

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

TARTU ÜLIKOOL
MEDITSIINITEADUSTE VALDKOND
BIO- JA SIIRDEMEDITSIINI INSTITUUT
RNA BIOLOOGIA UURIMISGRUPP

**NLRP1 ja NLRP3 inflammasoomi aktivatsioon inimese bronhiepiteeli rakkudes
ning miR-146a roll nende regulatsioonis rinoviiruse nakkuse korral**

Magistritöö

30 EAP

Marjel Mäe

Juhendajad MSc Anet Laanesoo
PhD Ana Rebane

TARTU 2022

NLRP1 ja NLRP3 inflammasoomi aktivatsioon inimese bronhiepiteeli rakkudes ning miR-146a roll nende regulatsioonis rinoviiruse nakkuse korral

Astma on põletikuline hingamisteede haigus, mis sageli ägeneb rinoviiruse infektsiooni korral. Inflammasoomid on kaasasündinud immuunsüsteemi valgukompleksid, mis aktiveeruvad viirusinfektsiooniga. MiR-146a on põletiku väljakujunemises osalev mikroRNA, mille ekspressioon on astma patsientidel muutunud ning miR-146a tase suureneb RV infektsiooni korral. Ei ole teada astma ägenemise, RV nakkuse, inflammasoomi aktivatsiooni ja miR-146a omavaheline seos, mistõttu magistritöö eesmärk oli tuvastada NLRP1 ja NLRP3 inflammasoomi geenide ja nendega seotud tsütokiinide interleukiin(IL)-1 β , IL-18 ekspressioon RV infektsiooni korral ning analüüsida, millist mõju avaldab miR-146a nende geenide avaldumise tasemele. Tulemusena selgus, et rinoviirusinfektsioon aktiveerib inimese bronhiepiteeli rakkudes NLRP1 inflammasoomi ning miR-146a ei avalda inflammasoomi geenide avaldumisele otsest mõju.

Märksõnad: astma, rinoviirus, inflammasoom, interleukiin, miR-146a

CERCS: B500 Immunoloogia, seroloogia, transplantoloogia

B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

The activation of NLRP1 and NLRP3 inflammasome in human bronchial epithelial cells and the role of miR-146a in their regulation during rhinovirus infection

Asthma is an inflammatory disease of the airways that is often exacerbated during rhinovirus infection. Inflammasomes are protein complexes of the innate immunity that are activated by viruses. MiR-146a is capable of regulating inflammation and differential miR-146a expression has been detected in asthma patients. Additionally, miR-146a expression increases during RV infection. The connection between asthma exacerbation, RV infection, inflammasome activation and miR-146a is unclear. Therefore, the aim of this Master's thesis was to determine the expression of NLRP1 and NLRP3 inflammasome genes and associated interleukin(IL)-1 β , IL-18 during RV infection and to analyse, how does miR-146a affect the expression of those genes. As result, we demonstrate that RV infection activates the NLRP1 inflammasome in HBEC cells and miR-146a doesn't directly affect the expression of inflammasome genes.

Keywords: asthma, rhinovirus, inflammasome, interleukin, miR-146a

CERCS: B500 Immunology, serology, transplantation

B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

SISUKORD

SISUKORD	3
KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	7
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	8
1.1. Astma.....	8
1.1.1. Astma fenotüübid	8
1.1.2. Kopsuepiteel ja selle muutused astma korral	9
1.1.2. Astma ravi	10
1.2. Rinoviirus ja astma	11
1.2.1. Rinoviiruse ehitus	12
1.2.2. Rinoviiruste klassifikatsioon	12
1.2.3. Infektsiooni mehhanism	13
1.3. Inflammasoom	13
1.3.1. Inflammasoomi komponendid.....	13
1.4. MikroRNA	16
1.4.1. MikroRNA biogenees ja toimimise mehhanism.....	16
1.4.2. MiR-146 perekond.....	17
2. EKSPERIMENTAALOSA	19
2.1. Töö eesmärgid	19
2.2. Materjal ja meetodika	19
2.2.1. Töösse kaasatud indiviidid	19
2.2.2. Primaarsete inimese bronhiepiteeli rakkude kasvatamine.....	20
2.2.3. HBEC rakkude stimuleerimine rinoviirustega	20
2.2.4. HBEC rakkude transfekteerimine miRNA miimidega.....	21

2.2.5. HBEC rakkude transfekterimine siRNA miimidega	21
2.2.6. RNA eraldamine	21
2.2.7. RT-qPCR mRNA ekspressiooni analüüsimiseks	22
2.2.8. ELISA valgutaseme analüüsimiseks	23
2.2.9. Läbivoolutsütomeetria	23
2.2.10. Statistiline analüüs	24
2.3. Tulemused	25
2.3.1. Inflammasoomi geenide ekspressioon on astma fenotüübi spetsiifiline	25
2.3.2. RV infektsioon HBEC rakkudes suurendab <i>IL-1β</i> ekspressiooni mRNA tasemel ning IL-1 β ja IL-18 sekreteerumist.....	27
2.3.3. RV stimuleeritud IL-1 β ja IL-18 ekspressioon HBEC rakkudes on NLRP1 sõltuv....	28
2.3.4. MiR-146a transfektsioon vähendab HBEC rakkudes RV indutseeritud <i>CASP1</i> , <i>PYCARD</i> ja <i>IL-1β</i> ekspressiooni.....	30
2.3.5. MiR-146a transfektsioon suurendab elusrakkude osakaalu HBEC rakkude hulgas rinoviiruse infektsiooni korral	32
2.4. Arutelu	34
KOKKUVÕTE	39
SUMMARY	40
TÄNUSÕNAD	42
KIRJANDUSE LOETELU.....	43
LIHTLITSENTS.....	53

KASUTATUD LÜHENDID

ANOVA	dispersioonanalüüs (ingl <i>analysis of variance</i>)
BALF	bronhoalveolaarne vedelik
BEGM	bronhiaalse epiteelraku kasvusööde
BPE	veise ajuripatsi ekstrakt
CASP1	kaspaas-1
cDNA	komplementaarne DNA
CHDR3	kadheriini valguperekonda kuuluv liige 3 retseptor
CXCL1	C-X-C motiiviga kemokiini ligand 1
DAMP	ohuga seotud molekulaarne muster
DGCR8	DiGeorge sündroomi kriitilise regiooni geen 8 (ingl <i>DiGeorge syndrome critical region gene 8</i>)
EF1A	elongatsioonifaktor-1 alfa
ELISA	ensüümseotud immunosorbentanalüüs
GSDMD	gasdermin-D
HBEC	inimese bronhiepiteeli rakud
hEGF	inimese epidermaalne kasvufaktor
ICAM1	intratsellulaarne adhesioonimolekul 1
IFN	interferoon
IKS	inhaleeritavad kortikosteroidid
IL	interleukiin
ILC	loomuliku immuunsuse lümfoidrakud
IRAK1	IL-1 retseptori vahendatud kinaas 1
IRF	interferooni regulaatorfaktor
ISG	IFN-stimuleeritud geen
JAK-STAT	Janus kinaas-signaali ülekande ja transkriptsiooni aktivaator
LABA	pikatoimelised beeta-agonistid
LDLR	madala tihedusega lipoproteiini retseptor

MDA5	melanoomi diferentseerumisega assotsieerunud geen 5
miRNA	mikro-RNA
miR-146a	mikro-RNA-146a
MOI	nakatuskordsus
MRE	miRNA vastuse element
NF-κB	tuumafaktor kappa B
NLR	nukleotiide siduvat domeeni ja leutsiinirikkaid kordusi sisaldav valk
NLRP	püriini domeeni sisaldav valk
PAMP	patogeenidega seotud molekulaarne muster
PRR	mustreid äratundev retseptor
PYCARD	kaspaasi aktivatsiooni ja värbamise domeeni (CARD) sisaldav apoptoosiga seotud täpilaadne valk (ASC)
RIG-I	retinoehappe indutseeritav geen I
RISC	RNA indutseeritud vaigistamiskompleks
RT-qPCR	reaalaja polümeraasi ahelreaktsioon
RV	rinoviirus
SABA	lühitoimelised beeta-agonistid
siRNA	väike interfereeriv RNA
TCID ₅₀	50% rakukultuuri nakatav doos (ingl <i>tissue culture infective dose 50%</i>)
Th2	tüüp 2 abistaja rakud
Th17	tüüp 17 abistaja rakud
TLR	tolli-laadne retseptor
TRAF6	TNF retseptori vahendatud faktor 6
TSLP	tuumuse stromaalne lümfopoetiin
3'UTR	mRNA 3' transleerimata regioon

SISSEJUHATUS

Astma on krooniline põletikuline hingamisteede haigus, mis mõjutab sadu miljoneid inimesi üle maailma, tekitades neil hingamisraskuseid (Veerati *et al.*, 2020). Rinoviirused (RV) põhjustavad sageli külmetushaiguseid, kuid astma patsientidel võib RV nakkusega kaasneda astma ägenemine (Jakiela *et al.*, 2021; Wirz *et al.*, 2022). On teada, et rinoviirus nakatab astma patsientidel eelkõige bronhiepiteeli rakke (Mills *et al.*, 2019), kuid on ebaselge, miks tekib astma ägenemine ning kuidas oleks võimalik seda ära hoida. Inflammasoomid on suured valgukompleksid, mis omavad olulist rolli patogeenide vastases kaasasündinud immuunvastuses. Inflammasoomi aktivatsiooni tagajärjel toodetakse pro-inflamatoorseid tsütokiine interleukiin(IL)-1 β ja IL-18, mis osalevad põletiku regulatsioonis (Z. Li *et al.*, 2022; Robinson *et al.*, 2020). Varasemad uuringud on näidanud inflammasoomi aktivatsiooni viirusinfektsioonide korral (Han *et al.*, 2021), kuid ei ole selge, kuidas mõjutab rinoviiruse nakkus inflammasoomi aktiveerumist bronhiepiteeli rakkudes. MikroRNA-146a (miR-146a) on lühike mittekodeeriv RNA, mis reguleerib posttranskriptsioonilisel tasemel erinevaid bioloogilisi protsesse, sealhulgas põletiku väljakujunemist (L. Zhang *et al.*, 2020; Yan *et al.*, 2021). On näidatud, et astma patsientidel esineb muutunud miR-146a ekspressioon ning miR-146a tase suureneb rinoviirusinfektsiooni korral (Laanesoo *et al.*, 2021; Rodrigo-Munoz *et al.*, 2019), kuid miR-146a roll inflammasoomi aktivatsiooni reguleerimisel inimese bronhiepiteeli rakkudes ei ole teada.

Magistritöö eesmärk oli välja selgitada, milline on astma patsientide bronhiharjaproovides ja rinoviirusega nakatatud inimese primaarsetes bronhiepiteeli rakkudes NLRP1 ja NLRP3 inflammasoomi geenide ja nendega seotud tsütokiinide IL-1 β , IL-18 ekspressioon ning analüüsida, millist mõju avaldab miR-146a nende geenide avaldumise tasemele.

Magistritöö valmis Tartu Ülikooli biomeditsiini õppekava raames. Töö eksperimentaalsed katsed viidi läbi Tartu Ülikooli meditsiiniteaduste valdkonnas, biomeditsiini osakonnas, bio- ja siirdemeditsiini instituudis, RNA bioloogia uurimisgrupis.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Astma

Astma on väga levinud krooniline põletikuline hingamisteede haigus, mis mõjutab sadu miljoneid inimesi üle maailma (Veerati *et al.*, 2020). Astma tekkepõhjused on osaliselt geneetilised, kuid samuti on mitmeid keskkonnategureid, mis haiguse kujunemist ja ägenemist soodustavad. Olulised faktorid astma tekkimises on õhusaaste, allergeenid ja viirusnakkused (Everman *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2021). Need keskkonnafaktorid puutuvad hingamisteede kaudu organismi sisenedes kõigepealt kokku bronhiepiteeliga. Sõltuvalt haiguse raskusastmest võib astma patsientide bronhiepiteel olla kahjustunud, mistõttu astma korral reageerib organism keskkonnafaktoritele tugevamalt, aktiveeruvad nii kaasasündinud kui ka omandatud immuunsüsteemi rakud ning liiga tugeva immuunvastuse tagajärjel võivad tekkida koekahjustused (Jakiela *et al.*, 2021).

1.1.1. Astma fenotüübid

Astma on heterogeenne haigus, mida saab hingamisteedes paiknevate immuunrakkude hulga alusel jaotada kolmeks fenotüübiks: eosinofiilne, neutrofiilne ja pausigranulotsütaarne astma (X. Wen *et al.*, 2022).

Astma saab klassifitseerida eosinofiilseks, kui hingamisteede rögas olevatest rakkudest vähemalt 3% on eosinofiilid. Eosinofiilse astma raskusaste on patsientidel varieeruv, kuid üldjuhul allub haigus ravile (G. Chen *et al.*, 2022). Hingamisteede eosinofiiliat põhjustavad allergeenid, nagu õietolm ja tolmulest, mis indutseerivad alarmiinide interleukiin(IL)-33, tüümuse strooma lümfoetiini (TSLP) ja IL-25 ekspressiooni. Oluline roll on tsütokiinil IL-33, mis aktiveerib loomuliku immuunsuse tüüp 2 lümfoidrakud (ILC2) ja tüüp 2 abistaja rakud (Th2) (Suzuki *et al.*, 2021). Sellest tulenevalt on hingamisteedes tüüp 2 põletik, mida iseloomustab suurenenud IL-4, IL-5 ja IL-13 avaldumise tase (Immormino *et al.*, 2022). IL-4 indutseerib allergilise reaktsiooni teket, avaldades mõju B-rakkudest immuunglobuliin E (IgE) tootmisele. IL-5 osaleb eosinofiilide diferentseerumises ja migratsioonis, samas kui IL-13 indutseerib lima sekretsiooni ja hingamisteede hüperreaktiivsust (Suzuki *et al.*, 2021).

Neutrofiilse astma korral on hingamisteede rögas paiknevatest rakkudest vähemalt 61% neutrofiilid (G. Chen *et al.*, 2022). Neutrofiilne astma on üks tõsisemalt kulgevaid astma fenotüüpe, mida iseloomustab sagedane haiguse ägenemine ning halb ravile allumine (Abdo *et al.*, 2021). Neutrofiilide olemasolu rögas on tavaliselt tagajärg kokkupuutele saasteainetega nagu

tubakasuits või viitab viraalsele või bakteriaalsele infektsioonile (Ntontsi *et al.*, 2017). Neutrofiilse astma tekkemehhanismid ei ole selged, kuid neutrofiilset fenotüüpi seostatakse suurenenud tüüp 17 abistaja rakkude (Th17) vahendatud immuunvastustega (Q. Chen *et al.*, 2021). Th17 rakud toodavad tsütokiine IL-17A/F ja IL-22 (Yang *et al.*, 2022). IL-17 aktiveerib kemokiini IL-8, mille ülesanne on neutrofiile hingamisteedesse meelitada ja aktiveerida (Q. Chen *et al.*, 2021). Näiteks on astma patsientidel leitud plasmas märkimisväärselt suurem IL-17A ekspressioon kui kontrollidel, kusjuures IL-17A tase oli positiivses korrelatsioonis haiguse raskusastmega (Yang *et al.*, 2022). Samuti on neutrofiilse astma patsientidel näidatud suurenenud IL-22 ekspressiooni, mis suurendab inimese hingamisteede silelihasrakkude jagunemist ja migratsiooni ning võib sellega kaasa aidata hingamisteede remodelleerimisele (Badi *et al.*, 2022; Bullone *et al.*, 2019). Lisaks võib hingamisteede neutrofiiliat suurendada puudulik apoptootiliste neutrofiilide eemaldamine makrofaagide poolt (Immormino *et al.*, 2022).

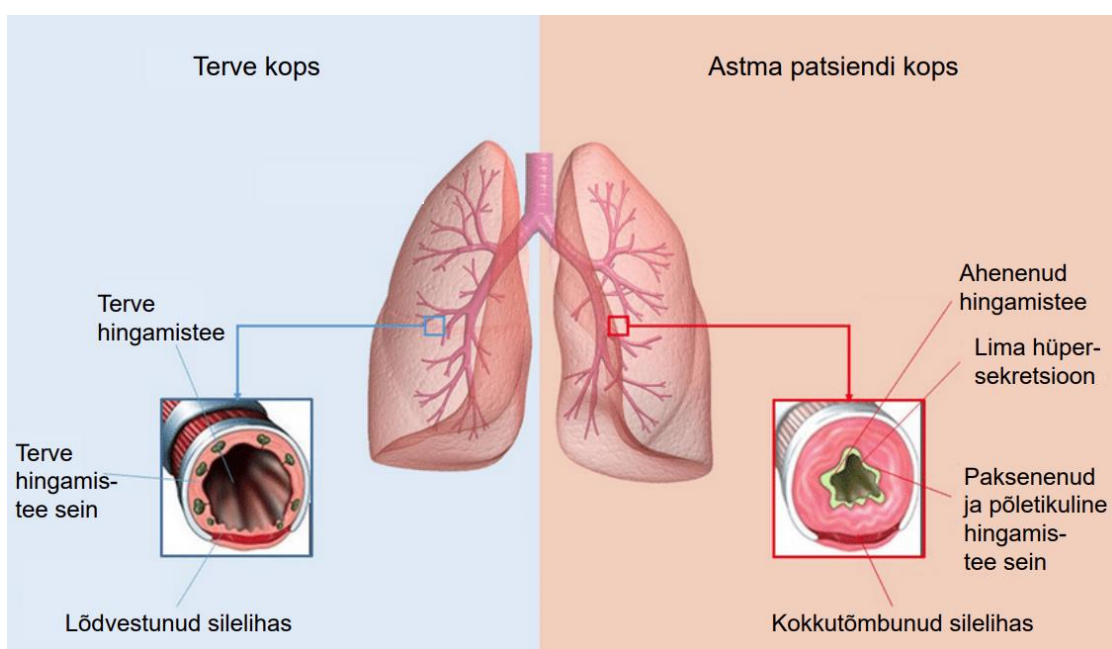
Pautsigranulotsütaarne astma esineb patsientidel, kelle hingamisteede rögas on eosinofiilide ja neutrofiilide tase langenud (Ntontsi *et al.*, 2017). Kuigi tegemist on levinud astma fenotüübiga, pautsigranulotsütaarse astma kohta ei leidu palju teadustööd, mistõttu see haiguse vorm on halvasti mõistetud. Arvatakse, et tegemist on kergemini kulgeva astma fenotüübiga, mis allub ravile (Li *et al.*, 2021). Ntontsi *et al.* näitasid, et võrreldes teiste fenotüüpidega oli pautsigranulotsütaarse astma patsientidel väljahingatavas õhus ja rögas vähem põletikulisi biomarkereid, mis viitas kergemale hingamisteede põletikuprotsessile. Samuti olid patsientidel pautsigranulotsütaarse astma korral paremini funktsioneerivad kopsud ning ravimite madalama doosi vajadus (Ntontsi *et al.*, 2017). Sõltumata haiguse fenotüübist on astmaatikutel hingamisteede põletikulised ning see tekitab kahjustusi, mis nõrgestavad epiteeli kaitsefunktsiooni ja suurendavad infektsiooniriski (Song ja Wang, 2022).

