, D., Dansercoer, A., Vandenbergh, I., Pauwels, K., Tavernier, J., & Lambrecht, B. N. (2017). Structure and antagonism of the receptor complex mediated by human TSLP in allergy and asthma. *Nat Commun* 8: 14937.
- Verstraete, K., Van Schie, L., Vyncke, L., Bloch, Y., Tavernier, J., Pauwels, E., Peelman, F., & Savvides, S. N. (2014). Structural basis of the proinflammatory signaling complex mediated by TSLP. *Nature Structural & Molecular Biology*, 21(4), 375–382.
- Wills-Karp Marsha & Finkelman Fred D. (2008). Untangling the Complex Web of IL-4- and IL-13-Mediated Signaling Pathways. *Science Signaling*, 1(51), pe55–pe55. <https://doi.org/10.1126/scisignal.1.51.pe55>
- Xie, J., Hao, T., Li, C., Wang, X., Yu, X., & Liu, L. (2019). Automatic evaluation of stratum basale and dermal papillae using ultrahigh resolution optical coherence tomography. *Biomedical Signal Processing and Control*, 53, 101527. <https://doi.org/10.1016/j.bspc.2019.04.004>
- Xie, Y., Takai, T., Chen, X., Okumura, K., & Ogawa, H. (2012). Long TSLP transcript expression and release of TSLP induced by TLR ligands and cytokines in human keratinocytes. *Journal of Dermatological Science*, 66(3), 233–237. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2012.03.007>
- Yousef, H., Alhajj, M., & Sharma, S. (2020). *Anatomy, Skin (Integument), Epidermis*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL). <http://europepmc.org/books/NBK470464>

- Zelová, H., & Hošek, J. (2013). TNF- α signalling and inflammation: Interactions between old acquaintances. *Inflammation Research*, 62(7), 641–651. <https://doi.org/10.1007/s00011-013-0633-0>
- Ziegler, S. F., & Artis, D. (2010). Sensing the outside world: TSLP regulates barrier immunity. *Nature Immunology*, 11(4), 289–293. <https://doi.org/10.1038/ni.1852>
- Zurawski, S. M., Chomarat, P., Djossou, O., Bidaud, C., McKenzie, A. N., Miossec, P., Banchereau, J., & Zurawski, G. (1995). The Primary Binding Subunit of the Human Interleukin-4 Receptor Is Also a Component of the Interleukin-13 Receptor*. *Journal of Biological Chemistry*, 270(23), 13869–13878.

Kasutatud veebiaadressid

Kõivist, T. (2015). Atoopiline dermatiit ehk nahapõletik. Loetud aadressil:

<https://www.kliinikum.ee/patsiendiinfo-andmebaas/atoopiline-dermatiit-ehk-nahapõletik/>

TSLP geen (*Homo sapiens*), NCBI andmebaas, külastatud 05.05.2022 aadressil:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/85480>

Tslp geen (*Mus musculus*), NCBI andmebaas, külastatud 05.05.2022 aadressil:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/53603>

LISAD

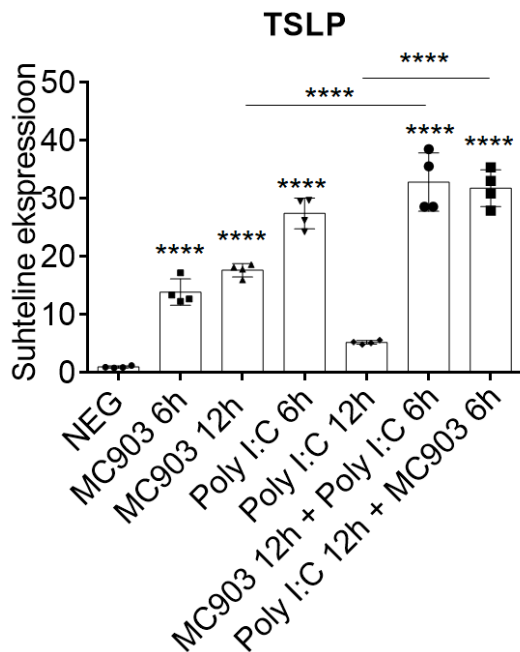
Lisa 1. *SfTLSP* ja *lftSLP* ekspressiooni statistiline analüüs poly I:C või MC903 eeltöötusega stimulatsioonil

lftSLP:

