

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

MEDITSIINITEADUSTE VALDKOND  
BIO- JA SIIRDEMEDITSIINI INSTITUUT  
RNA BIOLOOGIA UURIMISGRUPP

**RNA modifikatsiooni m<sup>6</sup>A roll inimese keratinotsüütide  
rakulise vastuse reguleerimisel**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Martin Kirpu

Juhendajad: Pavel Kudrin, PhD

Margus Leppik, PhD

TARTU 2024

## **„RNA modifikatsiooni m<sup>6</sup>Am roll inimese keratinotsüütide rakulise vastuse reguleerimisel“**

RNA modifikatsioonid on keemilised funktsionaalsed rühmad, mis esinevad RNA lämmastikalusel, riboosil või fosfaatjäägil. Modifikatsioone leidub näiteks: informatsiooni-RNA-s (mRNA), transport-RNA-s (tRNA), ribosomaalses RNA-s (rRNA) ning paljudel teistel RNA tüüpidel. Üks modifikatsioonidest on mRNA-l esinev N<sup>6</sup>,2'-O-dimetüüladenosiin (m<sup>6</sup>Am), kus metüleeritakse riboosi suhkur teises positsioonis ja lämmastikalus kuuendas positsioonis. Imetajatel katalüüsib m<sup>6</sup>Am modifikatsiooni vaid üks ensüüm: fosforüleeritud C-terminaalse domääniga interakteeruv faktor 1 (PCIF1). Bakalaureusetöö eesmärk on vaigistada (*knockdown* (KD)) PCIF1 normaalsetes inimese epidermaalsetes keratinotsüütides (NHEK), ning teha kindlaks kuidas m<sup>6</sup>Am puudumine mõjutab valitud efekti rakulise vastusega seotud geenide avaldumist. Töö tulemusena leiti, et PCIF1 KD põhjustab Janus kinaaside ja signaali edasikandvate ja transkriptsiooni aktiveerivate valkudega (JAK-STAT) signaaliraja geenide ülesreguleerimist nii mRNA kui ka valgu tasemel ning toodi välja võimalik seos psoriaasiga ja atoopilise dermatiidiga.

Märksõnad: m<sup>6</sup>Am, PCIF1, NHEK, JAK-STAT

CERCS kood: B220 Geneetika, tsütogeneetika

## **„RNA modification m<sup>6</sup>Am role in cellular response regulation in keratinocytes“**

RNA modifications are additional functional groups in nitrogenous bases, ribose sugar, and phosphate group in different types of RNA-s. Some of the RNA-s, where modifications are present are: messenger RNA (mRNA), transport RNA (tRNA), ribosomal RNA (rRNA), and many more RNA types. One of the modifications is N<sup>6</sup>,2'-O-dimethyladenosine (m<sup>6</sup>Am), which is present in mRNA and its nitrogenous base is methylated on sixth position and ribose sugar on second position. In mammals m<sup>6</sup>Am modification is catalyzed by a single enzyme: phosphorylated C-terminal domain interacting factor 1 (PCIF1). The aim of current bachelor's thesis is to knockdown (KD) PCIF1 in normal human epidermal keratinocytes (NHEK) and describe effect on cellular response by assessing the expression of cellular response-associated genes. Results show that in PCIF1 KD cells Janus kinase/signal transducer and activator of transcription (JAK-STAT) pathway genes are upregulated on mRNA and protein levels, which may be implicated in the development of psoriasis and atopic dermatitis.