1.1.2. Kopsuepiteel ja selle muutused astma korral

Terve indiviidi hingamisteid vooderdab ühekihiline, mitmerealine epiteel, mis koosneb neljast peamisest rakutüübist: basaalarakud, karikrakud, ripsrakud ja Clara rakud (Rayner *et al.*, 2019). Need epiteeli moodustavad rakud on omavahel ühendatud tiheliiduste ja adhesioonivööga (Collin *et al.*, 2021). Basaalarakud kinnitavad epiteelkihi basaalembraanile ning on olulised epiteeli regeneratsioonis, olles eellasrakkudeks teistele rakutüüpidele (Jonsdottir *et al.*, 2015). Karikrakud toodavad lima, mis katab epiteelikihti ja püüab kinni hingamisteedesse sattuvad patogeenid ning muud osakesed. Ripsrakud omavad sadu ripseid, mille abil liigutatakse lima koos sealsete ärritajatega, et hingamisteed kahjulikest faktoritest vabastada (Gohy *et al.*, 2019; Jing *et al.*,

2019). Clara rakud sekreteerivad valke, mis kannavad põletikuvastaseid omadusi ning reguleerivad immuunvastust (Rayner *et al.*, 2019).

Astma patsientidel esineb tihti mitmesuguseid bronhiepiteeli histoloogilisi muutuseid, nagu karikrakkude metaplaasia ja hüperplaasia, epiteeli paksenemine, liigne lima tootmine ning suurenenud bronhi silelihase mass (Joonis 1) (Esteves *et al.*, 2022; Jakiela *et al.*, 2021). Hingamisteedes paiknevad immuunrakud toodavad kasvufaktoreid, mis indutseerivad hingamisteede seinte paksenemist ning bronhide kokkutõmbumist (Suzuki *et al.*, 2021). Hingamisteede ahendamise tagajärjel tekkivad astma patsientidel hingamisraskused, mida iseloomustavad köhimine, hingeldamine ning raskustunne rindkeres (Veerati *et al.*, 2020).



Joonis 1. Terve ja astma patsiendi hingamisteed. Joonisel on kujutatud terve inimese hingamisteed ning astmaga kaasnevad inimese hingamisteede muutused. Modifitseeritud Shastri *et al.*, 2021 järgi.

1.1.2. Astma ravi

Astma patsiendid kogevad astmahooge, mille leevendamiseks on olemas ravimid, kuid raskematel juhtudel võib kaasneda hospitaliseerimine (Sullivan *et al.*, 2021). Astma korral kasutatakse pikaajseid ravimeid, nagu inhaleeritavad kortikosteroidid (IKS) ja pikatoimelised beeta-agonistid (LABA), mis aitavad astmahooge ennetada, ning kiiret leevendust pakkuvaid ravimeid, nagu lühitoimelised beeta-agonistid (SABA), mida manustatakse akuutselt astmahoogude esinemisel (Harvey *et al.*, 2022).

Kõige levinud ravimid astma kontrolli all hoidmiseks on inhaleeritavad kortikosteroidid, mis vähendavad hingamisteede põletikku. Kuigi kortikosteroidide peetakse üsna ohutuks, võib nende kasutamisega kaasneda soovimatuid kõrvaltoimeid. Lastel on IKS ravi järel täheldatud neerupealiste töö pärssimist ja kasvupeetust (Caulfield *et al.*, 2021). Kortikosteroidide on võimalik manustada ka süsteemselt, kuid selle ravimeetodiga seostatakse suurenenud vastuvõtlikkust infektsioonidele, probleeme luudega ning kardiovaskulaarseid ja gastrointestinaalseid komplikatsioone (Sullivan *et al.*, 2021).

Teine sagedaselt kasutatav astma ravimite grupp on pikatoimelised beeta-agonistid, mis seonduvad eelistatult hingamisteede silelihasrakkudel paiknevatele β_2 -retseptoritele ja soodustavad silelihase lõdvestumist ning bronhodilatsiooni. LABA-de toime kestab keskmiselt 6-12 tundi (Burkes ja Panos, 2020). Kuigi LABA-d on olnud turul ligikaudu 30 aastat, esineb endiselt küsimusi nende turvalisuse kohta (Peters *et al.*, 2016). Varasemates uuringutes on näidatud, et patsientidel, kellele manustati LABA-sid, esines rohkem astmaga seotud surmajuhtumeid kui platseebogrupis (Nelson *et al.*, 2006). Samas on hiljem lisandunud teadustöid, mis sellised väited ümber lükkavad (Sears ja Radner, 2014; Stempel *et al.*, 2016).

Kiiret leevendust pakkuvate astma ravimite hulka kuuluvad lühitoimelised beeta-agonistid (SABA), mis lühiajaliselt vähendavad astma sümptomeid, kuid ei leevenda sümptomeid põhjustavat põletikku (Baron *et al.*, 2021). On täheldatud, et SABA-de pikaajaline kasutamine võib hoopis astma ägenemist indutseerida ning liigset SABA-de manustamist seostatakse suurenenud riskiga astmaga seotud suremuseks (Nwaru *et al.*, 2020).

Tänapäeval soovitatakse astma ägenemise leevendamiseks kombinatsioonteraapiat, mis koosneb inhaleeritavatest kortikosteroididest ja LABA-dest (Al-Ahmad ja Webb, 2022). Selle meetodi efektiivsust toetavad mitmed uuringud, kus patsientidel on täheldatud märkimisväärselt vähem astma ägenemist (Bateman *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2016). Samas on uurimusi, mis vastupidiselt ei ole suutnud leida olulisi erinevusi mono- ja kombinatsioonteraapia tulemustes (Beasley *et al.*, 2015). Astma kontrolli all hoidmist raskendab ka inhalaatori ebakorrekne kasutamine, mille puhul levinud viga on enne inhaleerimist mitte välja hingamine (Price *et al.*, 2017).

1.2. Rinoviirus ja astma

Rinoviirus (RV) on üheaheelaline RNA viirus, mis kuulub *Picornaviridae* sugukonda (Mills *et al.*, 2019). Tegemist on ühe kõige levinuma ülemiste hingamisteede külmetushaiguste põhjustajaga. Rinoviirusinfektsioon ei ole üldjuhul tervetele indiviididele ohtlik, kuid lastel ja krooniliste

hingamisteede haigustega täiskasvanutel võib nakkusega kaasneda astma teke ja ägenemine (Jakiela *et al.*, 2021; Wirz *et al.*, 2022). Astma ägenemine suurendab riski komplikatsioonide tekkeks ja kõrgemaks suremuseks, millega kaasneb ka märkimisväärne tõus tervishoiukulutustes (Veerati *et al.*, 2020). Lisaks on mitmed uuringud näidanud, et varajases eas põetud rinoviirusnakkuse tagajärjel võib tekkida hingeldamine, mis suurendab riski lapsepõlves astma väljakujunemiseks (Hasegawa *et al.*, 2019). Samuti ei ole praegu olemas rinoviirusinfektsiooni ennetavaid ravimeid ega vaktsiini (Blaas, 2020).

1.2.1. Rinoviiruse ehitus

Rinoviirused on väikesed viirused, mille diameeter jääb vahemikku ligikaudu 28-30 nm. Viiruse genoom koosneb üheaheelalisest RNA-st ning see on ümbritsetud kapsiidiga, mille moodustavad struktuurvalgud VP1, VP2, VP3 ja VP4. Kõige arvukamalt on valke VP1, VP2 ja VP3, mis paiknevad kapsiidi pinnal, samas kui VP4 asetseb kapsiidi ja viiruse genoomi vahel. Kapsiidi pinnal olevad valgud mängivad olulist rolli rinoviiruste antigeensuse mitmekesisuse tagamisel, olles erinevate serotüüpide vahel väga varieeruvad. Lisaks, VP1 on vajalik rakkude nakatamiseks, moodustades seondumiskoha rakupinna retseptoritele (Alshrari *et al.*, 2021; Gomez-Perosanz *et al.*, 2021).

1.2.2. Rinoviiruste klassifikatsioon

Tänapäeval on teada ligikaudu 170 rinoviiruse serotüüpi, mis klassifitseeritakse gruppidesse vastavalt struktuurvalk VP1 RNA järjestuste sarnasusele või rakkudesse sisenemiseks kasutatavale retseptorile. VP1 RNA järjestuse alusel jaotuvad rinoviirused alamliikidesse A, B ja C, mille hulgast RV-A ja RV-C on sagedasemad hingamisteede infektsioonide põhjustajad. 2021. aasta seisuga on kirjeldatud 80 A, 32 B ja 57 C alamliigi rinoviirust (Esneau *et al.*, 2022; Gomez-Perosanz *et al.*, 2021; Mills *et al.*, 2019). Retseptorite järgi rühmituvad A ja B alamliigi rinoviirused suurde (*major*) ja väiksesse (*minor*) gruppi, samas kui C alamliigi viirused moodustavad omaette grupi. Suure grupi RV-d sisenevad rakku kasutades intratsellulaarset adhesioonimolekul 1 (ICAM1) retseptorit ning väikse grupi RV-d seonduvad madala tihedusega lipoproteiini retseptoriga (LDLR). ICAM1 ja LDLR retseptoreid ekspresseerivad hingamisteede epiteelirakud ning mitmed immuunrakud, nagu makrofaagid ja nuumrakud (Han *et al.*, 2021). RV-C rakkudesse sisenemiseks on vajalik inimese kadheriini valguperekonda kuuluv liige 3 retseptor (CDHR3), mida ekspresseerivad ripsrakud (Bochkov *et al.*, 2015).

1.2.3. Infektsiooni mehhanism

Rinoviiirus paljuneb kopsudes peamiselt bronhiepiteeli rakkudes, mis ekspresseerivad mustreid äratundvaid retseptoreid (PRR). Nende hulka kuuluvad tolli-laadsed retseptorid (TLR) ning RNA helikaasid nagu retinoehappe indutseeritav geen I (RIG-I) ja melanoomi diferentseerumisega assotsieerunud geen 5 (MDA5) (Mills *et al.*, 2019; Veerati *et al.*, 2020). TLR2 tunneb ära rinoviiruse kapsiidi pinnavalgud, samas kui viiruse RNA-d tuvastavad endosoomis TLR7 ja TLR8 ning tsütosoolis RIG-I ja MDA5 (Stokes *et al.*, 2016).

Peale retseptorite poolt viiruse tuvastamist indutseeritakse interferooni regulaatorfaktor (IRF), mille tagajärjel ekspresseeritakse tüüp I ja tüüp III interferoone (IFN). IFN omakorda reguleerib üles antiviraalsete omadustega IFN-stimuleeritud geene (ISG), mis võivad viiruse leviku piiramiseks indutseerida nakatunud rakkude surma (Lötzerich *et al.*, 2018; Xander *et al.*, 2019). Lisaks aktiveerub tuumafaktor kappa B (NF- κ B) signaalirada ning hakatakse tootma mitmeid tsütokiine (Mills *et al.*, 2019; Veerati *et al.*, 2020).

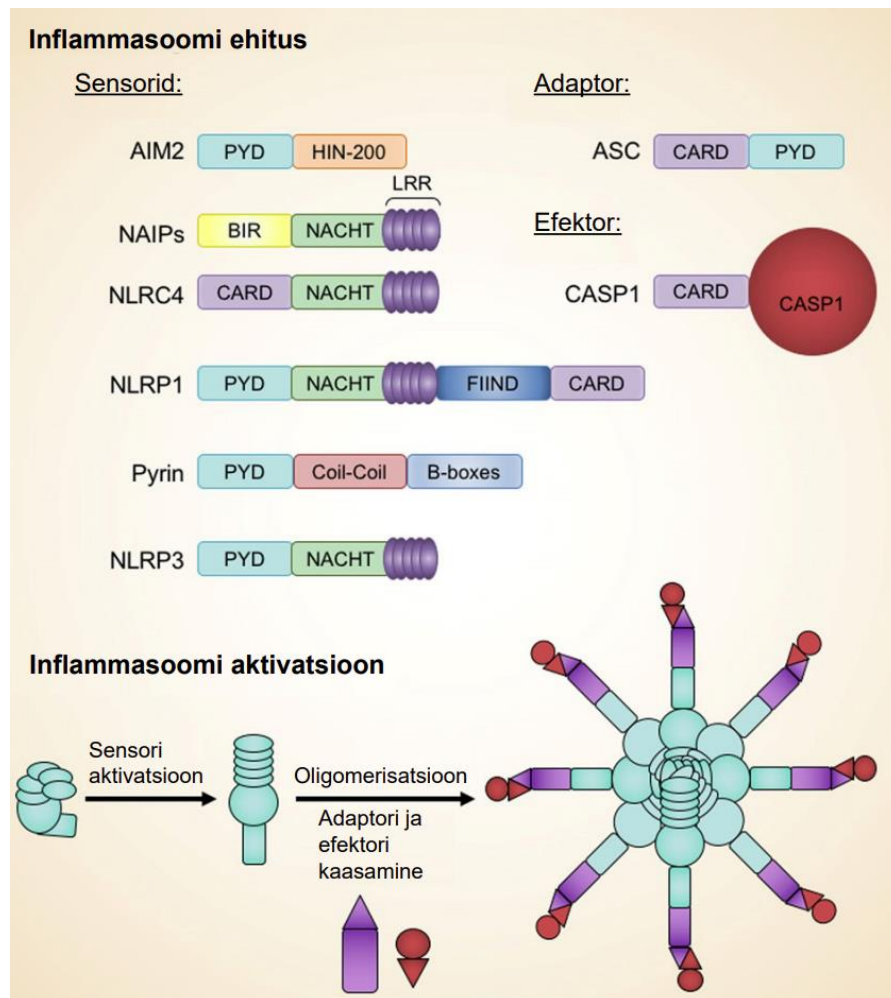
1.3. Inflammasoom

Inflammasoomid on suured valgukompleksid, mis omavad olulist rolli patogeenide vastases kaasasündinud immuunvastuses. Kompleksi aktiveerumisel hakatakse organismis sekreteerima pro-inflamatoorseid tsütokiine IL-1 β ja IL-18, mis reguleerivad erinevaid põletikuvastusega seotud protsesse, kusjuures astma patsientidel on täheldatud suurenenud IL-1 β ja IL-18 ekspressioonitaset (Kaur *et al.*, 2021; H. C. Li *et al.*, 2022; Simpson *et al.*, 2014).

1.3.1. Inflammasoomi komponendid

Inflammasoom koosneb sensorist, adaptorist ja efektorist, mis haigustekitaja sissetungimisel moodustavad ühise kompleksi (H. C. Li *et al.*, 2022). Inflammasoomi sensoriks on nukleotiide siduvat domeeni ja leutsiinirikkaid kordusi sisaldavate valkude (NLR) perekonda kuuluv püriini domeeni sisaldav valk (NLRP), mis tunneb ära erinevaid patogeenidega seotud molekulaarseid mustreid (PAMP) või ohuga seotud molekulaarseid mustreid (DAMP) (Pandey ja Zhou, 2022). Tänapäeval on teada vähemalt 5 PRR sensorit (Joonis 2), mis on võimelised inflammasoomi moodustama (Han *et al.*, 2019). Nende hulka kuuluvad NLRP1 ja NLRP3, kusjuures kõige enam on uuritud NLRP3-ga moodustatavat inflammasoomi (H. C. Li *et al.*, 2022). NLRP3 tunneb ära nii eksogeenseid kui endogeenseid ohusignaale, nende hulgas ka viiruse RNA (Liu *et al.*, 2019). NLRP1 on esimesena avastatud inflammasoomi moodustav sensor ning seob sarnaselt NLRP3-le viiruse nukleiinhappeid (Bauernfried *et al.*, 2021). Inflammasoomi adaptor-molekuliks on

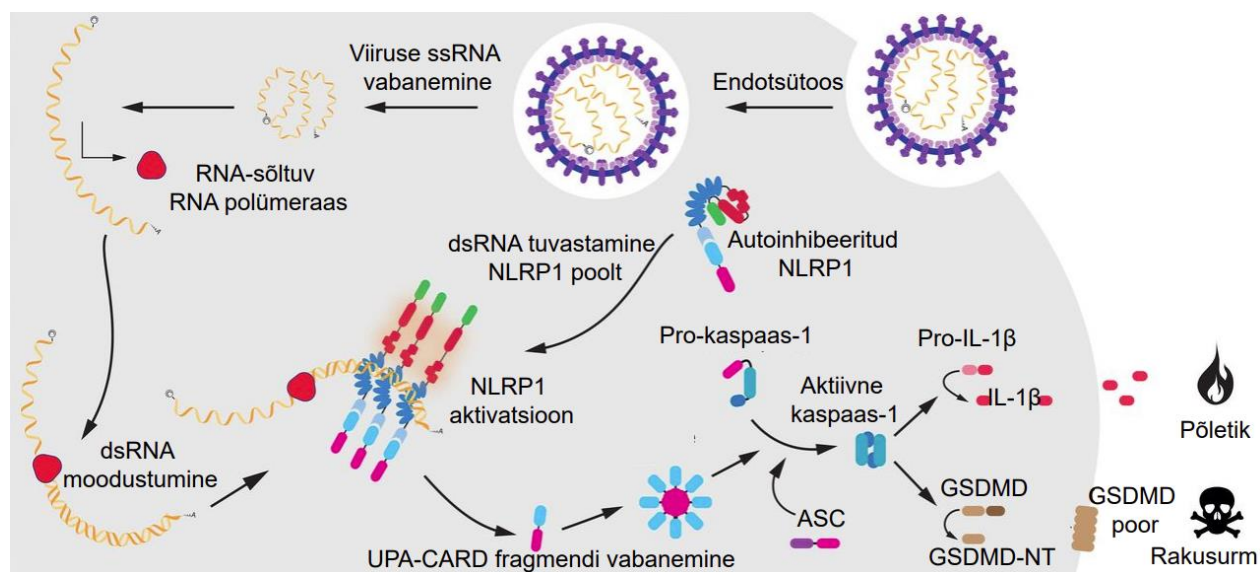
PYCARD, mis on kaspasi aktivatsiooni ja värbamise domeeni (CARD) sisaldav apoptoosiga seotud täpilaadne valk (ASC), ning efektorina käitub tsüsteiini proteaas pro-kaspas-1 (Pandey ja Zhou, 2022).



Joonis 2. Inflammasoomi ehitus. Inflammasoom koosneb sensorist, adaptorist ja efektorist, mis sensori aktiveerumisel moodustavad ühise kompleksi. Modifitseeritud Christgen *et al.*, 2020 järgi.