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary
NEG vs. MC903 6h	-0.2875	-28.66 to 28.09	No	ns
NEG vs. MC903 12h	-0.0275	-28.40 to 28.35	No	ns
NEG vs. Poly I:C 6h	-182.8	-211.1 to -154.4	Yes	****
NEG vs. Poly I:C 12h	-29.57	-57.95 to -1.198	Yes	*
NEG vs. MC903 12h + Poly I:C 6h	-60.04	-88.41 to -31.67	Yes	****
NEG vs. Poly I:C 12h + MC903 6h	-175.1	-203.5 to -146.7	Yes	****
MC903 6h vs. MC903 12h	0.2600	-28.11 to 28.63	No	ns
MC903 6h vs. Poly I:C 6h	-182.5	-210.9 to -154.1	Yes	****
MC903 6h vs. Poly I:C 12h	-29.29	-57.66 to -0.9106	Yes	*
MC903 6h vs. MC903 12h + Poly I:C 6h	-59.75	-88.13 to -31.38	Yes	****
MC903 6h vs. Poly I:C 12h + MC903 6h	-174.8	-203.2 to -146.4	Yes	****
MC903 12h vs. Poly I:C 6h	-182.7	-211.1 to -154.4	Yes	****
MC903 12h vs. Poly I:C 12h	-29.55	-57.92 to -1.171	Yes	*
MC903 12h vs. MC903 12h + Poly I:C 6h	-60.01	-88.39 to -31.64	Yes	****
MC903 12h vs. Poly I:C 12h + MC903 6h	-175.1	-203.5 to -146.7	Yes	****
Poly I:C 6h vs. Poly I:C 12h	153.2	124.8 to 181.6	Yes	****
Poly I:C 6h vs. MC903 12h + Poly I:C 6h	122.7	94.36 to 151.1	Yes	****
Poly I:C 6h vs. Poly I:C 12h + MC903 6h	7.665	-20.71 to 36.04	No	ns
Poly I:C 12h vs. MC903 12h + Poly I:C 6h	-30.47	-58.84 to -2.093	Yes	*
Poly I:C 12h vs. Poly I:C 12h + MC903 6h	-145.5	-173.9 to -117.2	Yes	****
MC903 12h + Poly I:C 6h vs. Poly I:C 12h + MC903 6h	-115.1	-143.4 to -86.69	Yes	****