Keywords: m<sup>6</sup>Am, PCIF1, NHEK, JAK-STAT

CERCS code: B220 Genetics, cytogenetics

# SISUKORD

Kasutatud lühendid.....	5
Sissejuhatus .....	8
1. Kirjanduse ülevaade .....	9
1.1. RNA.....	9
1.2. mRNA struktuur .....	9
1.3. mRNA modifikatsioonid.....	10
1.3.1. Modifikatsioon m <sup>7</sup> G 5' cap-struktuuris .....	10
1.3.2 Adeniini riboosi ja lämmastikaluse modifikatsioonid: m <sup>6</sup> A, Am, m <sup>6</sup> Am.....	11
1.4. Naha immunoloogia.....	13
1.4.1. Rakuline vastus: NF-κB ja JAK-STAT signaalirajad .....	14
1.4.2. Nahahaigused psoriaas ja atoopiline dermatiit (AD) .....	16
2. Eksperimentaalosa.....	17
2.1. Töö eesmärgid.....	17
2.2. Materjal ja meetodika .....	17
2.2.1. Rakukultuur.....	17
2.2.2. PCIF1 siRNA (väike vaigistav RNA) transfektsioon NHEK rakkudesse .....	18
2.2.3. NHEK stimulatsioon tsütokiinidega .....	18
2.2.4. Supernatandi kogumine ELISA jaoks, RNA eraldamine ning RT-qPCR (pöördranskriptsioon-kvantitatiivne PCR).....	18
2.2.5. Kihiline immunoensüümmeetod ( <i>sandwich</i> ELISA).....	20
2.3. Tulemused.....	21
2.3.1. PCIF1 KD puhul tõstetakse m <sup>6</sup> Am-seotud valkude mRNA ekspres-siooni .....	21
2.3.2. PCIF1 KD tulemusena aktiveerub IFN (JAK/STAT) signaalirada.....	21
2.3.3. PCIF1 KD ülesreguleerib IFN-stimuleeritud JAK-STAT signaaliraja ekspressiooni .....	22
2.3.4. PCIF1 KD tõstab IFN-stimuleeritavate JAK-STAT inhibiitorvalkude SOCS ekspressiooni .....	24
2.3.5. PCIF1 KD allareguleerib NF-κB signaalirada IL-4 stimuleerimise puhul .....	25

2.3.6. PCIF1 KD tõstab Th17- ja Treg-rakkude (regulatoorne T-rakk) nahka inkorporeerivat tsütokiini CCL20 ekspressiooni.....	26
2.4. Arutelu .....	27
Kokkuvõte .....	29
Resümee .....	30
Tänuõnad.....	32
Kasutatud kirjandus .....	33
Lisad .....	44
Lihtlitsents .....	45

## Kasutatud lühendid

ALKBH5 – alkB homoloog 5

Am – 2'-O-metüüladenosiin

CBC – *cap*-siduv kompleks

CCL – C-C motiiviga kemokiini ligand

CXCL – C-X-C motiiviga kemokiini ligand

cDNA – komplementaarne RNA-ga DNA

CISH – tsütokiiniga indutseeritav SH<sub>2</sub> sisaldav valk

CMTR1 – *cap* metüültransferaas 1

CTD – karboksüül-terminaalne ots

CTBP2 – C-terminusega ühenduv valk 2

EDTA – etüleendiamiintetraatsetaat

eEF1A – eukarüoodi translatsiooni elongatsiooni faktor 1 alfa

eIF4E – eukarüoodi translatsiooni initsiatsiooni faktor 4E

eIF4G – eukarüoodi translatsiooni initsiatsiooni faktor 4G

ELISA – immunoensüümmeetod

ETS1 – erütroblasti transformatsiooni spetsiifiline transkriptsioonifaktor 1

GAS-element – IFN $\gamma$  poolt stimuleeritav aktivatsiooni sait

FTO – rasvamassiga ja rasvumisega seotud valk

HIV-1 – inimese immuunpuudulikkuse viirus 1

IFITM1 – interferooniga indutseeritud transmembraanne valk 1

IFN $\alpha/\beta/\gamma$  – interferoon alfa/beeta/gamma

IL-17A – interleukiin 17A

ISRE – IFN-tundlik vastuse element

IRF – interferooni regulatoorne faktor

JAK – Janus kinaas

KD – geeni vaigistamine (*knockdown*)