Inflammasoomi aktiveerumine on kaheetapiline protsess: vajalik on 1. signaal, mille järel toimub praimimine (*priming*), ja 2. signaal, millega initsieeritakse inflammasoomi aktivatsioon. Praimimise etapp käivitub, kui organismis tuntakse ära PAMP-e, mille tagajärjel aktiveerub NF- κ B signaalirada ja hakatakse ekspresseerima inflammasoomiga seotud gene NLRP, pro-kaspas-1, pro-IL-1 β ja pro-IL-18. Teises etapis tunneb ülesreguleeritud sensor ära erinevaid PAMP-e ja DAMP-e, mis viib adaptori PYCARD assembleerumise ja oligomeriseerumiseni. PYCARD omakorda interakteerub pro-kaspas-1-ga, misjärel viimasest saab autokatalüüsi teel

aktiivne vorm kaspas-1 (CASP1). Aktiivne kaspas-1 lõikab pro-IL-1 β ja pro-IL-18 nende aktiivseteks vormideks IL-1 β ja IL-18, mis sekreteeritakse ekstratsellulaarsesse ruumi (Karaba *et al.*, 2020; Pandey ja Zhou, 2022). IL-1 β ja IL-18 omavad olulist rolli põletikuvastuses, suurendades veresoonte läbilaskvust ning indutseerides neutrofiilide ja lümfotsüütide liikumist põletikukoldesse (Z. Li *et al.*, 2022). Lisaks võib kaspas-1 aktivatsioon viia püroptoosini, mis on gasdermin-D (GSDMD) vahendatud lüütiline rakusurm (Sand *et al.*, 2019).



Joonis 3. NLRP1 inflammasoomi aktivatsioon viirusinfektsiooni korral. Viiruse raku sisenemisel vabaneb tsütoplasmasse viiruse nukleiinhape, mis seondub sensor NLRP1-ga ning põhjustab selle aktivatsiooni, vabastades NLRP1 inhibeerivast N-terminaalsest fragmendist. Seejärel kaasab NLRP1 inflammasoomi kompleksi adaptori PYCARD ja efektori pro-kaspas-1, mille tagajärjel aktiveerub kaspas-1. Kaspas-1 lõikab pro-IL-1 β aktiivseks IL-1 β vormiks ning indutseerib sellega põletikku, kuid võib ka gasdermin-D lõikamise kaudu kutsuda esile püroptoosi. Modifitseeritud Bauernfried *et al.*, 2021 järgi.

Varasemate uuringute põhjal on teada, et viirusinfektsioon osaleb inflammasoomi aktivatsioonis. Han *et al.* on näidanud, et inflammasoomi aktivatsiooni 1. etapis on oluline roll TLR2 retseptoril, mis tunneb ära rinoviiruse struktuurvalgu VP4 ning TLR2-VP4 interaktsioon indutseerib praimimist, mille tagajärjel suureneb inflammasoomiga seotud geenide ekspressioon, samas kui TLR2^{-/-} hiirte hingamisteedes oli näha metsiktüüpi hiirtega võrreldes madalam NLRP3 ja pro-IL-1 β avaldumise tase (Han *et al.*, 2019). Tõenäoliselt on NLRP1 inflammasoomi aktiveerimiseks võimalikud erinevad mehhanismid. Robinson *et al.* uuringu põhjal osaleb inflammasoomi aktivatsiooni etapis rinoviiruse proteaas 3Cpro, mis lõikab sensorit NLRP1. Tulemusena vabaneb NLRP1 autoinhibitoorsest N-terminali fragmendist ning inflammasoom saab assembleeruda ning aktiveeruda (Robinson *et al.*, 2020). Bauernfried *et al.* on näidanud, et

NLRP1 inflammasoomi aktiveerib kaheaahelaline RNA, mis tõenäoliselt võimaldab esile kutsuda sensori aktiveerumiseks vajaliku NLRP1 konformatsiooni muutuse (Joonis 3) (Bauernfried *et al.*, 2021). Lisaks on inflammasoomil oluline roll viiruse replikatsiooni pärssimisel, tulenevalt inflammasoomi aktivatsiooni võimest indutseerida püroptoosi (Z. Li *et al.*, 2022).

1.4. MikroRNA

MikroRNA-d (miRNA) on ~22 nukleotiidi pikkused mittekodeerivad RNA-d, mis reguleerivad erinevaid bioloogilisi protsesse transkriptsiooni järgselt (Wu *et al.*, 2022; Yan *et al.*, 2021). MiRNA-d seonduvad sihtmärk mRNA-dele osalise komplementaarsusega, mistõttu miRNA-d on võimelised mõjutama sadu erinevaid geene (Panganiban *et al.*, 2019). Lisaks on inimesel teada sadu erinevaid miRNA-sid, mistõttu avaldavad miRNA-d mõju ligikaudu 30% inimese genoomile (Javidan *et al.*, 2019; X. Zhang *et al.*, 2021). Seetõttu mõjutavad miRNA-d paljusid olulisi rakulisi funktsioone, nagu näiteks metabolism ja haiguste kujunemine (Luca *et al.*, 2020). Astma patsientidel on võrreldes kontrollidega näidatud muutusi rohkem kui 100 miRNA ekspressioonis veres, rögas või kopsubiopsiates, mida saab potentsiaalselt kasutada astma fenotüübi määramisel ning raviplaani koostamisel (Rial *et al.*, 2021; Rodrigo-Munoz *et al.*, 2019). MikroRNA-d avaldavad mõju astma korral esinevale põletikule, osaledes sihtmärkgeenide ekspressiooni regulatsiooni kaudu sellistes protsessides nagu hingamisteede eosinofiilia ja lima tootmine (Wu *et al.*, 2022). Lisaks, Rodrigo-Munoz *et al.* on näidanud, et muutunud miRNA-de profiili järgi on potentsiaalselt võimalik hinnata astma kulgemise raskusastet (Rodrigo-Munoz *et al.*, 2019). MikroRNA-d on ka paljulubavad biomarkerid, tulenevalt nende resistentsusest nukleaaaside vastu (Rial *et al.*, 2021).

1.4.1. MikroRNA biogeneesi ja toimimise mehhanism

MikroRNA biogeneesi esimese etapina sünteesib RNA polümeraas II primaarse miRNA (pri-miRNA), mida lõikab mikroprotsessor kompleks, mille moodustavad Drosha ja DGCR8 (ingl *DiGeorge syndrome critical region 8*). Lõikamise tulemusena tekib pri-miRNA-st prekursor miRNA (pre-miRNA), mis transporditakse Exportin 5 ja Ran-GTP kompleksi abil tsütoplasmasse, kus Dicer ensüümi abil moodustub pre-miRNA-st miRNA dupleks (Y. K. Kim *et al.*, 2016). MiRNA dupleks, mis koosneb juht- (*guide*) ja kaasahelast (*passenger strand*), liitub RNA indutseeritud vaigistamiskompleksiga (RISC) (ingl *RNA-induced silencing complex*), kus juhtahel kantakse RISC kompleksi põhikomponent Argonaute valkudele, samas kui kaasahel eemaldatakse kompleksist ja degradeeritakse (Dalmadi *et al.*, 2021). Seejärel on juhtahel

võimeline seonduma oma 5' otsas asuva ~6 nukleotiidi pikkuse seemnejärjestuse alusel sihtmärk mRNA 3' transleerimata regioonis (3'UTR) (ingl *3' untranslated region*) paiknevale miRNA vastuse elemendile (MRE) (ingl *miRNA response element*), millele järgneb translatsiooni inhibitsioon või mRNA degradeerumine (Barreda-Manso *et al.*, 2021; Luca *et al.*, 2020).

1.4.2. MiR-146 perekond

MikroRNA-146 perekonda kuuluvad miR-146a ja miR-146b (miR-146a/b), mis on ühed enim uuritud miRNA-d (L. Zhang *et al.*, 2020). MiR-146a ja miR-146b on kodeeritud geenidelt, mis inimesel asuvad vastavalt 5. ja 10. kromosoomil, kusjuures miR-146a/b erinevad ainult kahe 3' regioonis asuva nukleotiidi poolest (Joonis 4). Sellisest homoloogsusest ja identsest seemnejärjestusest tulenevalt on ka miR-146a/b sihtmärgid sarnased (Hermann *et al.*, 2017; Laanesoo *et al.*, 2021; Taganov *et al.*, 2006). MiR-146a/b omavad olulist rolli kaasasündinud immuunsüsteemi regulatsioonis, avaldades mõju põletiku väljakujunemisele (L. Zhang *et al.*, 2020).

miR-146a 5'-UGAGAACUGAAUCCAUGGGUU-3'
miR-146b 5'-UGAGAACUGAAUCCAUAAGGCU-3'

Joonis 4. MiR-146 perekond. MiR-146a/b omavad ühesugust seemnejärjestust (tähistatud siniselt), kuid erinevad 2 nukleotiidi poolest miRNA 3' otsas (tähistatud punaselt). Modifitseeritud Paterson ja Kriegel, 2017 järgi.

TLR4 vahendatud NF-κB signaaliraja aktivatsioon indutseerib miR-146a ekspressiooni, samas kui miR-146a reguleerib IL-1 retseptori vahendatud kinaas 1 (IRAK1) ja TNF retseptori vahendatud faktor 6 (TRAF6) ekspressiooni, mistõttu on pärsitud NF-κB signaalirada (Javidan *et al.*, 2019; Mortazavi-Jahromi *et al.*, 2020; Taganov *et al.*, 2006). Lisaks on miR-146a üleekspressiooni korral näidatud proinflammatoorsete kemokiinide C-X-C motiiviga kemokiini ligand 1 (CXCL1) (ingl *C-X-C Motif Chemokine Ligand*) ja IL-8 avaldumise madalamat taset hingamisteede epiteelirakkudes (Kivihall *et al.*, 2019).

MiR-146b ekspressiooni regulatsioon ei ole hästi mõistetud, kuid on teada, et selles osaleb JAK-STAT signaalirada. Xiang *et al.* näitasid, et STAT3 aktivatsiooni tagajärjel suureneb miR-146b avaldumise tase, samas kui miR-146b omakorda surub alla NF-κB vahendatud IL-6 ekspressiooni, mis osaleb STAT3 aktiveerimises. Sellest tulenevalt võivad miR-146b ja STAT3

osaleda teineteise negatiivse tagasiside ringis (Xiang *et al.*, 2014). Lisaks on Hermann *et al.* näidanud, et kuigi keratinotsüütides on miR-146b tase märkimisväärselt madalam kui miR-146a ekspressioon, võib miR-146b toetada miR-146a põletikuvastast funktsiooni (Hermann *et al.*, 2017).

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

Magistritöö eesmärk oli välja selgitada, milline on inflammasoomi geenide ja nendega seotud IL-1 perekonna tsütokiinide ekspressioon inimese bronhiepiteeli rakkudes ning kuidas miR-146a mõjutab nende avaldumist rinoviirusinfektsiooni korral.

Täpsemad eesmärgid olid:

1. Teha kindlaks NLRP1 ja NLRP3 inflammasoomi geenide ja IL-1 perekonna tsütokiinide ekspressioon astma patsientide ja kontrollide bronhiharjaproovides.
2. Hinnata RV-A16 ja RV-A1b infektsiooni mõju NLRP1 ja NLRP3 inflammasoomi geenide ja IL-1 β , IL-18 tsütokiinide avaldumise tasemele inimese primaarsetes bronhiepiteeli rakkudes.
3. Välja selgitada, milline sensor osaleb inflammasoomi aktivatsioonis rinoviirusega A16 või A1b nakatatud inimese primaarsetes bronhiepiteeli rakkudes.
4. Analüüsida, kas ja kuidas mõjutab miR-146a bronhiepiteeli rakkude elulemust ja NLRP1, NLRP3 inflammasoomi geenide ja IL-1 perekonna tsütokiinide ekspressiooni bronhiepiteeli rakkudes RV infektsiooni korral.

2.2. Materjal ja meetodika

2.2.1. Töösse kaasatud inividid

Eksperimentides kasutati RNA-d, mis oli eraldatud 39 täiskasvanud astma patsiendi ja 11 kontrolli bronhiharjaproovidest. Astma patsientide hulgas oli 21 meest ja 18 naist, kontrollide hulgas 4 meest ja 7 naist. Patsiendid olid vastavalt hingamisteedes esinevatele immuunrakkudele jaotatud kolmeks astma fenotüübiks: eosinofiilne (bronhoalveolaarses vedelikus (BALF) >2% eosinofiile ja <3% neutrofiile), neutrofiilne (BALF-s <2% eosinofiile ja >3% neutrofiile) ja pausigranulotsütaarne (BALF-s <2% eosinofiile ja <3% neutrofiile). Bronhiharjaproovid saadi Jagellooni Ülikooli pulmonoloogia osakonnast (Krakow, Poola), kus toimus proovide kogumine ja RNA eraldamine. Edasine proovide analüüs toimus Tartu Ülikooli bio- ja siirdemeditsiini instituudis selle magistritöö raames. Uurimus oli lubatud Tartu Ülikooli inimuuringute eetikakomitee ning Jagellooni Ülikooli meditsinikolledži poolt ning uuritavad inividid allkirjastasid kirjaliku nõusolekuvormi.

2.2.2. Primaarsete inimese bronhiepiteeli rakkude kasvatamine

Primaarsed inimese bronhiepiteeli rakud (HBEC) saadi kingitusena Poola koostööpartneritelt (Bogdan Jakiela, Jageilloni Ülikool, Krakow, Poola). Eksperimentides kasutati 27-aastaselt, 30-aastaselt ja 34-aastaselt mitteastmaatilistelt naissoost doonoritelt kogutud passaaž 4 bronhiepiteeli rakke.

HBEC rakke kasvatati BEGM™ Bulletkit™ (Bronchial Epithelial Cell Growth Medium, Lonza, Šveits) söötmes, millele oli lisatud inimese epidermaalne kasvufaktor (hEGF) (1:1000), insuliin (1:1000), veise ajuripatsi ekstrakt (BPE, Bovine pituitary extract), trijoodtrüoniin (1:1000), hüdrokortisoon (1:1000), transferrin (1:1000), epinefriin (1:1000), retinoolhape (1:1000), gentamütsiin ja amfoteritsiin-B (1:1000). Söötme komponentide täpne kontsentratsioon ei ole tootja poolt avalikustatud. Rakke kasvatati veeauruga küllastatud keskkonnas, mille temperatuur oli 37°C ning CO₂ sisaldus 5%. Ligikaudu 70% konfluentsuse saavutamisel plaaditi rakud 10 cm diameetriga tassilt ümber uuele Petri tassile. Selleks eemaldati rakkudelt sööde, lisati 2 ml trüpsiini (Trypsin-EDTA in PBS, GE Healthcare, UK) ning rakke inkubeeriti 5 minutit 37°C juures. Trüpsiini toime peatamiseks lisati 4 ml trüpsiini neutraliseerivat lahust (Trypsin Neutralizer Solution, Invitrogen, USA) ja seejärel korjati rakud 15 ml tuubi. Petri tassi loputati 5 ml PBS-ga allesjäänud rakkude kogumiseks 15 ml tuubi. Rakke tsentrifuugiti 5 minutit toatemperatuuril 250 rcf juures, eemaldati supernatant ning rakud suspendeeriti 10 ml BEGM söötmes. Rakkude plaatimisel kontrolliti mikroskoobi all, et saavutatud oleks sobiv tihedus ning rakud asetati inkubaatorisse.

2.2.3. HBEC rakkude stimuleerimine rinoviirustega

Kasutusel olid rinoviirused A1b ja A16, mis saadi kingitusena koostööpartnerilt Sebastian L. Johnstonilt (National Heart and Lung Institute, Imperial College London, UK). Nakatuskordsuse (MOI) puhul arvestati, et MOI = 1, kui 1e⁶ rakkudele on lisatud 0,1 ml viiruslahust TCID₅₀ (ingl *tissue culture infective dose 50%*) väärtusega 1e⁷. 24 h enne katset külvati bronhiepiteeli rakud 12 kannuga plaadile, tihedusega ligikaudu 30 000 rakku kannus. Eksperimendi käigus lisati söötmesse RV A16 või RV A1b (MOI = 0,1) ning järgnes inkubatsioon 24 h või 48 h 37°C juures. Negatiivse kontrollina lisati söötmesse viiruspartikliteta HeLa rakkude kasvusöödet ehk “*mock*” lahust.

2.2.4. HBEC rakkude transfekterimine miRNA miimidega

24 h enne bronhiepiteeli rakkude transfektsiooni jagati rakud 12 kannuga plaadile, kus igas kannus oli ligikaudu 40 000 rakku. Eksperimendis kasutati miR-146a miimi (20 µM, Dharmacon™, USA) ja negatiivset kontroll-miR miimi (20 µM, Dharmacon™, USA), mis transporditi bronhiepiteeli rakkudesse kasutades peptiidi PepFect 14 (100 µM, PepMic, Hiina). MikroRNA miimide segu kontsentratsioon oli 30 nM. Selle saamiseks segati iga kannu kohta 93,38 µl vett, 5,12 µl peptiidi ja 1,5 µl miR-146a või kontroll-miR miimi. Segu inkubeeriti toatemperatuuril 1 h ning pipeteeriti 900 µl söötmesse. Rakkude sööde asendati transfektsiooniseguga ja järgnes inkubatsioon 24 h 37°C. Seejärel sööde koguti ELISA (ensüümseotud immunosorbentanalüüs) analüüsiks ning rakkudele lisati 500 µl QIAzol lüüsilahust (Qiagen, Saksamaa) RNA eraldamiseks.

2.2.5. HBEC rakkude transfekterimine siRNA miimidega

24 h enne eksperimenti külvati HBEC rakud 12 kannuga plaadile, igas kannus umbes 40 000 rakku. Kasutusel olid siNLRP1 miim (20 µM, Thermo Fisher Scientific, USA), siNLRP3 miim (20 µM, Thermo Fisher Scientific, USA) ja negatiivne kontroll-siR miim (20 µM, Thermo Fisher Scientific, USA), mille rakkudesse transportimiseks kasutati peptiidi PepFect 14 (100 µM, PepMic, Hiina). Transfektsioonisegu sisaldas 93,38 µl vett, 5,12 µl peptiidi ja 1,5 µl siNLRP1, siNLRP3 või kontroll-siR miimi. Segu lõppkontsentratsioon oli 30 nM. Enne segu lisamist 900 µl söötmesse, inkubeeriti seda 1 h toatemperatuuril. Seejärel rakkude vana sööde eemaldati ning asendati transfektsiooniseguga, misjärel plaat asetati 24 h 37°C inkubaatorisse. Ööpäeva möödudes koguti transfekteritud HBEC rakkude pealt sööde ELISA analüüsiks ja seejärel rakkudele lisati 500 µl QIAzol lüüsilahust RNA eraldamiseks.

2.2.6. RNA eraldamine

Bronhiepiteeli rakkudest RNA eraldamisel kasutati Total RNA Zol-Out komplekti (A&A Biotechnology, Poola). Rakulüsaat koguti 1,5 ml tuubidesse, kuhu lisati 110 µl kloroformi. Sellele järgnes 15-sekundiline segamine, 3-minutiline inkubatsioon toatemperatuuril ning 15-minutiline tsentrifuugimine 12 000 rcf 4°C juures (Eppendorf 5424 R, FA45-24-11 rootor, Saksamaa). Tekkinud vesifaas koguti uude 1,5 ml tuubi, seejärel lisati 600 µl isopropanooli, segati korduvalt üle korgi pöörates ja pipeteeriti minikolonnidele. Edasine töö toimus tootjapoolse protokoll järgi (A&A Biotechnology, Poola). RNA elueerimiseks kasutati 40 µl milliQ vett ja seejärel mõõdeti RNA kontsentratsiooni ja puhtust NanoDrop 2000c spektrofotomeetriga (Thermo Scientific, USA).