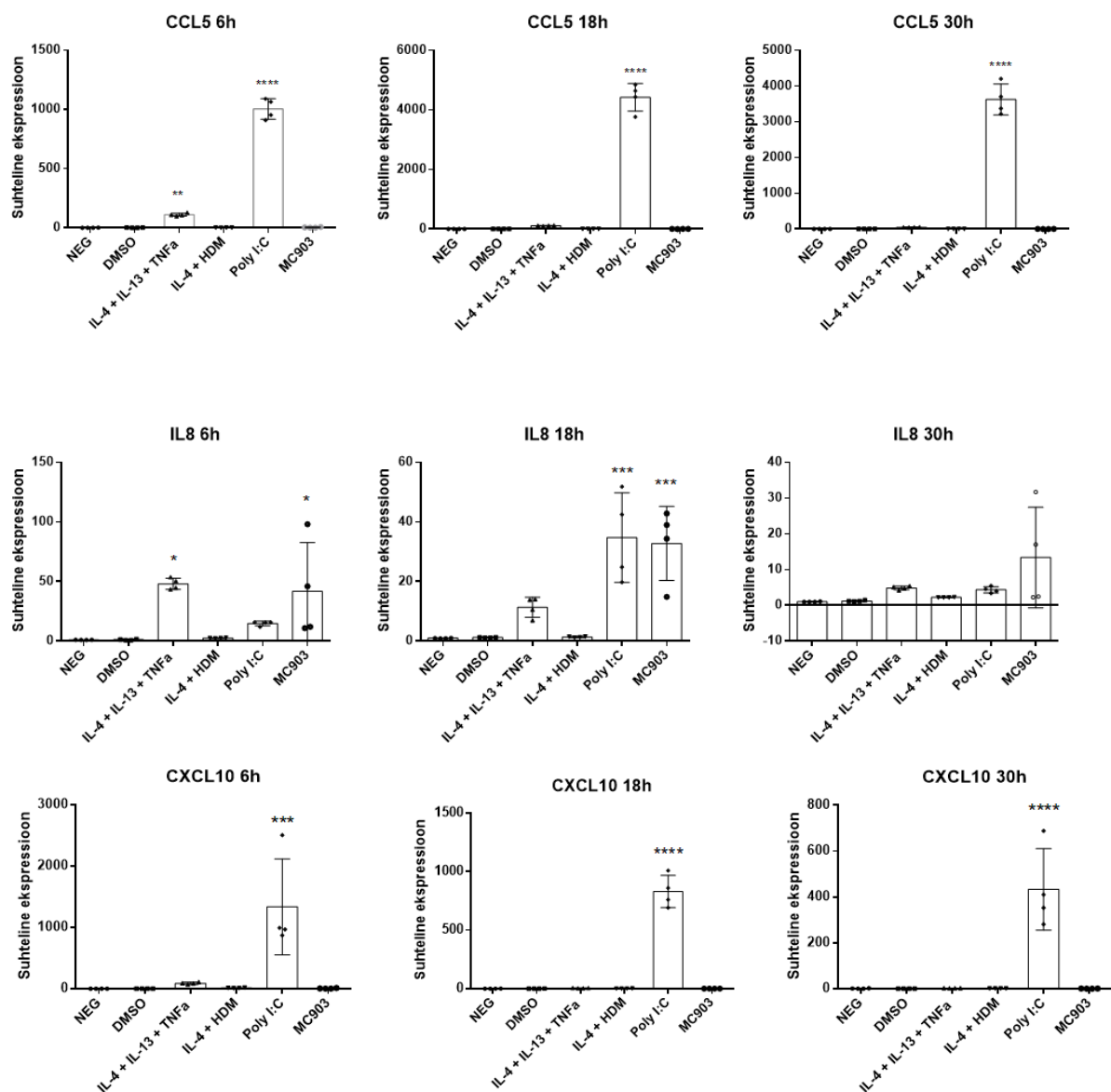
sfTLSP:

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary
NEG vs. MC903 6h	-3.603	-5.161 to -2.044	Yes	****
NEG vs. MC903 12h	-4.770	-6.328 to -3.212	Yes	****
NEG vs. Poly I:C 6h	-0.6325	-2.191 to 0.9258	No	ns
NEG vs. Poly I:C 12h	0.2275	-1.331 to 1.786	No	ns
NEG vs. MC903 12h + Poly I:C 6h	-7.598	-9.156 to -6.039	Yes	****
NEG vs. Poly I:C 12h + MC903 6h	-3.105	-4.663 to -1.547	Yes	****
MC903 6h vs. MC903 12h	-1.168	-2.726 to 0.3908	No	ns
MC903 6h vs. Poly I:C 6h	2.970	1.412 to 4.528	Yes	****
MC903 6h vs. Poly I:C 12h	3.830	2.272 to 5.388	Yes	****
MC903 6h vs. MC903 12h + Poly I:C 6h	-3.995	-5.553 to -2.437	Yes	****
MC903 6h vs. Poly I:C 12h + MC903 6h	0.4975	-1.061 to 2.056	No	ns
MC903 12h vs. Poly I:C 6h	4.138	2.579 to 5.696	Yes	****
MC903 12h vs. Poly I:C 12h	4.998	3.439 to 6.556	Yes	****
MC903 12h vs. MC903 12h + Poly I:C 6h	-2.828	-4.386 to -1.269	Yes	***
MC903 12h vs. Poly I:C 12h + MC903 6h	1.665	0.1067 to 3.223	Yes	*
Poly I:C 6h vs. Poly I:C 12h	0.8600	-0.6983 to 2.418	No	ns
Poly I:C 6h vs. MC903 12h + Poly I:C 6h	-6.965	-8.523 to -5.407	Yes	****
Poly I:C 6h vs. Poly I:C 12h + MC903 6h	-2.473	-4.031 to -0.9142	Yes	***
Poly I:C 12h vs. MC903 12h + Poly I:C 6h	-7.825	-9.383 to -6.267	Yes	****
Poly I:C 12h vs. Poly I:C 12h + MC903 6h	-3.333	-4.891 to -1.774	Yes	****
MC903 12h + Poly I:C 6h vs. Poly I:C 12h + MC903 6h	4.493	2.934 to 6.051	Yes	****