KO – geeni välja lülitamine (*knockout*)

m<sup>6</sup>A – N6-metüüladenosiin

m<sup>6</sup>Am – N6,2'-O-dimetüüladenosiin

m<sup>7</sup>G – N7-metüülguanosiin

METTL3/14 – metüültransferaasisarnane valk 3/14

mRNA – informatsiooni-RNA

NF71 – NickFect 71

NF-κB – tuuma faktor kapp beeta

NHEK – normaalsed inimese epidermaalsed keratinotsüüdid

NK-rakk – loomulik tapjarakk

PAB1P – polü(A) seonduv valk

PAMP – fpatogeeniga seotud molekulaarne muster

PCIF1 – fosforüleeritud CTD interakteeruv faktor 1

PIAS – aktiveeritud STAT-i valguline inhibiitor

Polü(A) – polüadeniin

Polü(I:C) – polü(inosiin:tsütosiin)

qPCR – kvantitatiivne PCR

Rel – retikuloendotelioosi viiruslik onkogeen

RNMT – RNA guaniin-7 metüültransferaas

rRNA – ribosomaalne RNA

RT – pöördtranskriptsioon või pöördtranskriptaas

RT-qPCR – pöördtranskriptsioon-kvantitatiivne PCR

SAM – S-adenosüülmetioniin

SERPINB3/SERPINB4 – serpiini perekond B liige 3/4

siRNA – väike vaigistav RNA

snRNA – väike tuuma RNA

SNP – üksiknukleotiidne polümorfism

SOCS1–7 – tsütokiini signaali supressorvalk 1–7

STAT1–6 – signaali edasikandev ja transkriptsiooni aktiveeriv valk 1–6

Th – abistaja T-rakk

Treg – reguleeriv T-rakk

TNF $\alpha$  – vähi nekroosi faktor alfa

tRNA – transport-RNA

TSS – translatsiooni start-sait

TYK – türosiini kinaas

U – ensüümi ühik

UTR – mittetransleeritav ala

Vpr – viiruse valk R

WTAP – Wilmsi tuumoriga seotud valk 1

YTHDC1–2 – YTH m<sup>6</sup>A RNA-le siduv valk DC1–2

YTHDF1–3 – YTH m<sup>6</sup>A RNA-le siduv valk DF1–3

## Sissejuhatus

Atoopiline dermatiit (AD) ja naastuline psoriaas (edaspidi psoriaas) on ülemaailmselt levinud kroonilised põletikulised nahahaigused, mis langetavad tõsiselt haigete elukvaliteeti (Langan, *et al.*, 2020; Griffiths, *et al.*, 2021). AD-d iseloomustab kuiv ja sügelev nahk, diagnoos selgub sageli lapsepõlves ja püsib täiskasvanueas (Langan, *et al.*, 2020). Psoriaasi iseloomustavad kõrgendatud soomusjad nahalaigud, mis võivad valutada ja kipuvad veritsema (Griffiths, *et al.*, 2021). Mõlema haiguse kulgemisele on iseloomulik immuunsüsteemi düsregulatsioon ja tugev geneetiline eelsoodumus. Psoriaasile on omane põletikku soodustava tsütokiini IL-17A (interleukiin 17A) ületootmine ning AD-le põletikuvastase tsütokiini IL-4 tootmine (Langan, *et al.*, 2020; Griffiths, *et al.*, 2021).

RNA modifikatsioonid on laialdaselt levinud eri tüüpi RNA-des ja need osalevad kõikides RNA-dega seotud protsessides, sealhulgas RNA molekuli stabiliseerimises, splaissimises, translatsiooni efektiivsuse reguleerimises jm (Roundtree, *et al.*, 2017). RNA modifikatsioon  $m^6Am$  paikneb eukarüootidel peamiselt 5' *cap*-struktuuri juures ning on vajalik mRNA translatsiooni tõhustamiseks läbi mRNA molekuli stabiilsuse tõstmise. Modifikatsiooni lisab juba olemasolevale adeniini metüleeritud riboosi suhkruga (Am) valk PCIF1, mis on ainuke valk, mis katalüüsib imetajate mRNA-s  $m^6Am$  modifikatsiooni (Akichika, *et al.*, 2019).