2.2.7. RT-qPCR mRNA ekspressiooni analüüsimiseks

RNA ekspressiooni uurimiseks kasutati RT-qPCR (reaalaja polümeraasi ahelreaktsioon) meetodit, mille jaoks sünteesiti RNA ahelale komplementaarne DNA ehk cDNA. cDNA saamiseks segati jääl 96 kannuga plaadil 11,5 µl RNA-d, 2 µl nukleotiidide segu (Thermo Scientific, USA) ja 1 µl Oligo(dT)₁₈ praimerit (TAG Copenhagen, Taani). Proove kuumutati 5 minutit 65°C juures ning asetati jääle. Igale segule lisati 4 µl RT puhvrit, 0,5 µl RNAasi inhibiitorit (Thermo Scientific, USA) ja 1 µl RT ensüümi (Thermo Scientific, USA). Seejärel kuumutati proove termotsükleris Mastercycler® nexus (Eppendorf, Saksamaa) 1h 42°C juures ning 10 min 75°C juures. Proovide lahjendamiseks lisati cDNA-le 480 µl milliQ vett.

Sünteesitud cDNA analüüsimiseks segati iga kannu kohta reaktsioonisegu, mis koosnes 2,6 µl milliQ veest, 2,4 µl 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR segust (Solis Biodyne, Eesti) ning 1 µl 4 µM F+R (*forward + reverse*) praimerit segust (Tabel 1) (TAG Copenhagen, Taani).

Tabel 1. Kasutatud praimerid

Praimer		Järjestus
hEF1A	F	CCACCTTTGGGTCGCTTTGCTGT
	R	TGCCAGCTCCAGCAGCCTTCTT
hCASP1	F	AAAGTCGGCAGAGATTTATCCA
	R	GATGTCAACCTCAGCTCCAG
hPYCARD	F	CTGGTCAGCTTCTACCTGGA
	R	CTATAAAGTGCAGGCCTGGC
hNLRP1	F	ACTTGTACCGAGTTCACCTCC
	R	CTGTGCTGTGGGTTGATCTC
hNLRP3	F	TCAGTCTGATTCAGGAGAACGA
	R	GGCTCTTGCCACTCTCCATC
hIL-1β	F	AGAAGTACCTGAGCTCGCCA
	R	TGGAAGGAGCACTTCATCTGT
hIL-18	F	CTGCAGTCTACACAGCTTCGGG
	R	TCCTGCGACAAATAGTTTGTGTC

Seejärel pipeteeriti 384 kannuga plaadil igasse kannu 6 µl reaktsioonisegu ning 6 µl cDNA-d, kusjuures iga proov oli kolmes korduses. Analüüsiks kasutati masinat ViiA™ 7 Real-Time PCR

System (Applied Biosystems, USA), mille programm on lisatud tabelisse 2. Geeniekspressioon normaliseeriti kasutades referentsgeeni EF1A (elongatsioonifaktor-1 alfa).

Tabel 2. mRNA analüüsi RT-qPCR programm

Etapp	Temperatuur (°C)	Kestvus	Korduste arv
Ensüümi aktivatsioon	95	15 min	1
Denaturatsioon	95	15 sek	40
Produkti paljundamine	60	1 min	
Dissotsiatsioon	95	15 sek	1
	60	1 min	
	95	15 sek	

2.2.8. ELISA valgutaseme analüüsimiseks

Bronhiepiteeli rakkude söötmes valgutasemete analüüsimiseks kasutati ELISA (ensüümseotud immunosorbentanalüüs) meetodit. IL-1 β ja IL-18 hulga tuvastamiseks kasutati ELISA MAX™ Deluxe Set Human IL-1 β (Biolegend, USA) ja Human Total IL-18 DuoSet ELISA (R&D Systems, USA) komplekti ja vastavaid tootjapoolseid protokolle. Tulemuste analüüsimisel kasutati Ledetect 96 mikroplaadi lugejat (Labexim Products, Austria). Valgukontsentratsioonid arvutati kasutades nelja parameetriga logistilise regressiooni mudelit ja veebitarkvara MyAssays (<https://myassays.com/>).

2.2.9. Lävivoolutsütomeetria

Rinovirusega nakatatud ja miR-146a transfekteeritud HBEC rakkude elulemuse analüüsimiseks kasutati lävivoolutsütomeetria. Peale 24h miRNA transfektsiooni ja 48h RV stimulatsiooni jäeti rakud transfekteerimata või lisati proovidele 15 μ l 100 μ M H₂O₂ 1h, et indutseerida rakusurma ning saada positiivne kontroll. Edasine töö toimus tootjapoolse protokoll järgi, kasutades Annexin A5 FITC/7AAD apoptoosi tuvastamise komplekti (Beckman Coulter, USA). Proove analüüsiti tsütomeetriga BD LSRFortessa (BD Biosciences, USA), kus elusateks loeti rakud, mis olid FITC⁻7AAD⁻ ja FITC⁻7AAD⁺, apoptootilisteks FITC⁺7AAD⁻ ja nekrootilisteks FITC⁺7AAD⁺.

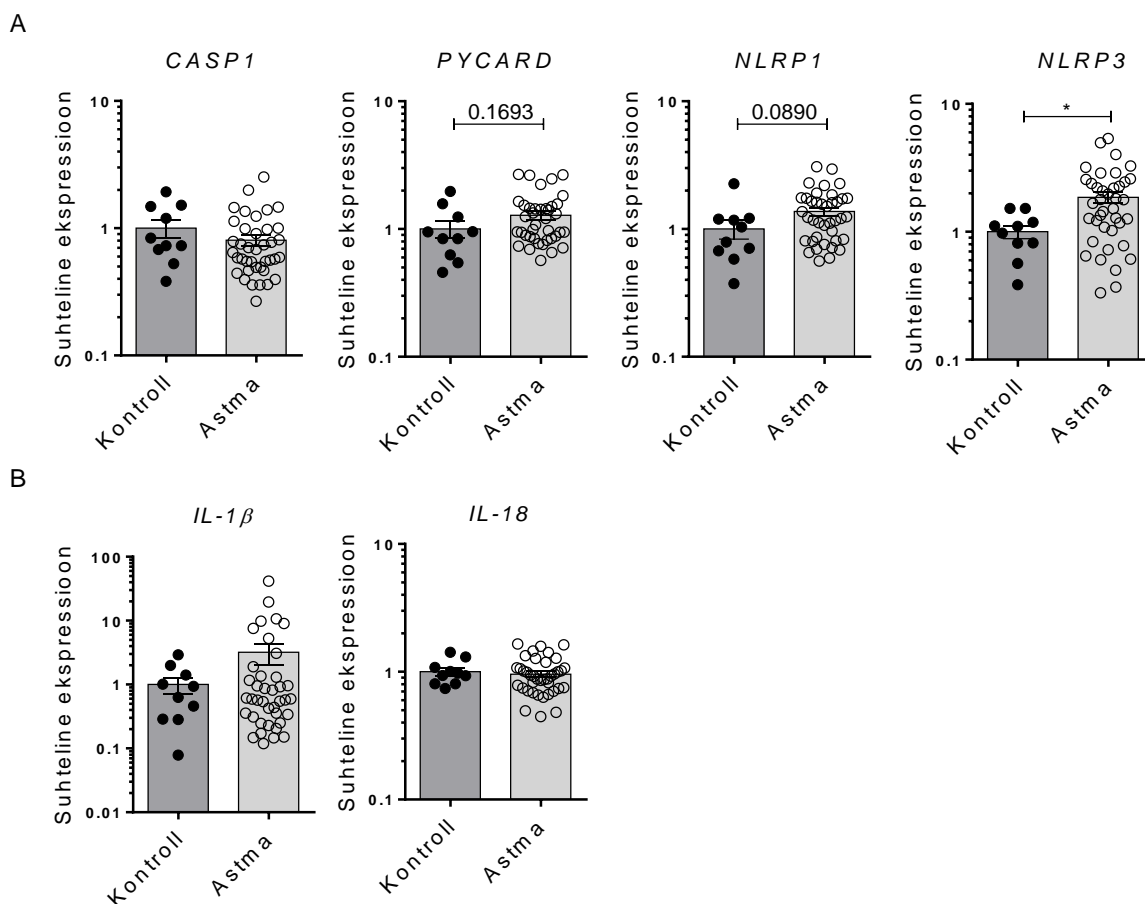
2.2.10. Statistiline analüüs

Statistiline analüüs viidi läbi kasutades programmi GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc, USA), kus tulemuste võrdluses kasutati ühesuunalist ANOVA (ingl *analysis of variance*) testi. Statistilise olulise määramisel jälgiti, et P-väärtus oleks väiksem kui 0,05. Joonistel on P-väärtused tähistatud järgmiselt: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$.

2.3. Tulemused

2.3.1. Inflammasoomi geenide ekspressioon on astma fenotüübi spetsiifiline

Magistritöö esimese eesmärgina uuriti, milline on inflammasoomi geenide ekspressioon astma patsientide ja kontrollide bronhiharjaproovides. Analüüsiti sensorite NLRP1 ja NLRP3, adaptor PYCARD ja efektor CASP1 ehk kaspasi avaldumist mRNA tasemel. Geeniekspressiooni analüüsist selgus, et võrreldes kontrollidega oli astma patsientidel harjaproovides kõrgem *NLRP1* ja *NLRP3* ekspressioon, kuid statistiliselt oluline erinevus leiti vaid *NLRP3* tasemes. *CASP1* ja *PYCARD* ekspressioonitasemed ei erinevad patsientide ja kontrollide vahel (Joonis 5A).

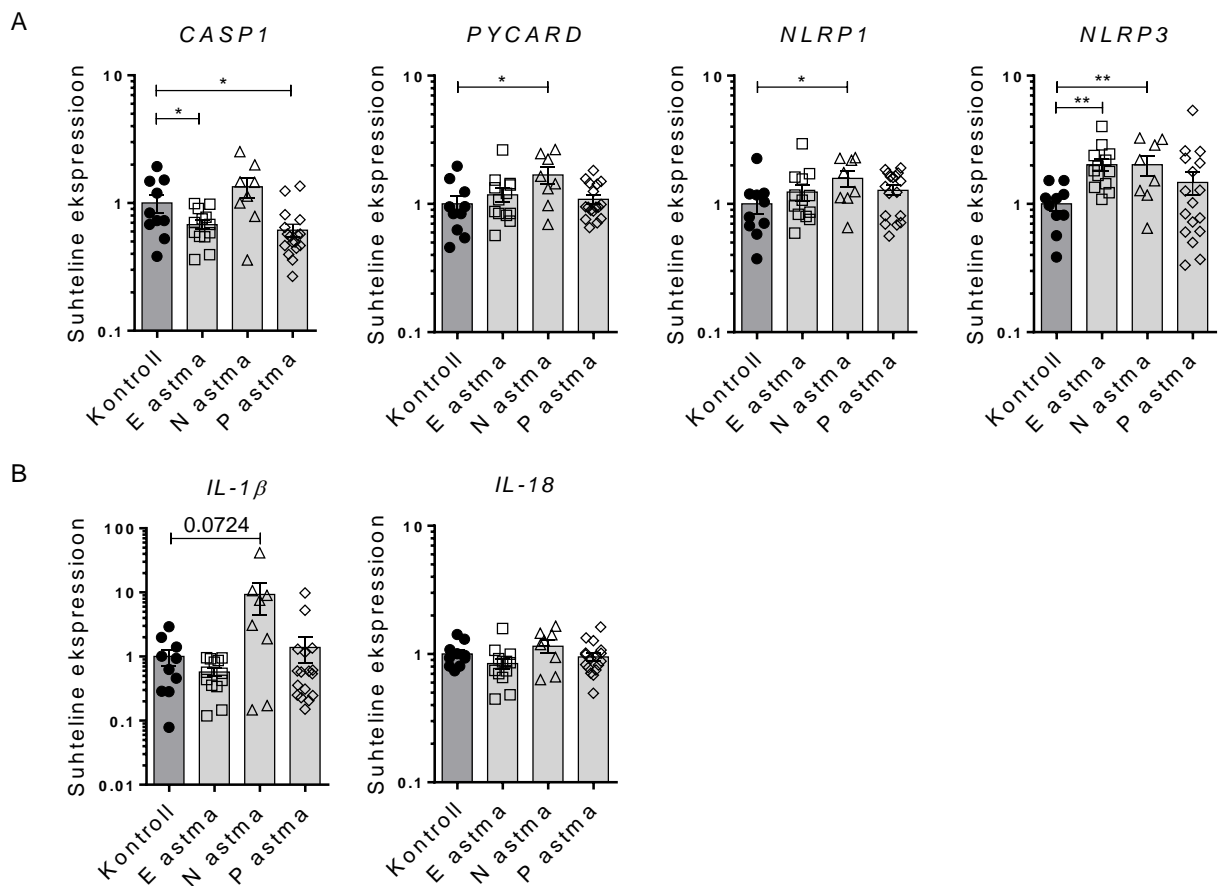


Joonis 5. Astma patsientidel on bronhiharjaproovides muutunud inflammasoomi geenide ekspressioon. Inflammasoomi geenide (A) ja nendega seotud IL-1 perekonna geenide (B) mRNA tase määrati RT-qPCR-i abil ja tulemused normaliseeriti koduhoidja geeni EF1A ja *mock* suhtes. Graafikutel on tulemused esitatud koos standardveaga. Statistilise olulisuse leidmiseks kasutati ANOVA testi, * $P < 0,05$. $N=50$.

Lisaks uuriti inflammasoomi geenidega seotud IL-1 perekonna tsütokiinide geeniekspressiooni ning leiti, et astma patsientidel esines tendents kõrgemaks *IL-1β* ekspressiooniks, kuid erinevused

IL-1 β ja *IL-18* tasemes ei olnud astma patsientide ja kontrollide vahel statistiliselt olulised (Joonis 5B).

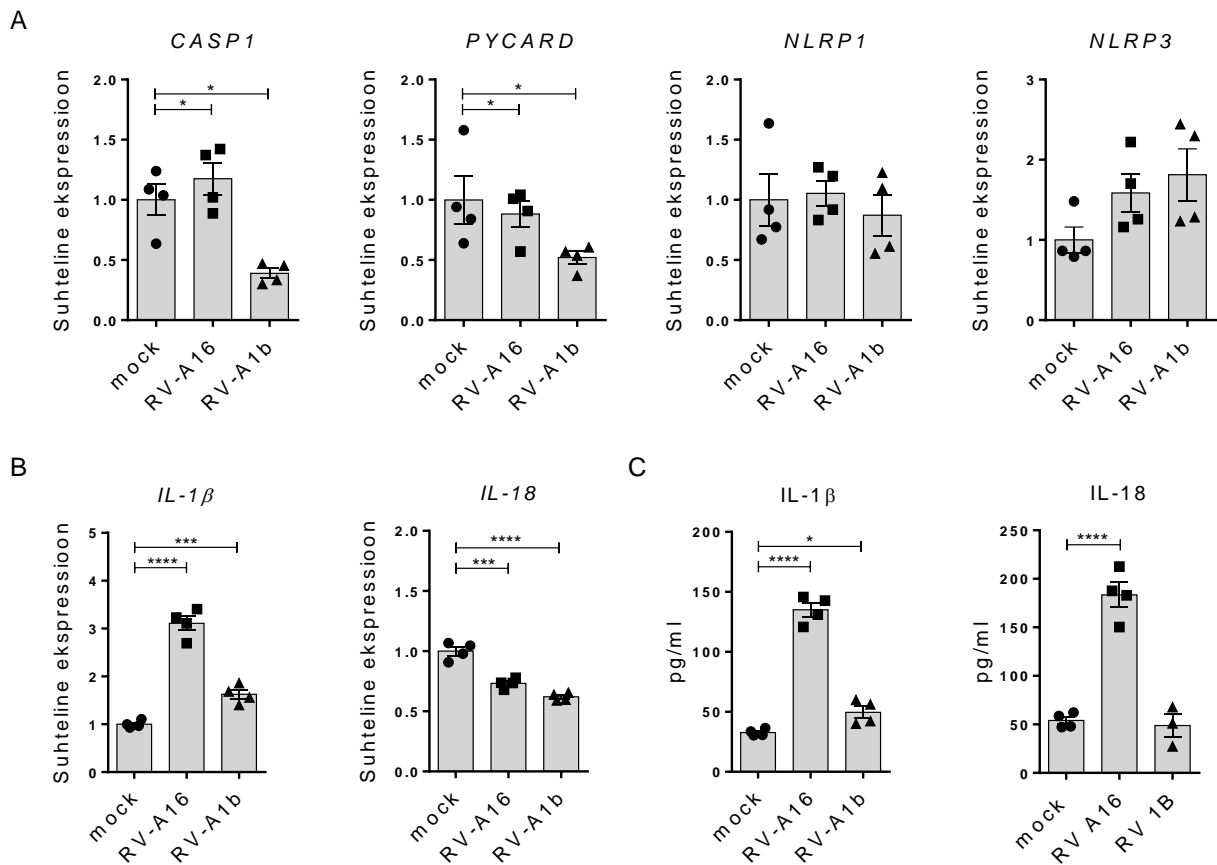
Järgmisena jaotati astma patsiendid vastavalt hingamisteedes esinevatele immuunrakkudele 3 fenotüübiks (kirjeldatud peatükis 2.2.2.) ning vaadati, kas inflammasoomi geenide ning *IL-1 β* ja *IL-18* ekspressioon on astma patsientide gruppides erinev. Selgus, et eosinofiilse astmaga patsientidel oli kontrollidest madalam *CASP1* ja kõrgem *NLRP3* ekspressioon (Joonis 6A). Samas oli neutrofiilse astmaga patsientidel kontrollidest kõrgem *PYCARD*, *NLRP1*, *NLRP3* (Joonis 6A) ja *IL-1 β* ekspressioon (Joonis 6B). Pautsigranulotsütaarse astmaga patsientidel oli madalam *CASP1* tase kui kontrollidel, kuid *PYCARD*, *NLRP1*, *NLRP3*, *IL-1 β* ja *IL-18* ekspressioon oli kontrollidega sarnane (Joonis 6).



Joonis 6. Inflammasoomi geenide ekspressioon erineb astma fenotüüpide vahel. Inflammasoomi geenide (A) ja nendega seotud IL-1 perekonna geenide (B) mRNA ekspressioon tuvastati RT-qPCR-i abil ja tulemused normaliseeriti koduhoidja geeni *EF1A* ja *mock* suhtes. Graafikutel on tulemused kujutatud koos standardveaga. Statistilise olulisuse leidmiseks kasutati ANOVA testi, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$. $N=50$.