Lisa 2. *TSLP* (*SfTSLP* ja *lTSLP*, transkripte eristamata) ekspressioon poly I:C või MC903 eeltöötusega stimulatsioonil. Inimese primaarseid keratinotsüüte stimuleeriti 12 tunni vältel, 6h poly I:C või MC903ga eeltöötusega. Rakkudele lisati MC903, poly I:C või vastavaid kontrollid (MC903 puhul DMSO, poly I:C puhul füsioloogilist lahust) ning 6 tunni möödudes lisati rakkudele uus stimulatsioonisegu (vt. Tabel 1.) Negatiivse kontrollina (NEG) kasutati stimuleerimata rakke. Geeniekspressioon muutusi tuvastati RT-qPCR meetodil ja väärtused normaliseeriti *EEF1A1* ja negatiivse kontrolli suhtes. Graafikutulemused on esitatud koos standardveaga. statistiliseks analüüsiks kasutati ühe-suunalist ANOVA testi, väärtuste omavaheliseks võrdlemiseks kasutati Tukey testi (*Tukey's multiple comparison test*) Graafikul on toodud peamised katses oluliste võrdluste statistilised ekspressioonimuutused, kogu statistiline analüüs on välja toodud tabelis Lisa 3. N=4, * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$.

TSLP praimeril puhul, mis amplifitseerib mõlemat *TSLP* isovormi (*sTSLP* ja *lTSLP*), tuvastati 6 tunni ja 12 tunni ajapunktis kõikide stimulatsioonide korral, väljaarvatud poly I:C 12 tunni ajapunktis, *TSLP* kõrgeenenud ekspressioon võrreldes negatiivse kontrolliga. Stimulatsioonil MC903ga, kuhu 6h ajapunktis lisati poly I:C, suurenes *TSLP* ekspressioon võrreldes MC903 12 tunni *TSLP* ekspressiooniga. Kui poly I:C 12h ajapunktis ei tuvastatud statistiliselt olulist *TSLP* ekspressiooni muutust siis stimulaatsioonil poly I:Cga, kuhu lisati 6h ajapunktis MC903, suurenes *TSLP* ekspressioon.



Lisa 3. Tsütokiinide *CCL5*, *IL8* ja *CXCL10* ekspressioon ekspressioon inimese primaarsete keratinotsüütide koekultuuris 6h, 18h ja 30h ajapunktil *IL-4* + *IL-13* + *TNFα*, *IL-4* + *HDM*, *Poly I:C* ja *MC903* stimulatsioonil. Inimese primaarseid keratinotsüüte stimuleeriti 6, 18 või 30 tundi *IL-4* + *IL-13* + *TNFα*, *IL-4* + *HDM*, *Poly I:C* ja *MC903*ga. Negatiivse kontrollina kasutati stimuleerimata rakke. *MC903* negatiivse kontrollina kasutati *DMSO*t. Geeniekspressiooni muutusi tuvastati RT-qPCRi abil ja CT väärtused normaliseeriti koduhoidja geeni *EEF1A1* ning negatiivse kontrolli suhtes. Statistiliseks analüüsiks kasutati ühe-suunalist ANOVA testi, väärtuste omavaheliseks võrdlemiseks kasutati Tukey testi (*Tukey's multiple comparison test*) Graafikutulemused on esitatud koos standardveaga. N=3-4; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$.

LIHTLITSENTS

Mina, Georg-Kennet Gutman,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose

„*TSLP* transkriptide ekspressiooni indutseerimine ja tuvastamine inimese primaarsete keratinotsüütide koekultuuris“,

mille juhendajad on Martin Pook ja Karl Jürgenstein,

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, alates **31.12.2023** kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Georg-Kennet Gutman

26.05.2022