Kuigi AD-d ja psoriaasi uuritakse põhjalikult, pole nende tekkepõhjused ja kulgemise molekulaarmehhanismid lõplikult teada. Antud töö raames uuriti RNA modifikatsiooni  $m^6Am$  olulisust mõlema haiguse kulgemisel, kasutades inimese primaarsete keratinotsüütide mudelit. Meie andmete põhjal selgub, et  $m^6Am$  puudumisel: aktiveerub interferoonide signaalirada, muutub rakuline vastus põletikuvastasele IL-4 stimuleerimisele ja üleekspressseeruvad mitmed psoriaasiga seotud tsütokiinid.

# 1. Kirjanduse ülevaade

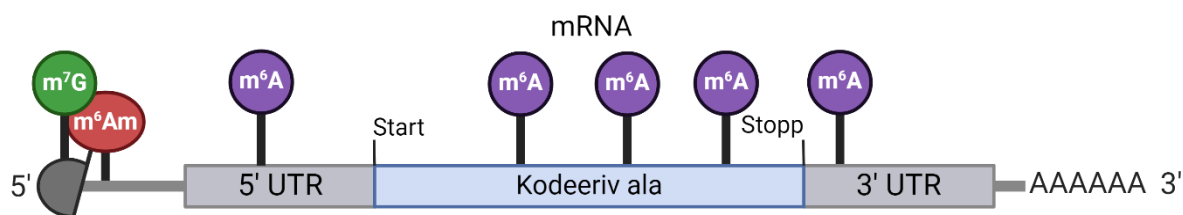
## 1.1. RNA

Kanoonilisi ribonukleotiide: adeniini (A), tsütosiini (C), uratsiili (U) ja guaniini (G) modifitseeritakse tihti nii transkriptsiooni ajal kui ka transkriptsiooni järgselt. RNA ehk ribonukleiinhape modifikatsioonide uurimisvaldkond sai alguse 1960. aastal pseudouridiini ja selle analoogide, sealhulgas 1-metüülpseudouridiini, kirjeldamisega pärmis RNA-lt (Cohn, 1960). Hetkel on teada 334 eri RNA modifikatsiooni (Modomics, (i.a)). Eri tüüpi RNA-tele on olemas ka omapärased modifikatsioonid, mis ei pruugi leida teistes RNA tüüpides ning need modifikatsioonid mõjutavad RNA-keskseid protsesse, näiteks alternatiivset splaiisingut, molekuli stabiilsust ja immunogeensust (Wang, *et al.*, 2015; Shi, *et al.*, 2017; Kariko, *et al.*, 2008). Enim uuritud RNA tüübid on näiteks mRNA (informatsiooni-RNA), mille pealt transleeritakse valk, tRNA (transport-RNA), mille funktsioon on transportida aminohapped valgu sünteesiks ja rRNA (ribosomaalne RNA), mis on vajalik valgusünteesi läbiviiva membraanita organelli ehk ribosoomi moodustamiseks. mRNA-le eripärase modifikatsiooni näide on polü(A) (polüadeniin) saba, mis kaitseb molekuli 3'→5' degradatsiooni eest, kuid seda modifikatsiooni ei leida tRNA-s (Ford, *et al.*, 1997). Kõige enam modifitseeritav RNA tüüp on tRNA, kus ligikaudu igal seitsmendal nukleotiidil esineb modifikatsioon (Zhang, *et al.*, 2022). Modifikatsioonide mustri poolest on rRNA ja tRNA rohkem konserveerunud, kuna need peavad olema pidevalt ekspresseeritud: rRNA on vajalik ribosoomide õigeks kokkupanemiseks ning tRNA translatsiooni läbi viimiseks. mRNA ekspressiooni tase ja modifikatsioonide muster sõltub nii rakutüübist, kindlast valku kodeerivast RNA-st ja välismõjudest (näiteks tsütokiinid ja teised signaalmolekulid). Lisaks sellele võib modifikatsioonide muster olla mõjutatud ka mRNA struktuuri poolt, kus teatud modifikatsioone võidakse katalüüsida kindlasse mRNA piirkonda (Dominissini, *et al.*, 2012).