2.3.2. RV infektsioon HBEC rakkudes suurendab *IL-1 β* ekspressiooni mRNA tasemel ning *IL-1 β* ja *IL-18* sekreteerumist

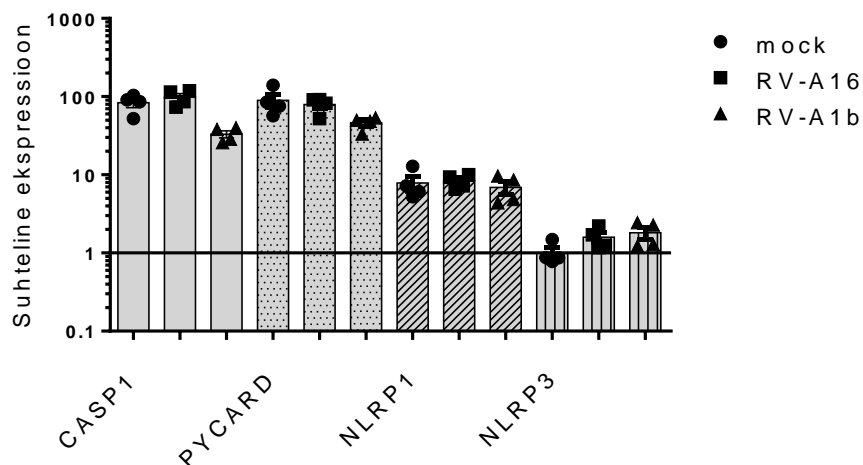
Rinoviirused põhjustavad sageli astma ägenemist, mistõttu järgmisena sooviti teada saada, kas ja kuidas mõjutab rinoviirusinfektsioon inflammasoomi geenide ja nendega seotud *IL-1* perekonna geenide ekspressiooni. Selleks stimuleeriti HBEC rakke 48h rinoviirusega A16 või A1b. Tulemusena selgus, et RV-A16 nakkuse korral suurenes HBEC rakkudes *CASP1* ja vähenes *PYCARD* ekspressioon võrreldes negatiivse kontrolliga (*mock*). RV-A1b infektsiooni järel oli näha nii kontrollist madalamat *CASP1* kui ka *PYCARD* avaldumise taset. *NLRP1* ja *NLRP3* ekspressioonitasemes ei olnud rinoviirusnakkuse korral näha statistiliselt olulist erinevust kontrollist (Joonis 7A).



Joonis 7. Rinoviirusinfektsioon avaldab mõju inflammasoomi geenide ekspressioonile HBEC rakkudes. HBEC rakkudele lisati RV-A16 või RV-A1b 48 tunniks. Inflammasoomi geenide (A) ja *IL-1* perekonna tsütokiinide (B) mRNA ekspressioonitase määrati kasutades RT-qPCR-i ning tulemused normaliseeriti koduhoidja geeni *EF1A* ja *mock* suhtes. Valgutase (C) leiti ELISA meetodil. Tulemused on graafikutel kujutatud standardveaga. Tulemuste statistiliseks analüüsiks kasutati ANOVA testi, * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$. $N=4$.

Samuti avaldasid rinoviirused A16 ja A1b mõju *IL-1 β* ja *IL-18* ekspressioonitasemele. Täpsemalt oli *IL-1 β* mRNA tase mõlema viirusnakkuse korral märkimisväärselt suurem kui negatiivses kontrollis (Joonis 7B). Seda kinnitas ka sekreteeritud valgu taseme analüüs, mis näitas rinoviirusinfektsiooni korral HBEC rakkude söötmes suuremat IL-1 β hulka kui kontrollis (Joonis 7C). Vastupidiselt *IL-1 β* avaldumise tasemele, oli *IL-18* geeniekspressioon mRNA tasemel HBEC rakkudes nii RV-A16 kui ka RV-A1b nakkuse korral madalam kui kontrollis (Joonis 7B). Samas esines RV-A16 stimulatsiooni korral HBEC rakkude söötmes rohkem IL-18 valku kui kontrollproovides. RV-A1b nakkuse korral ei olnud söötimest tuvastatud IL-18 valgu tasemes võrreldes kontrolliga statistiliselt olulist muutust (Joonis 7C).

Lisaks võrreldi inflammasoomi geenide ekspressioonitaset bronhiepiteeli rakkudes. Selgus, et efektor *CASP1* ja adaptor *PYCARD* avaldumise tase on HBEC rakkudes kõige suurem. Sensorite ekspressioonitaset vaadates oli näha, et HBEC rakkudes toodetakse *NLRP1* märkimisväärselt rohkem kui *NLRP3* (Joonis 8).

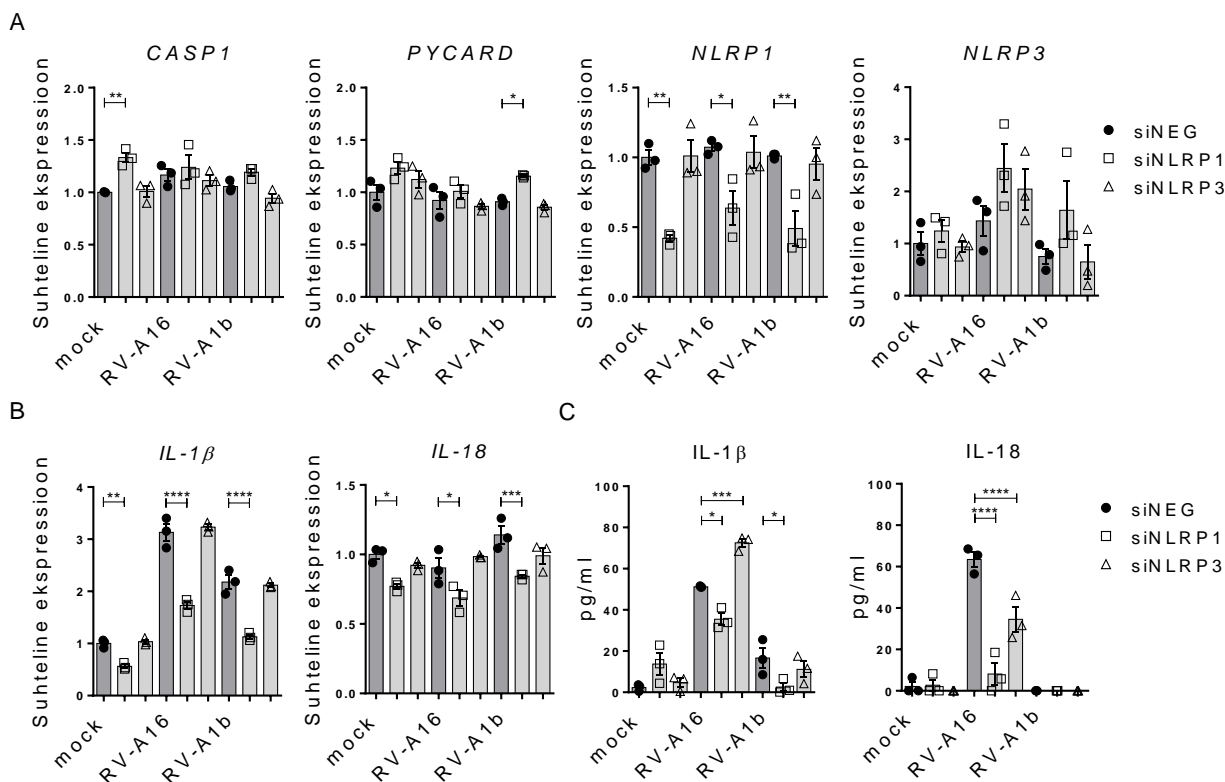


Joonis 8. Inflammasoomi geenide ekspressioonitase võrdlus HBEC rakkudes. HBEC rakke stimuleeriti rinoviirusega A16 või A1b 48 tundi. Inflammasoomi geenide mRNA ekspressioonitase määrati RT-qPCR meetodil ning tulemused normaliseeriti koduhoidja geeni *EF1A* ja *mock* suhtes. N=4.

2.3.3. RV stimuleeritud IL-1 β ja IL-18 ekspressioon HBEC rakkudes on NLRP1 sõltuv

Eelnevalt näidati, et astma patsientidel oli kõrgem *NLRP1* ja *NLRP3* avaldumise tase kui kontrollidel, kuid rinoviirusega A16 või A1b nakatud HBEC rakkudes ei ilmnunud *NLRP1* ega *NLRP3* ekspressioonis statistiliselt olulist muutust võrreldes *mock*-ga. Seetõttu sooviti järgmisena välja selgitada, milline sensor on oluline inflammasoomi moodustamisel rinoviirusinfektsiooni

korral. Selleks transfekeeriti HBEC rakke 24h siNEG, siNLRP1 või siNLRP3-ga ning seejärel stimuleeriti 24h rinoviirusega A16 või A1b. NLRP1 vastase siRNA kasutamisel oli igas tingimuses näha statistiliselt oluliselt madalamat *NLRP1* geeniekspressiooni võrreldes negatiivse kontrolliga (siNEG) transfekeeritud rakkudega (Joonis 9A).



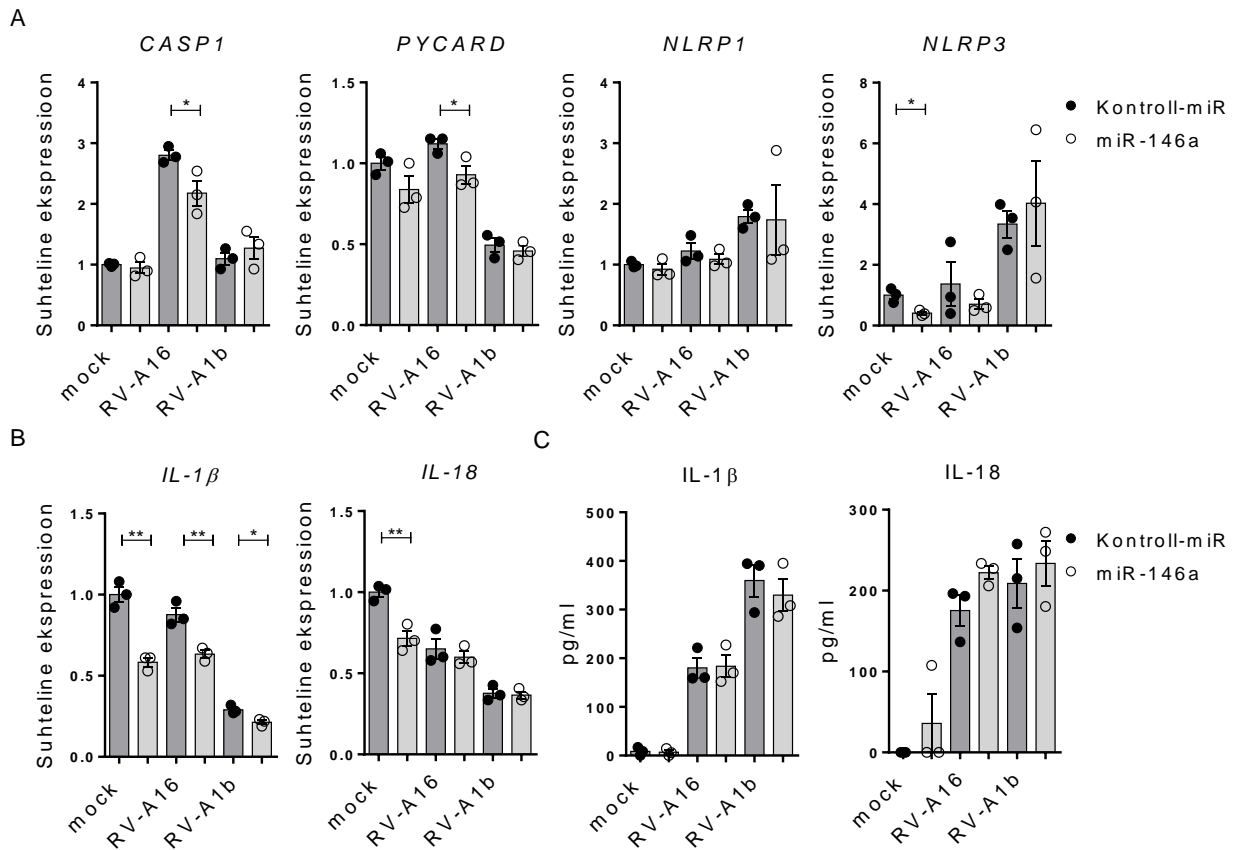
Joonis 9. siNLRP1, siNLRP3 ja siNEG transfektsiooni mõju inflammasoomi geenide ekspressioonile HBEC rakkudes RV infektsiooni korral. HBEC rakke transfekeeriti 24h siNEG, siNLRP1 või siNLRP3-ga ning stimuleeriti 24h rinoviirusega A16 või A1b. Inflammasoomi geenide (A) ja IL-1 perekonna tsütokiinide (B) geeniekspressioon leiti RT-qPCR-i abil ja tulemused normaliseeriti koduhoidja geeni *EF1A* ja negatiivse kontroll-siRNA suhtes. Valguekspressioon (C) tuvastati ELISA meetodil. Statistilise olulisuse leidmiseks kasutati ANOVA testi, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$. $N=3$.

Lisaks leiti, et siNLRP1 transfektsiooni korral ei olnud efektor *CASP1* ekspressioonis statistiliselt olulist erinevust rinoviirusega nakatatud bronhiepiteeli rakkudes võrreldes kontroll-siRNA-ga. Samas adaptormolekul *PYCARD* tase oli siNLRP1 transfekeeritud rakkudes RV-A1b infektsiooni korral kõrgem kui kontrolltransfektsiooni korral (Joonis 9A). Nii *IL-1β* kui ka *IL-18* ekspressioonitase oli NLRP1 vaigistamisel märkimisväärselt madalam kui kontroll-transfekeeritud grupis ning seda nii *mock* stimulatsiooni kui ka rinoviirus A16, A1b infektsiooni korral (Joonis 9B). siNLRP3 transfekeerimisel ei tulnud võrreldes siNEG kontrolliga esile

statistiliselt olulist erinevust *NLRP3* ekspressioonis. Samuti ei esinenud siNLRP3 ja siNEG transfekteeritud HBEC rakke võrreldes statistiliselt olulisi erinevusi inflammasoomi geenide *CASP1*, *PYCARD* ja *NLRP1* (Joonis 9A) ega nendega seotud *IL-1 β* ja *IL-18* (Joonis 9B) mRNA ekspressioonitasemes rinoviirusinfektsiooni korral. Sarnaselt geeniekspressiooni tulemustele, näitas valgutaseme analüüs (Joonis 9C), et rinoviiruse A16 ja A1b infektsiooni korral oli *IL-1 β* tase siNLRP1 transfekteeritud HBEC rakkudes märkimisväärselt madalam kui kontrollinfektsiooni korral. Samuti oli *IL-18* valgu tase siNLRP1 transfekteeritud rakkudes statistiliselt oluliselt madalam kui siNEG transfekteeritud rakkudes RV-A16 nakkuse korral. siNLRP3 transfekteeritud HBEC rakkudes oli RV-A16 infektsiooni korral kõrgem *IL-1 β* ja madalam *IL-18* ekspressioon kui siNEG transfekteeritud rakkudes (Joonis 9C). Rinoviirusega A1b nakatatud bronhiepiteeli rakkudes ei olnud siNLRP3 ja siNEG transfektsioonide korral olulist erinevust *IL-1 β* ekspressioonitasemes. *Mock* või RV-A1b stimuleeritud HBEC rakkude poolt sekreteeritava *IL-18* tase oli väga madal, mistõttu ei ole võimalik nendes proovides välja tuua erinevusi *IL-18* ekspressioonis erinevate transfektsioonide korral (Joonis 9C).

2.3.4. MiR-146a transfektsioon vähendab HBEC rakkudes RV indutseeritud *CASP1*, *PYCARD* ja *IL-1 β* ekspressiooni

Varasemalt on näidatud, et rinoviirusinfektsiooni korral esineb HBEC rakkudes suurenenud miR-146a ekspressioon (Laanesoo *et al.*, 2021). Seetõttu uuriti järgmisena, kas ja kuidas reguleerib miR-146a inflammasoomi geenide ning *IL-1 β* ja *IL-18* ekspressiooni HBEC rakkudes RV infektsiooni korral. Selleks transfekteeriti bronhiepiteeli rakke 24 tundi miR-146a või negatiivse kontroll-miRNA-ga ning seejärel nakatati rakke RV-A16 või RV-A1b-ga 48 tundi. Selgus, et miR-146a transfekteeritud HBEC rakkudes oli *CASP1* ja *PYCARD* tase RV-A16 nakkuse korral võrreldes kontrollinfektsiooniga allareguleeritud. Samas RV-A1b infektsiooni korral miR-146a transfekteeritud bronhiepiteeli rakkudes *CASP1* ja *PYCARD* ekspressioonis olulisi erinevusi võrreldes kontrollinfektsiooniga ei ilmnunud. *NLRP1* ja *NLRP3* ekspressioonitasemes ei olnud samuti näha statistiliselt olulist erinevust miR-146a ja kontroll-miR transfekteeritud HBEC rakkudes rinoviirusnakkuse korral (Joonis 10A).

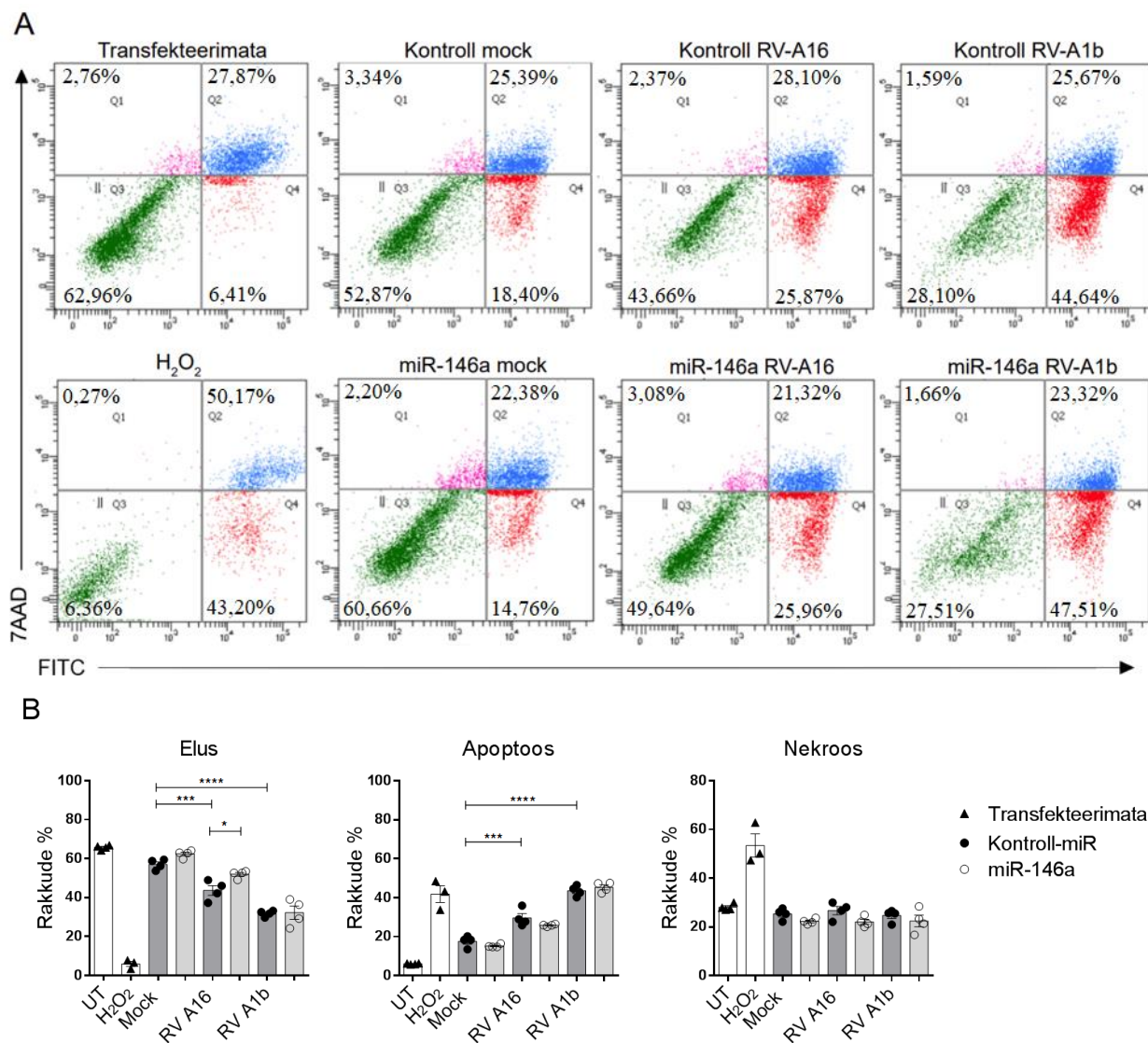


Joonis 10. MiR-146a mõjutab inflammasoomi geenide avaldumise mRNA taset rinoviirusega nakatatud HBEC rakkudes. Bronhiepiteeli rakke transfekteeeriti 24 tundi miR-146a või negatiivse kontroll-miRNA-ga ning seejärel nakatati rinoviirusega A16 või A1b 48 tundi. Inflammasoomi geenide (A) ja IL-1 perekonna (B) geeniekspressioon määramiseks kasutati RT-qPCR-i ning tulemused normaliseeriti koduhoidja geeni *EF1A* ja negatiivse kontroll-miRNA suhtes. Valgutase (C) leiti kasutades ELISA meetodit. Statistiline olulisus määrati ANOVA testiga, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$. $N=3$.

Samas, oli miR-146a transfektsiooni korral HBEC rakkudes *IL-1β* avaldumise tase oluliselt madalam kui kontrolltransfekteeeritud rakkudes nii *mock*, RV-A16 kui ka RV-A1b stimulatsiooni korral. *IL-18* ekspressioonitasemes ei ilmnenud muutusi transfekteeeritud ja transfekteeerimata HBEC rakkudes rinoviirusinfektsiooni korral (Joonis 10B). Valgutase analüüs näitas, et sarnaselt peatükis 2.3.2. toodud rinoviiruse eksperimendile, on ka miR-146a transfekteeeritud rakkudes näha, kuidas RV-A16 ja RV-A1b stimuleerivad bronhiepiteeli rakkudes IL-1β ja IL-18 sekretsiooni. Siiski valgu tasemel ei ilmnenud statistiliselt olulist muutust IL-1β ega IL-18 ekspressioonitasemes rinoviirusega nakatatud HBEC rakkudes miR-146a transfektsiooni korral (Joonis 10C).

2.3.5. MiR-146a transfektsioon suurendab elusrakkude osakaalu HBEC rakkude hulgas rinoviiruse infektsiooni korral

Inflammasoomi aktivatsiooniga võib kaasneda rakusurm (Sand *et al.*, 2019), mistõttu viimasena taheti välja selgitada, millist mõju avaldab miR-146a transfektsioon HBEC rakkude elulemusele rinoviirusinfektsiooni korral. Selleks transfekteriti bronhiepiteeli rakke miR-146a-ga 24h ning nakatati rinoviirusega A16 või A1b 48h. Elusrakkudeks loeti Q1 ja Q3 sektorites olevad rakud, nekroosis olid Q2 sektori rakud ja apoptoosis olid Q4 sektori rakud (Joonis 11A)



Joonis 11. MiR-146a transfektsioon avaldab mõju HBEC rakkude elulemusele rinoviirusnakkuse korral. Bronhiepiteeli rakke transfekteriti miR-146a-ga 24h ning stimuleeriti rinoviirusega A16 või A1b 48h. Tulemused on kujutatud *dotblotina* (A), mille põhjal saadi graafikutel (B) esitatud rakkude koguhulgast protsentuaalsed väärtused. Statistilise olulisuse leidmiseks kasutati ANOVA testi, *** P < 0,001; **** P < 0,0001. N=4.

Selgus, et transfekteeeritud rakkude hulgas esineb rohkem apoptoosi kui transfekteeerimata grupis ning rinoviirusinfektsioon indutseerib apoptoosi märkimisväärselt rohkem kui *mock* (Joonis 11). Elusrakkude hulgas oli transfekteeeritud rakkudest kõige rohkem *mock*-ga stimuleeritud HBEC rakke, kuid nende puhul ei ilmnunud miR-146a ja kontroll-miR transfektsiooni korral olulist erinevust. Samas, miR-146a transfektsiooni korral oli suurem hulk rinoviirusega A16 nakatatud elus bronhiepiteeli rakke kui kontrolltransfektsiooni korral. RV-A1b nakatatud HBEC rakkude elulemuses ei olnud olulisi erinevusi miR-146a ja kontroll-miR transfektsiooni vahel. Rinoviirusega A16 või A1b nakatatud HBEC rakkudes esines rohkem apoptoosi kui *mock* grupis, kuid nii *mock*, RV-A16 kui ka RV-A1b stimuleeritud bronhiepiteeli rakkudes ei olnud märkimisväärselt vähem apoptoosi miR-146a transfektsiooni korral võrreldes kontrolltransfektsiooniga. Nekrootiliste rakkude hulgas ei tulnud välja olulist erinevust võrreldes *mock*, RV-A16 ja RV-A1b stimuleeritud HBEC rakke ning ka miR-146a transfektsioon ei avaldanud rakkude nekroosile märkimisväärselt mõju (Joonis 11B).

2.4. Arutelu

Astma on levinud krooniline põletikuline hingamisteede haigus, mida jaotatakse hingamisteedes olevate immuunrakkude hulga alusel eosinofiilseks, neutrofiilseks ja pausigranulotsütaarseks fenotüübiks (Veerati et al., 2020, Wen et al., 2022). Sõltumata haiguse fenotüübist, sageli kaasneb rinoviirusinfektsiooniga astma ägenemine (Song & Wang, 2022, Jakiela et al., 2021). Inflammasoomid on valgukompleksid, mis omavad olulist rolli võitluses patogeenidega (Z. Li et al., 2022). Varasemad uuringud on näidanud, et nii rinoviiruse nakkuse kui astma korral esineb muutunud miR-146a ekspressioon (Laanesoo et al., 2021; Rodrigo-Munoz et al., 2019). Sellest lähtuvalt uuriti magistritöös, milline on inflammasoomi geenide ja nendega seotud IL-1 perekonna tsütokiinide ekspressioon astma patsientide bronhiharjaproovides ja inimese bronhiepiteeli rakkudes ning millist mõju avaldab miR-146a üleekspressioon inflammasoomi geenide avaldumise tasemele ja bronhiepiteeli rakkude elulemusele rinoviirusinfektsiooni korral.

Esimesena analüüsiti geeniekspressiooni astma patsientidelt ja kontrollidelt kogutud bronhiharjaproovides. Tulemusena selgus, et astma patsientidel oli bronhiharjaproovides kõrgem inflammasoomi sensorite *NLRP1* ja *NLRP3* ekspressioon kui kontrollidel, mis viitab, et astma patsientidel võivad inflammasoomid olla aktiveeritud. *NLRP3* ekspressiooni muutust on näidanud ka Kim et al., kes tuvastasid astma patsientide bronhoalveolaarses vedelikus kõrgema *NLRP3* ja *CASP1* ekspressiooni kui kontrollides (S. R. Kim et al., 2014). Samas, käesolevas magistritöös ei täheldatud olulisi erinevusi astma patsientidel ja kontrollidel adaptor *PYCARD*, efektor *CASP1* ja tsütokiinide *IL-1 β* , *IL-18* ekspressioonis. Kuna astma on väga heterogeenne haigus, mille puhul eristatakse mitmeid fenotüüpe (X. Wen et al., 2022), siis muutused patsientide geeniekspressioonis ei pruugi ilmneda kõikide patsientide proove koos analüüsid. Lisaks, magistritöö tulemuste erinevus Kim et al. uuringu tulemustest võib tuleneda sellest, et bronhoalveolaarne vedelik ja bronhiharjaproov on erineva rakulise koostisega. Varasemalt on Lachowicz-Scroggins et al. näidanud, et astma patsientide rögas oli kõrgem *CASP1* aktiivsus ja *IL-1 β* ekspressioon kui kontrollidel, mis viitab inflammasoomi aktivatsioonile, kuid nende uurimuses keskenduti hingamisteede neutrofiiliale (Lachowicz-Scroggins et al., 2019). Sarnaselt, ka käesoleva magistritöö raames läbi viidud analüüsis ilmnesis erinevused inflammasoomi geenide ja IL-1 perekonna avaldumise tasemetes võrreldes kontrollidega alles siis, kui astma patsiendid jagati vastavalt hingamisteedes esinevatele immuunrakkudele fenotüüpideks. Eriti märkimisväärsed olid muutused neutrofiilse astmaga patsientide geeniekspressioonis, kus täheldati kontrollidest kõrgemat *PYCARD*, *NLRP1*, *NLRP3* ja *IL-1 β* ekspressiooni. Neutrofiilne

astma on üks raskemalt kulgevaid astma fenotüüpe ning on teada, et IL-1 β indutseerib neutrofiilide migreerumist põletikukoldesse (Abdo *et al.*, 2021; Z. Li *et al.*, 2022), millest tulenevalt võib arvata, et inflammasoomi aktivatsioon mõjutab põletikulisi protsesse neutrofiilse astma korral. Erinevalt neutrofiilsest astmast, oli eosinofiilse astmaga patsientidel suurenenud ainult *NLRP3* sensori avaldumise tase. On võimalik, et erineva fenotüübiga astma korral osaleb inflammasoomi aktivatsioonis ka erinev sensor. Neutrofiilse astma korral on leitud kõrgem *NLRP1* ja *NLRP3* ekspressioon astma patsientide rögas, võrreldes eosinofiilse ja pautsigranulotsütaarse astmaga (Rossios *et al.*, 2018). Ma *et al.* on näidanud, et *NLRP3* indutseeris eosinofiilse astma korral hiire hingamisteede põletikku (Ma *et al.*, 2021). Eelnevate tulemuste põhjal võib arvata, et neutrofiilse astma kujunemises osalevad nii *NLRP1* kui *NLRP3*, samas kui eosinofiilse astma korral mängib olulist rolli just *NLRP3* sensor. Pautsigranulotsütaarse astmaga patsientidel ei ilmnenud oluliselt suurenenud inflammasoomi geenide ekspressiooni ning *CASP1* tase oli hoopis langenud, mis võib viidata lihtsamini kulgevale haigusele. See on kooskõlas ka varasemate uuringutega, mis on näidanud, et pautsigranulotsütaarset fenotüüpi iseloomustab kergem põletik ning paremini funktsioneerivad kopsud (Ntontsi *et al.*, 2017). Nendest tulemustest lähtuvalt võib arvata, et inflammasoomi geenide ekspressioon on eri astma fenotüüpides erinev.

On teada, et rinoviirused põhjustavad sageli astma ägenemist ning seetõttu sooviti magistritöös ka välja selgitada, kuidas mõjutab rinoviirusinfektsioon inflammasoomi geenide ja nendega seotud IL-1 β ja IL-18 ekspressiooni inimese primaarsetes bronhiepiteeli rakkudes. Varasemalt on näidatud rinoviirusega nakatatud hiirte kopsudes kõrgemat *NLRP3*, *CASP1* ja IL-1 β valguekspressiooni kui kontrollgrupis (Han *et al.*, 2019). Magistritöö tulemusena selgus, et rinoviirused A16 ja A1b ei indutseerinud oluliselt sensorite *NLRP1* ja *NLRP3* mRNA ekspressiooni HBEC rakkudes ning adaptor *PYCARD*, efektor *CASP1* tase oli HBEC rakkudes statistiliselt oluliselt, kuid vähesel määral muutunud. Samas, nii RV-A16 kui ka RV-A1b infektsioon HBEC rakkudes põhjustas suurenenud IL-1 β ekspressiooni, kui võrrelda negatiivse *mock* grupiga. Kooskõlas mRNA tasemel muutustega, tuvastati oluliselt kõrgem IL-1 β ekspressioon ka valgu tasemel. Samuti põhjustas RV-A16 nakkus võrreldes kontrolliga suurenenud IL-18 sekretsiooni HBEC rakkudest. Robinson *et al.* leidsid, et RV-A16 infektsioon indutseeris inimese bronhi- ja nasaalepiteeli rakkudes IL-1 β , IL-18 ekspressiooni ning bronhiepiteeli rakkudes tuvastati ka aktiivne kaspas-1 (Robinson *et al.*, 2020). Kuigi magistritöös inflammasoomi komponentide ekspressioonis ei ilmnenud mRNA tasemel olulisi

muutusi, siis IL-1 β ja IL-18 sekretsioon HBEC rakkudest oli märkimisväärselt suurenenud, mis viitab, et inflammasoomi komponentide avaldumine võib erineda mRNA ja valgu tasemel. Seetõttu oleks vaja RV-A16 ja A1b indutseeritud inflammasoomi aktivatsiooni kinnitada edasistes uuringutes, analüüsides CASP-1 aktiivsust HBEC rakkudes RV infektsiooni korral, näiteks kasutades meetodina FAM-FLICA kaspas-1 fluorestsentsmärgisega komplekti.

Primaarsetes bronhiepiteeli rakkudes täheldati märkimisväärselt suuremat *NLRP1* ekspressiooni võrreldes *NLRP3* avaldumisega, kuid astma patsientide bronhiharjaproovides leiti võrreldes kontrollidega kõrge ekspressioon nii *NLRP1* kui *NLRP3* puhul, mistõttu järgmisena uuriti, milline sensor on oluline inflammasoomi aktivatsioonis rinoviirusinfektsiooni korral. Varasemad uuringud on näidanud, et RV on võimeline aktiveerima nii NLRP1 kui ka NLRP3 sensorit (Han *et al.*, 2019; Robinson *et al.*, 2020). Et teada saada, milline sensor vahendab RV infektsiooni korral inflammasoomi aktivatsiooni HBEC rakkudes, transfekteeiti bronhiepiteeli rakkudesse NLRP1-le või NLRP3-le seonduvad siRNA-d, misjärel HBEC rakke nakatati rinoviirusega. siNLRP1 transfektsiooni korral esines rinoviirusega A16 või A1b nakatatud bronhiepiteeli rakkudes madalam *NLRP1* ekspressioon kui kontroll-siRNA kasutamisel, millest järeldati, et siNLRP1 oli efektiivne. NLRP1 vaigistamisel oli näha märkimisväärselt langenud IL-1 β ja IL-18 ekspressiooni võrreldes kontrolliga, mis viitab, et RV infektsiooni korral on NLRP1 vajalik IL-1 β ja IL-18 avaldumiseks bronhiepiteeli rakkudes. Kooskõlas nende tulemustega, Robinson *et al.* leidsid, et CRISPR-Cas9 süsteemiga NLRP1 geeni välja lülitamine inhibeerib RV-A16 indutseeritud IL-1 β ja IL-18 ekspressiooni inimese bronhiepiteeli rakkudes (Robinson *et al.*, 2020). Sarnaselt eelmisele katsele ei olnud NLRP1 vaigistamisel märkimisväärselt mõju *CASP1* mRNA ekspressioonile ning järelduste tegemiseks oleks vaja *CASP1* avaldumist analüüsida ka valgu tasemel. *NLRP3* ekspressioonitasemes ei täheldatud siNLRP3 transfektsiooni korral olulist erinevust võrreldes kontrolltransfektsiooniga, mis viitas, et siRNA transfektsioon ei olnud efektiivne. Kuna *NLRP3* mRNA tase oli HBEC rakkudes väga madal ja eksperimentide tulemused olid varieeruvad, siis on võimalik, et *NLRP3* ekspresseerub bronhiepiteeli rakkudes vähe. On siiski huvitav, et siNLRP3 transfekteeitud bronhiepiteeli rakkudes leiti RV-A16 nakkuse korral kõrgem IL-1 β ja madalam IL-18 valgu ekspressioon kui kontrollis. Sellest tulenevalt võib arvata, et IL-1 β ja IL-18 ekspressioon on erinevalt reguleeritud. Kuna eelnevalt välja toodud rinoviirusega bronhiepiteeli rakkude nakatamise katses indutseeris RV-A16 nii IL-1 β kui IL-18 sekretsiooni, siis on võimalik, et IL-1 β , IL-18 sekretsiooni erinev regulatsioon on põhjustatud transfektsiooni kõrvalmõjudest. Tulenevalt *NLRP1* kõrgemast ekspressioonitasemest

HBEC rakkudes võrreldes *NLRP3*-ga ning *NLRP1* vaigistamisega kaasnenud madalamast *IL-1 β* ja *IL-18* ekspressioonist, võib oletada, et inimese primaarsetes bronhiepiteeli rakkudes on *NLRP1* olulisem sensor inflammasoomi aktivatsioonis rinoviirusinfektsiooni korral kui *NLRP3*. On siiski võimalik, et *NLRP3* on oluline RV indutseeritud inflammasoomi aktivatsioonis teistes rakutüüpides, sest varasematest uuringutest on teada, et *NLRP3* osaleb inflammasoomi aktivatsioonis hiire kopsudes ja makrofaagides (Han *et al.*, 2019).

Kuna miR-146a on põletikku pärssiv miRNA (L. Zhang *et al.*, 2020), uuriti magistritöös, kuidas mõjutab miR-146a üleekspressioon inflammasoomi geenide ja *IL-1 β* , *IL-18* ekspressiooni. Bronhiepiteeli rakkudesse miR-146a transfekteerides oli näha madalamat *CASP1* ja *PYCARD* ekspressiooni rinoviirus A16 infektsiooni korral ning *IL-1 β* mRNA tase oli madalam miR-146a transfekteeritud rakkudes nii RV-A16 kui ka RV-A16 nakkuse korral, samas kui valgu tasemel efekt puudus. Sensorite *NLRP1* ja *NLRP3* ekspressioonis ei ilmnenud miR-146a transfekteeritud ja rinoviirusega nakatatud HBEC rakkudes olulist erinevust. Võib arvata, et miR-146a osaleb inflammasoomi aktivatsiooni regulatsioonis, kuid miR-146a mõju avaldub kaudselt. MiR-146a teadaolevad sihtmärkgeenid on NF- κ B signaalirajalt (Javidan *et al.*, 2019) ning tõenäoliselt mõjutab miR-146a inflammasoomi geenide ekspressiooni NF- κ B rada inhibeerides. Varem on astma patsientidel leitud hingamisteede epiteelirakkudes madalam miR-146a ekspressioon kui kontrollidel ning madalam neutrofiilide migratsiooniks vajalike faktorite sekretsioon miR-146a transfekteeritud HBEC rakkudes (Kivihall *et al.*, 2019). Samuti täheldasid Laanesoo *et al.* miR-146a/b^{-/-} hiirtel rinoviiruse infektsiooni korral tugevamat hingamisteede neutrofiiliat (Laanesoo *et al.*, 2021). Seetõttu on võimalik, et miR-146a on oluline inflammasoomi aktivatsiooni regulatsioonis eelkõige neutrofiilse astma fenotüübi korral.

On teada, et RV infektsiooniga kaasneb nakatunud rakkude surm, mille käivitamiseks võib olla vajalik inflammasoomi aktivatsioon. Samuti on näidatud, et miR-146a võib piirata rinoviiruse levikut HBEC-ides (Laanesoo *et al.*, 2021; Z. Li *et al.*, 2022; Lötzerich *et al.*, 2018). Seetõttu uuriti magistritöös ka miR-146a mõju rinoviirusega nakatatud bronhiepiteeli rakkude elulemusele. Selgus, et miR-146a transfektsiooni ja RV-A16 nakkuse korral on rohkem elusrakke kui kontrolltransfektsiooni puhul. Samas ei olnud miR-146a mõju HBEC rakkude apoptoosile ja nekroosile eraldi vaadeldes statistiliselt oluliselt vähenenud, kuigi rinoviiruse A16 või A1b nakkuse korral oli apoptootilisi rakke märkimisväärselt rohkem kui kontrollis. Nendest tulemustest lähtuvalt võib arvata, et rinoviirusnakkuse korral miR-146a on võimeline pärssima bronhiepiteeli rakkude surma, kuid apoptoosi oluliselt ei mõjuta. Rinoviirusinfektsiooni poolt

indutseeritud rakusurm võib olla seotud inflammasoomi aktivatsiooniga kaasneva gasdermin-D vahendatud püroptoosiga, kuid selle kinnitamiseks oleks vajalik analüüsida gasdermin-D ekspressiooni bronhiepiteeli rakkudes RV infektsiooni korral. Näiteks, Wen *et al.* leidsid, et Seneca Valley viiruse (SVV) infektsiooni korral toimus sea neerurakkudes gasdermin-D lõikamine (W. Wen *et al.*, 2021) ning Yogarajah *et al.* näitasid, kuidas enteroviirus kutsus esile püroptoosi inimese neuroblastoomi rakkudes (Yogarajah *et al.*, 2017), mis viitab, et *Picornaviridae* sugukonna viirused on võimelised püroptoosi indutseerima.

Kokkuvõttes näitavad magistritöös saadud tulemused, et NLRP1 ja NLRP3 inflammasoomi geenide ekspressioon on astma patsientide bronhiharjaproovides võrreldes kontrollidega muutunud, mis viitab inflammasoomide osalusele hingamisteede põletiku regulatsioonis. Lisaks leiti, et rinoviirusinfektsioon põhjustab inimese primaarsetes bronhiepiteeli rakkudes IL-1 β ja IL-18 sekretsiooni ning selleks on vajalik *NLRP1* ekspressioon, mis viitab, et RV poolt indutseeritakse eelkõige NLRP1 tüüpi inflammasoom. MiR-146a transfekterimine HBEC rakkudesse RV nakkuse korral mõjutas inflammasoomi geenide ekspressiooni osadel juhtudel ning vähendas *IL-1 β* ekspressiooni vaid mRNA tasemel, mistõttu võib arvata, et miR-146a mõjutab RV poolt indutseeritud inflammasoomi geenide ekspressiooni, kuid otsest toimet nende geenide aktivatsioonile miR-146a ei oma. Lisaks magistritöös analüüsitud inflammasoomi geenide mRNA tasemetele oleks vajalik kindlaks teha valkude ekspressiooni tase ja lokalisatsioon rakus, milleks sobivad immunofluorestsents ja *western blot* analüüsid. Samuti tuleks analüüsida CASP1 aktivatsiooni näiteks FAM-FLICA süsteemi abil astma patsientide bronhilimaskesta biopsiates ja RV-ga nakatatud rakkudes. Kirjanduses leidub rohkem viiteid NLRP3 kaudu aktiveeritud inflammasoomist (Z. Li *et al.*, 2022), kuid selle magistritöö tulemused viiravad, et NLRP1 inflammasoomil on tõenäoliselt suurem roll RV infektsiooni korral inimese bronhiepiteelis. Selle tõestuseks oleks vaja teha edasisi uuringuid, uurides näiteks NLRP3 inhibeerimise mõju inflammasoomi formeerumisele RV-A16 või A1b infektsiooni korral, näiteks kasutades selektiivset NLRP3 inhibiitorit MCC950 (Jiao *et al.*, 2020). Lisaks, magistritöö tulemused põhinevad suures osas katsetel, mis viidi läbi inimese bronhiepiteeli rakkude ühekihilises kultuuris, kuid inflammasoomi geenide ekspressiooni võiks uurida ka 3D rakukultuuris või hiiremudelil, et näha, kuidas mõjutab geenide avaldumist diferentseerunud rakutüüpide esinemine 3D rakukultuuris või hiiremudeli puhul immuunrakkude olemasolu hingamisteedes.

KOKKUVÕTE

Astma on krooniline põletikuline hingamisteede haigus, mis sageli ägeneb rinoviirusinfektsiooni korral. Inflammasoomid on suured valgukompleksid, mis omavad olulist rolli patogeenide vastases kaasasündinud immuunvastuses. MiR-146a on lühike mittekodeeriv RNA, mis reguleerib posttranskriptsioonilisel tasemel erinevaid bioloogilisi protsesse, sealhulgas põletiku väljakujunemist. Selles magistritöös uuriti astma ägenemise, RV nakkuse, inflammasoomi aktivatsiooni ja miR-146a omavahelisi seoseid inimese bronhiepiteeli rakkudes.

Magistritöö raames läbiviidud eksperimentide tulemusena selgus, et NLRP1 ja NLRP3 inflammasoomi geenide ekspressioon on astma patsientide bronhiharjaproovides võrreldes kontrollidega muutunud, mis viitab, et astma patsientidel võivad inflammasoomid olla aktiveeritud, kusjuures inflammasoomi geenide ekspressioon võib olla eri astma fenotüüpides erinev. Järgnevalt uuriti rinoviirusinfektsiooni mõju inflammasoomi geenide avaldumisele. Leiti, et RV põhjustas inimese primaarsetes bronhiepiteeli rakkudes IL-1 β ja IL-18 sekretsiooni, mis vähenes märkimisväärselt NLRP1 vaigistamisel siNLRP1-ga, mis viitab, et IL-1 β , IL-18 sekretsioon on NLRP1 sõltuv ja RV indutseerib eelkõige NLRP1 tüüpi inflammasoomi. MiR-146a transfekterimine HBEC rakkudesse RV nakkuse korral avaldas mõju vaid inflammasoomi geenide CASP1 ja PYCARD ekspressioonile ning vähendas IL-1 β ekspressiooni ainult mRNA tasemel, mistõttu võib arvata, et miR-146a mõjutab RV poolt indutseeritud geeniekspressiooni inimese bronhiepiteeli rakkudes, kuid miR-146a ei oma otsest mõju inflammasoomi aktivatsioonile.

Kokkuvõttes selgus magistritöös, et bronhiharjaproovides on inflammasoomi geenide ja IL-1 β , IL-18 ekspressioon astma korral muutunud, rinoviirusinfektsioon aktiveerib inimese primaarsetes bronhiepiteeli rakkudes NLRP1 inflammasoomi ning miR-146a mõjutab inflammasoomi geenide avaldumist RV infektsiooni korral kaudselt.

The activation of NLRP1 and NLRP3 inflammasome in human bronchial epithelial cells and the role of miR-146a in their regulation during rhinovirus infection

Marjel Mäe

SUMMARY

Asthma is a chronic inflammatory disease of the airways that affects hundreds of millions of people around the world by causing breathing difficulties (Veerati *et al.*, 2020). Rhinoviruses (RV) often cause common cold, but in asthma patients, RV infection can lead to asthma exacerbations (Jakiela *et al.*, 2021; Wirz *et al.*, 2022). Previous studies have shown that viruses can activate inflammasomes (Han *et al.*, 2021), which are large protein complexes of the innate immunity that have an important role in the defence against pathogens. Inflammasome activation leads to the expression of pro-inflammatory cytokines interleukin(IL)-1 β and IL-18 that regulate inflammation (Z. Li *et al.*, 2022; Robinson *et al.*, 2020). MicroRNA-146a (miR-146a) is a short non-coding RNA that is capable of regulating different biological processes, like inflammation, on a posttranscriptional level (L. Zhang *et al.*, 2020; Yan *et al.*, 2021). Asthma patients have been shown to have differential miR-146a expression and increased miR-146 expression has also been described during RV infection (Laanesoo *et al.*, 2021; Rodrigo-Munoz *et al.*, 2019), however the connection between asthma exacerbation, RV infection, inflammasome activation and miR-146a is unclear. Therefore, the aim of this Master's thesis was to determine the expression of NLRP1 and NLRP3 inflammasome genes and the associated IL-1 β , IL-18 cytokines in the bronchial brushings of asthma patients and in rhinovirus infected human bronchial epithelial cells and to analyse the role of miR-146a in their regulation during rhinovirus infection.

First, we analysed the expression of inflammasome genes in the bronchial brushings of asthma patients and controls. As result, we found differential expression of NLRP1 and NLRP3 inflammasome genes in asthma patients when compared to controls, which indicates that potentially, inflammasomes are activated in asthma patients. When asthma patients were divided into three phenotypes based on the immune cells found in their airways, we found that inflammasome gene expression differed between different phenotypes. More specifically, *PYCARD*, *NLRP1*, *NLRP3* and *IL-1 β* were upregulated in bronchial brushings from neutrophilic asthma patients, *NLRP3* was upregulated in eosinophilic asthma patients and no inflammasome genes were upregulated in paucigranulocytic asthma patients compared to controls.

Next, we showed that RV infection causes IL-1 β and IL-18 secretion from HBEC cells, which was significantly decreased after silencing NLRP1 using siNLRP1. Therefore, IL-1 β and IL-18 secretion is NLRP1 dependent in HBECs and it also suggests that RV induces primarily NLRP1 inflammasome activation in HBEC cells. In addition, we showed that the transfection of miR-146a into HBEC cells during RV infection decreased *CASP1*, *PYCARD* and *IL-1 β* mRNA expression, but there was no significant difference in *NLRP1*, *NLRP3* expression. This could mean that miR-146a is capable of affecting RV induced gene expression in HBECs, but the effect on inflammasome activation is indirect. There were also more alive cells during miR-146a transfection and RV infection compared to control transfection, which shows that miR-146a can potentially inhibit bronchial epithelial cell death during RV infection.

Taken together, we have shown in this Master's thesis that in bronchial brushings the expression of inflammasome genes differed between asthma patients and controls. Furthermore, the differential gene expression was asthma phenotype specific. RV infection resulted in the activation of the NLRP1 inflammasome in HBEC cells and miR-146a altered gene expression in HBECs during RV infection, however miR-146a did not directly regulate the activation of inflammasomes.

TÄNUSÕNAD

Soovin tänada oma juhendajaid Anet Laanesoo ja Ana Rebane, kes aitasid eksperimentide läbiviimisel ja tulemuste analüüsimisel ning andsid magistritöö kirjutamisel tagasisidet. Samuti soovin tänada meie koostööpartnereid dr Bogdan Jakiela ja dr Sebastian L. Johnston, kes kinkisid magistritöös kasutatud primaarsed bronhiepiteeli rakud, astma patsientide bronhiharjaproovid ja rinoviirused. Lisaks tänan RNA bioloogia töögrupi liikmeid, kes mind toetasid.

KIRJANDUSE LOETELU

- Abdo, M., Uddin, M., Goldmann, T., Marwitz, S., Bahmer, T., Holz, O., . . . group, A. s. (2021). Raised sputum extracellular DNA confers lung function impairment and poor symptom control in an exacerbation-susceptible phenotype of neutrophilic asthma. *Respir Res*, 22(1): 167.
- Al-Ahmad, M. and Webb, D. (2022). A prospective study of switching asthma patients from a Fixed-Dose Combination (FDC) Inhaled Corticosteroid [ICS]/Long-Acting Beta Agonist [LABA] therapy delivered by Dry Powder Inhaler (DPI) to ICS/LABA delivered by pressurised Metered Dose Inhaler (pMDI). *Respir Med*, 194: 106771.
- Alshrari, A. S., Hudu, S. A., Asdaq, S. M. B., Ali, A. M., Kin, C. V., Omar, A. R., . . . Sekawi, Z. (2021). Bioinformatics analysis of rhinovirus capsid proteins VP1-4 sequences for cross-serotype vaccine development. *J Infect Public Health*, 14(11): 1603-1611.
- Badi, Y. E., Pavel, A. B., Pavlidis, S., Riley, J. H., Bates, S., Kermani, N. Z., . . . Group, U. B. S. (2022). Mapping atopic dermatitis and anti-IL-22 response signatures to type 2-low severe neutrophilic asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 149(1): 89-101.
- Baron, A. J., Flokstra-de Blok, B. M. J., Kerstjens, H. A. M., Koopmans-Klein, G., Price, D. B., Sellink, A. A., . . . Kocks, J. W. H. (2021). High Use of SABAs is Associated with Higher Exacerbation Rate in Dutch Patients with Asthma. *J Asthma Allergy*, 14: 851-861.
- Barreda-Manso, M. A., Nieto-Diaz, M., Soto, A., Munoz-Galdeano, T., Reigada, D. and Maza, R. M. (2021). In Silico and In Vitro Analyses Validate Human MicroRNAs Targeting the SARS-CoV-2 3'-UTR. *Int J Mol Sci*, 22(11).
- Bateman, E. D., O'Byrne, P. M., Busse, W. W., Lotvall, J., Bleecker, E. R., Andersen, L., . . . Woodcock, A. (2014). Once-daily fluticasone furoate (FF)/vilanterol reduces risk of severe exacerbations in asthma versus FF alone. *Thorax*, 69(4): 312-319.
- Bauernfried, S., Scherr, M. J., Pichlmair, A., Duderstadt, K. E. and Hornung, V. (2021). Human NLRP1 is a sensor for double-stranded RNA. *Science*, 371(6528).
- Beasley, R. W., Donohue, J. F., Mehta, R., Nelson, H. S., Clay, M., Moton, A., . . . Hederer, B. M. (2015). Effect of once-daily indacaterol maleate/mometasone furoate on exacerbation risk in

adolescent and adult asthma: a double-blind randomised controlled trial. *BMJ Open*, 5(2): e006131.

Blaas, D. (2020). Individual subunits of a rhinovirus causing common cold exhibit largely different protein-RNA contact site conformations. *Commun Biol*, 3(1): 537.

Bochkov, Y. A., Watters, K., Ashraf, S., Griggs, T. F., Devries, M. K., Jackson, D. J., . . . Gern, J. E. (2015). Cadherin-related family member 3, a childhood asthma susceptibility gene product, mediates rhinovirus C binding and replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(17): 5485-5490.

Bullone, M., Carriero, V., Bertolini, F., Folino, A., Mannelli, A., Di Stefano, A., . . . Ricciardolo, F. L. M. (2019). Elevated serum IgE, oral corticosteroid dependence and IL-17/22 expression in highly neutrophilic asthma. *Eur Respir J*, 54(5).

Burkes, R. M. and Panos, R. J. (2020). Ultra Long-Acting beta-Agonists in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *J Exp Pharmacol*, 12: 589-602.

Caulfield, J. I., Ching, A. M., Cover, E. M., August, A., Craig, T., Kamens, H. M. and Cavigelli, S. A. (2021). Inhaled corticosteroids as treatment for adolescent asthma: effects on adult anxiety-related outcomes in a murine model. *Psychopharmacology (Berl)*, 238(1): 165-179.

Chen, G., Chen, D., Feng, Y., Wu, W., Gao, J., Chang, C., . . . Zhen, G. (2022). Identification of Key Signaling Pathways and Genes in Eosinophilic Asthma and Neutrophilic Asthma by Weighted Gene Co-Expression Network Analysis. *Front Mol Biosci*, 9: 805570.

Chen, Q., Nian, S., Ye, Y., Liu, D., Yu, H., Xiong, H., . . . Yuan, Q. (2021). The Emerging Roles of T Helper Cell Subsets and Cytokines in Severe Neutrophilic Asthma. *Inflammation*.

Christgen, S., Place, D. E. and Kanneganti, T. D. (2020). Toward targeting inflammasomes: insights into their regulation and activation. *Cell Res*, 30(4): 315-327.

Collin, A. M., Lecocq, M., Detry, B., Carlier, F. M., Bouzin, C., de Sany, P., . . . Gohy, S. (2021). Loss of ciliated cells and altered airway epithelial integrity in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*, 20(6): e129-e139.

Dalmadi, A., Miloro, F., Balint, J., Varallyay, E. and Havelda, Z. (2021). Controlled RISC loading efficiency of miR168 defined by miRNA duplex structure adjusts ARGONAUTE1 homeostasis. *Nucleic Acids Res*, 49(22): 12912-12928.

- Esneau, C., Duff, A. C. and Bartlett, N. W. (2022). Understanding Rhinovirus Circulation and Impact on Illness. *Viruses*, 14(1).
- Esteves, P., Allard, B., Celle, A., Dupin, I., Maurat, E., Ousova, O., . . . Berger, P. (2022). Asthmatic bronchial smooth muscle increases rhinovirus replication within the bronchial epithelium. *Cell Rep*, 38(13): 110571.
- Everman, J. L., Sajuthi, S., Saef, B., Rios, C., Stoner, A. M., Numata, M., . . . Seibold, M. A. (2019). Functional genomics of CDHR3 confirms its role in HRV-C infection and childhood asthma exacerbations. *J Allergy Clin Immunol*, 144(4): 962-971.
- Gohy, S., Carlier, F. M., Fregimilicka, C., Detry, B., Lecocq, M., Ladjemi, M. Z., . . . Pilette, C. (2019). Altered generation of ciliated cells in chronic obstructive pulmonary disease. *Sci Rep*, 9(1): 17963.
- Gomez-Perosanz, M., Fiyouzi, T., Fernandez-Arquero, M., Sidney, J., Sette, A., Reinherz, E. L., . . . Reche, P. A. (2021). Characterization of Conserved and Promiscuous Human Rhinovirus CD4 T Cell Epitopes. *Cells*, 10(9).
- Han, M., Bentley, J. K., Rajput, C., Lei, J., Ishikawa, T., Jarman, C. R., . . . Hershenson, M. B. (2019). Inflammasome activation is required for human rhinovirus-induced airway inflammation in naive and allergen-sensitized mice. *Mucosal Immunol*, 12(4): 958-968.
- Han, M., Ishikawa, T., Stroupe, C. C., Breckenridge, H. A., Bentley, J. K. and Hershenson, M. B. (2021). Deficient inflammasome activation permits an exaggerated asthma phenotype in rhinovirus C-infected immature mice. *Mucosal Immunol*, 14(6): 1369-1380.
- Harvey, M. W., Slatcher, R. B., Husain, S. A., Imami, L. and Zilioli, S. (2022). Socioeconomic status and medication adherence among youth with asthma: the mediating role of frequency of children's daily routines. *Psychol Health*, 37(4): 507-522.
- Hasegawa, K., Mansbach, J. M., Bochkov, Y. A., Gern, J. E., Piedra, P. A., Bauer, C. S., . . . Camargo, C. A., Jr. (2019). Association of Rhinovirus C Bronchiolitis and Immunoglobulin E Sensitization During Infancy With Development of Recurrent Wheeze. *JAMA Pediatr*, 173(6): 544-552.

Hermann, H., Runnel, T., Aab, A., Baurecht, H., Rodriguez, E., Magilnick, N., . . . Rebane, A. (2017). miR-146b Probably Assists miRNA-146a in the Suppression of Keratinocyte Proliferation and Inflammatory Responses in Psoriasis. *J Invest Dermatol*, 137(9): 1945-1954.

Immormino, R. M., Jania, C. M., Tilley, S. L. and Moran, T. P. (2022). Neuropilin-2 regulates airway inflammation in a neutrophilic asthma model. *Immun Inflamm Dis*, 10(3): e575.

Jakiela, B., Rebane, A., Soja, J., Bazan-Socha, S., Laanesoo, A., Plutecka, H., . . . Bochenek, G. (2021). Remodeling of bronchial epithelium caused by asthmatic inflammation affects its response to rhinovirus infection. *Sci Rep*, 11(1): 12821.

Javidan, A., Jiang, W., Okuyama, M., Thiagarajan, D., Yang, L., Moorleghen, J. J., . . . Subramanian, V. (2019). miR-146a Deficiency Accelerates Hepatic Inflammation Without Influencing Diet-induced Obesity in Mice. *Sci Rep*, 9(1): 12626.

Jiao, J., Zhao, G., Wang, Y., Ren, P. and Wu, M. (2020). MCC950, a Selective Inhibitor of NLRP3 Inflammasome, Reduces the Inflammatory Response and Improves Neurological Outcomes in Mice Model of Spinal Cord Injury. *Front Mol Biosci*, 7: 37.

Jing, Y., Gimenes, J. A., Mishra, R., Pham, D., Comstock, A. T., Yu, D. and Sajjan, U. (2019). NOTCH3 contributes to rhinovirus-induced goblet cell hyperplasia in COPD airway epithelial cells. *Thorax*, 74(1): 18-32.

Jonsdottir, H. R., Arason, A. J., Palsson, R., Franzdottir, S. R., Gudbjartsson, T., Isaksson, H. J., . . . Magnusson, M. K. (2015). Basal cells of the human airways acquire mesenchymal traits in idiopathic pulmonary fibrosis and in culture. *Lab Invest*, 95(12): 1418-1428.

Karaba, A. H., Figueroa, A., Massaccesi, G., Botto, S., DeFilippis, V. R. and Cox, A. L. (2020). Herpes simplex virus type 1 inflammasome activation in proinflammatory human macrophages is dependent on NLRP3, ASC, and caspase-1. *PLoS One*, 15(2): e0229570.

Kaur, D., Chachi, L., Gomez, E., Sylvius, N. and Brightling, C. E. (2021). Interleukin-18, IL-18 binding protein and IL-18 receptor expression in asthma: a hypothesis showing IL-18 promotes epithelial cell differentiation. *Clin Transl Immunology*, 10(6): e1301.

Kim, S. R., Kim, D. I., Kim, S. H., Lee, H., Lee, K. S., Cho, S. H. and Lee, Y. C. (2014). NLRP3 inflammasome activation by mitochondrial ROS in bronchial epithelial cells is required for allergic inflammation. *Cell Death Dis*, 5: e1498.

- Kim, Y. K., Kim, B. and Kim, V. N. (2016). Re-evaluation of the roles of DROSHA, Exportin 5, and DICER in microRNA biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113(13): E1881-1889.
- Kivihall, A., Aab, A., Soja, J., Sladek, K., Sanak, M., Altraja, A., . . . Rebane, A. (2019). Reduced expression of miR-146a in human bronchial epithelial cells alters neutrophil migration. *Clin Transl Allergy*, 9: 62.
- Laanesoo, A., Urgard, E., Periyasamy, K., Laan, M., Bochkov, Y. A., Aab, A., . . . Rebane, A. (2021). Dual role of the miR-146 family in rhinovirus-induced airway inflammation and allergic asthma exacerbation. *Clin Transl Med*, 11(6): e427.
- Lachowicz-Scroggins, M. E., Dunican, E. M., Charbit, A. R., Raymond, W., Looney, M. R., Peters, M. C., . . . Fahy, J. V. (2019). Extracellular DNA, Neutrophil Extracellular Traps, and Inflammasome Activation in Severe Asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 199(9): 1076-1085.
- Lee, S. Y., Park, H. Y., Kim, E. K., Lim, S. Y., Rhee, C. K., Hwang, Y. I., . . . Park, Y. B. (2016). Combination therapy of inhaled steroids and long-acting beta2-agonists in asthma-COPD overlap syndrome. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 11: 2797-2803.
- Li, H. C., Zhang, J. M., Xu, R., Wang, Y. H., Xu, W., Chen, R., . . . Cen, X. B. (2022). mTOR regulates cocaine-induced behavioural sensitization through the SynDIG1-GluA2 interaction in the nucleus accumbens. *Acta Pharmacol Sin*, 43(2): 295-306.
- Li, M., Zhu, W., Wang, C., Zheng, Y., Sun, S., Fang, Y. and Luo, Z. (2021). Weighted gene co-expression network analysis to identify key modules and hub genes associated with paucigranulocytic asthma. *BMC Pulm Med*, 21(1): 343.
- Li, Z., Hu, J., Bao, C., Gao, C., Zhang, N., Cardona, C. J. and Xing, Z. (2022). Activation of the NLRP3 inflammasome and elevation of interleukin-1beta secretion in infection by severe fever with thrombocytopenia syndrome virus. *Sci Rep*, 12(1): 2573.
- Liu, T., Zhou, Y. T., Wang, L. Q., Li, L. Y., Bao, Q., Tian, S., . . . Li, C. W. (2019). NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3 (NLRP3) contributes to inflammation, pyroptosis, and mucin production in human airway epithelium on rhinovirus infection. *J Allergy Clin Immunol*, 144(3): 777-787.e779.

- Luca, E., Turcekova, K., Hartung, A., Mathes, S., Rehrauer, H. and Krutzfeldt, J. (2020). Genetic deletion of microRNA biogenesis in muscle cells reveals a hierarchical non-clustered network that controls focal adhesion signaling during muscle regeneration. *Mol Metab*, 36: 100967.
- Lötzerich, M., Roulin, P. S., Boucke, K., Witte, R., Georgiev, O. and Greber, U. F. (2018). Rhinovirus 3C protease suppresses apoptosis and triggers caspase-independent cell death. *Cell Death Dis*, 9(3): 272.
- Ma, M., Li, G., Qi, M., Jiang, W. and Zhou, R. (2021). Inhibition of the Inflammasome Activity of NLRP3 Attenuates HDM-Induced Allergic Asthma. *Front Immunol*, 12: 718779.
- Mills, J. T., Schwenger, A., Marsh, E. K., Edwards, M. R., Sabroe, I., Midwood, K. S. and Parker, L. C. (2019). Airway Epithelial Cells Generate Pro-inflammatory Tenascin-C and Small Extracellular Vesicles in Response to TLR3 Stimuli and Rhinovirus Infection. *Front Immunol*, 10: 1987.
- Mortazavi-Jahromi, S. S., Ahmadzadeh, A., Rezaieyazdi, Z., Aslani, M., Omidian, S. and Mirshafiey, A. (2020). The role of beta-d-mannuronic acid, as a new non-steroidal anti-inflammatory drug on expression of miR-146a, IRAK1, TRAF6, NF-kappaB and pro-inflammatory cytokines following a clinical trial in rheumatoid arthritis patients. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 42(3): 228-236.
- Nelson, H. S., Weiss, S. T., Bleecker, E. R., Yancey, S. W., Dorinsky, P. M. and Group, S. S. (2006). The Salmeterol Multicenter Asthma Research Trial: a comparison of usual pharmacotherapy for asthma or usual pharmacotherapy plus salmeterol. *Chest*, 129(1): 15-26.
- Ntontsi, P., Loukides, S., Bakakos, P., Kostikas, K., Papatheodorou, G., Papathanassiou, E., . . . Papaioannou, A. I. (2017). Clinical, functional and inflammatory characteristics in patients with paucigranulocytic stable asthma: Comparison with different sputum phenotypes. *Allergy*, 72(11): 1761-1767.
- Nwaru, B. I., Ekström, M., Hasvold, P., Wiklund, F., Telg, G. and Janson, C. (2020). Overuse of short-acting β . *Eur Respir J*, 55(4).
- Pandey, K. P. and Zhou, Y. (2022). Influenza A Virus Infection Activates NLRP3 Inflammasome through Trans-Golgi Network Dispersion. *Viruses*, 14(1).

- Panganiban, R. P., Lambert, K. A., Hsu, M. H., Laryea, Z. and Ishmael, F. T. (2019). Isolation and profiling of plasma microRNAs: Biomarkers for asthma and allergic rhinitis. *Methods*, 152: 48-54.
- Paterson, M. R. and Kriegel, A. J. (2017). MiR-146a/b: a family with shared seeds and different roots. *Physiol Genomics*, 49(4): 243-252.
- Peters, S. P., Bleecker, E. R., Canonica, G. W., Park, Y. B., Ramirez, R., Hollis, S., . . . Martin, U. J. (2016). Serious Asthma Events with Budesonide plus Formoterol vs. Budesonide Alone. *N Engl J Med*, 375(9): 850-860.
- Price, D. B., Roman-Rodriguez, M., McQueen, R. B., Bosnic-Anticevich, S., Carter, V., Gruffydd-Jones, K., . . . Chrystyn, H. (2017). Inhaler Errors in the CRITIKAL Study: Type, Frequency, and Association with Asthma Outcomes. *J Allergy Clin Immunol Pract*, 5(4): 1071-1081 e1079.
- Rayner, R. E., Makena, P., Prasad, G. L. and Cornet-Boyaka, E. (2019). Optimization of Normal Human Bronchial Epithelial (NHBE) Cell 3D Cultures for in vitro Lung Model Studies. *Sci Rep*, 9(1): 500.
- Rial, M. J., Canas, J. A., Rodrigo-Munoz, J. M., Valverde-Monge, M., Sastre, B., Sastre, J. and Del Pozo, V. (2021). Changes in Serum MicroRNAs after Anti-IL-5 Biological Treatment of Severe Asthma. *Int J Mol Sci*, 22(7).
- Robinson, K. S., Teo, D. E. T., Tan, K. S., Toh, G. A., Ong, H. H., Lim, C. K., . . . Reversade, B. (2020). Enteroviral 3C protease activates the human NLRP1 inflammasome in airway epithelia. *Science*, 370(6521).
- Rodrigo-Munoz, J. M., Canas, J. A., Sastre, B., Rego, N., Greif, G., Rial, M., . . . Del Pozo, V. (2019). Asthma diagnosis using integrated analysis of eosinophil microRNAs. *Allergy*, 74(3): 507-517.
- Rossios, C., Pavlidis, S., Hoda, U., Kuo, C. H., Wiegman, C., Russell, K., . . . Team, U. B. f. t. P. o. R. D. O. U.-B. C. P. (2018). Sputum transcriptomics reveal upregulation of IL-1 receptor family members in patients with severe asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 141(2): 560-570.

Sand, J., Fenini, G., Grossi, S., Hennig, P., Di Filippo, M., Levesque, M., . . . Beer, H. D. (2019). The NLRP1 Inflammasome Pathway Is Silenced in Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *J Invest Dermatol*, 139(8): 1788-1797 e1786.

Sears, M. R. and Radner, F. (2014). Safety of formoterol in asthma clinical trials: an update. *Eur Respir J*, 43(1): 103-114.

Shastri, M. D., Chong, W. C., Dua, K., Peterson, G. M., Patel, R. P., Mahmood, M. Q., . . . Hansbro, P. M. (2021). Emerging concepts and directed therapeutics for the management of asthma: regulating the regulators. *Inflammopharmacology*, 29(1): 15-33.

Simpson, J. L., Phipps, S., Baines, K. J., Oreo, K. M., Gunawardhana, L. and Gibson, P. G. (2014). Elevated expression of the NLRP3 inflammasome in neutrophilic asthma. *Eur Respir J*, 43(4): 1067-1076.

Song, J. and Wang, J. (2022). SIRT3 regulates bronchial epithelium apoptosis and aggravates airway inflammation in asthma. *Mol Med Rep*, 25(4).

Stempel, D. A., Szeffler, S. J., Pedersen, S., Zeiger, R. S., Yeakey, A. M., Lee, L. A., . . . Investigators, V. (2016). Safety of Adding Salmeterol to Fluticasone Propionate in Children with Asthma. *N Engl J Med*, 375(9): 840-849.

Stokes, C. A., Kaur, R., Edwards, M. R., Mondhe, M., Robinson, D., Prestwich, E. C., . . . Parker, L. C. (2016). Human rhinovirus-induced inflammatory responses are inhibited by phosphatidylserine containing liposomes. *Mucosal Immunol*, 9(5): 1303-1316.

Sullivan, P. W., Ghushchyan, V. H., Skoner, D. P., LeCocq, J., Park, S. and Zeiger, R. S. (2021). Complications and Health Care Resource Utilization Associated with Systemic Corticosteroids in Children and Adolescents with Persistent Asthma. *J Allergy Clin Immunol Pract*, 9(4): 1541-1551 e1549.

Suzuki, Y., Hayashi, T., Yokoyama, R., Nakagawa, F., Inoue, J., Higashi, T., . . . Motoyama, K. (2021). Fasting impairs type 2 helper T cell infiltration in the lung of an eosinophilic asthma mouse model. *FEBS Open Bio*, 11(9): 2619-2630.

Zhang, L., Dong, L., Tang, Y., Li, M. and Zhang, M. (2020). MiR-146b protects against the inflammation injury in pediatric pneumonia through MyD88/NF-kappaB signaling pathway. *Infect Dis (Lond)*, 52(1): 23-32.

Zhang, X., Yang, F., Liu, F., Tian, Q., Hu, M., Li, P. and Zeng, Y. (2021). Conservation of Differential Animal MicroRNA Processing by Drosha and Dicer. *Front Mol Biosci*, 8: 730006.

Taganov, K. D., Boldin, M. P., Chang, K. J. and Baltimore, D. (2006). NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(33): 12481-12486.

Wang, J., Zhang, Y., Li, B., Zhao, Z., Huang, C., Zhang, X., . . . Norbäck, D. (2021). Asthma and allergic rhinitis among young parents in China in relation to outdoor air pollution, climate and home environment. *Sci Total Environ*, 751: 141734.

Veerati, P. C., Troy, N. M., Reid, A. T., Li, N. F., Nichol, K. S., Kaur, P., . . . Bartlett, N. W. (2020). Airway Epithelial Cell Immunity Is Delayed During Rhinovirus Infection in Asthma and COPD. *Front Immunol*, 11: 974.

Wen, W., Li, X., Wang, H., Zhao, Q., Yin, M., Liu, W., . . . Qian, P. (2021). Seneca Valley Virus 3C Protease Induces Pyroptosis by Directly Cleaving Porcine Gasdermin D. *J Immunol*, 207(1): 189-199.

Wen, X., Nian, S., Wei, G., Kang, P., Yang, Y., Li, L., . . . Yuan, Q. (2022). Changes in the phenotype and function of mucosal-associated invariant T cells in neutrophilic asthma. *Int Immunopharmacol*, 106: 108606.

Wirz, O. F., Jansen, K., Satitsuksanoa, P., van de Veen, W., Tan, G., Sokolowska, M., . . . Akdis, M. (2022). Experimental rhinovirus infection induces an antiviral response in circulating B cells which is dysregulated in patients with asthma. *Allergy*, 77(1): 130-142.

Wu, W., Gao, J., Chen, D., Chen, G., Feng, Y., Chang, C., . . . Zhen, G. (2022). Epithelial microRNA-30a-3p targets RUNX2/HMGB1 axis to suppress airway eosinophilic inflammation in asthma. *Respir Res*, 23(1): 17.

Xander, N., Reddy Vari, H., Eskandar, R., Li, W., Bolla, S., Marchetti, N. and Sajjan, U. S. (2019). Rhinovirus-Induced SIRT-1 via TLR2 Regulates Subsequent Type I and Type III IFN Responses in Airway Epithelial Cells. *J Immunol*, 203(9): 2508-2519.

Xiang, M., Birkbak, N. J., Vafaizadeh, V., Walker, S. R., Yeh, J. E., Liu, S., . . . Frank, D. A. (2014). STAT3 induction of miR-146b forms a feedback loop to inhibit the NF-kappaB to IL-6 signaling axis and STAT3-driven cancer phenotypes. *Sci Signal*, 7(310): ra11.

Yan, F., Wufuer, D., Ding, J. and Wang, J. (2021). MicroRNA miR-146a-5p inhibits the inflammatory response and injury of airway epithelial cells via targeting TNF receptor-associated factor 6. *Bioengineered*, 12(1): 1916-1926.

Yang, L., Zheng, Y., Miao, Y. M., Yan, W. X., Geng, Y. Z., Dai, Y. and Wei, Z. F. (2022). Bergenin, a PPARgamma agonist, inhibits Th17 differentiation and subsequent neutrophilic asthma by preventing GLS1-dependent glutaminolysis. *Acta Pharmacol Sin*, 43(4): 963-976.

Yogarajah, T., Ong, K. C., Perera, D. and Wong, K. T. (2017). AIM2 Inflammasome-Mediated Pyroptosis in Enterovirus A71-Infected Neuronal Cells Restricts Viral Replication. *Sci Rep*, 7(1): 5845.

LIHTLITSENTS

Mina, Mariel Mäe,

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

“NLRP1 ja NLRP3 inflammasoomi aktivatsioon inimese bronhiepiteeli rakkudes ning miR-146a roll nende regulatsioonis rinoviiruse nakkuse korral”,

mille juhendajad on Anet Laanesoo ja Ana Rebane,

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, 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.

Mariel Mäe

30.05.2022