## 1.2. mRNA struktuur

mRNA 5' otsas asub *cap*-struktuur, mis on vajalik mRNA stabiilsuse tõstmiseks, kaitseks eksonukleaaside poolt vahendatud degradatsiooni eest ja ka translatsiooni algatamiseks läbi eIF4E-5' *cap* seondumise (eukarüoodi translatsiooni initsiatsiooni faktor 4E) (Grifo, *et al.*, 1983). Lisaks sellele on ka kodeeriv ala, kus nukleotiidide tripletid määravad kindla aminohappe, mis lülitub valgu struktuuri (Joonis 1). On olemas ka 5' ja 3' UTR-id (mittetransleeritavad alad), mis asuvad ülesvoolu (5' UTR) või allavoolu (3' UTR) kodeerivast alast, mis on tähtsad translatsiooni reguleerimiseks (Velden ja Thomas, 1999). Näiteks 5' UTR-

ga seonduvad mitmed translatsiooni initsiatsioonifaktorid, mis võimaldavad tekkida initsiatsioonikompleksil (Sonenberg ja Hinnebusch, 2007).



**Joonis 1. Illustratiivne näidis mRNA struktuuri osistest.** mRNA molekulil esinevad 5' cap-struktuur, 5' UTR, kodeeriv ala koos start (AUG) ja stopp-aladega (UAA, UAG, UGA), 3' UTR ja polü(A) saba. Esinevad ka järgnevad modifikatsioonid:  $m^6A$ ,  $m^7G$ ,  $m^6Am$  ja nende asukohad mRNAs. Pilt on tehtud veebirakenduse BioRender abil.

Kodeeriv ala algab startkoodoniga AUG ja lõpeb stoppkoodoniga, mis märgistab valgusünteesi lõppu ning selle tripletid on UAA, UAG või UGA. 3' otsas asub polü(A) saba, mis kaitseb samuti eksonukleaaside poolt vahendatud degradatsiooni eest ning on vajalik translatsiooni algatamiseks: pärmi polü(A) sabal olev valk PAB1P (polü(A) seonduv valk) seonduv eIF4G-ga (eukarüoosi translatsiooni initsiatsiooni faktor 4 G), mistõttu abistatakse ribosoomi 40S subühiku toomist translatsiooni alguskohta (Otero, *et al.*, 1999; Villa ja Fraser, 2024).

mRNA esineb üksikahelalisena, kuid tihti moodustab kaksikahelalisi piirkondi ehk sekundaarstruktuure, näiteks: juuksenõela aas (ingl *hairpin loop*), pseudosõlm (ingl *pseudoknot*), sisemine aas (ingl *internal loop*) ja ka mittekomplementaarse seondumise tagajärjel tekkinud väljaulatuv mõhk (ingl *bulge*) (Macke, *et al.*, 2001). mRNA sekundaarstruktuuri saavad mõjutada ka modifikatsioonid:  $m^6A$  (N6-metüüladenosiin) takistab adeniini ja uratsiili vahele tekkivat vesiniksidet ja seetõttu takistab sekundaarstruktuuri ja stabiliseerib väljaulatuvaid otsi (Roost, *et al.*, 2015).

### 1.3. mRNA modifikatsioonid

#### 1.3.1. Modifikatsioon $m^7G$ 5' cap-struktuuris

Modifikatsioonid esinevad mRNA eri osades, näiteks N7-metüülguanosiin ehk  $m^7G$  on eukarüootses mRNA-s esinev modifikatsioon, mis asub 5' otsal esimese nukleotiidina (Joonis 1) (Furuichi, *et al.*, 1975). Analoogselt nimetatakse seda ka 5' cap-struktuuriks, kuid sel juhul võetakse arvesse ka erandlik kolmfosfaatne sild kahe nukleosiidi vahel, mistõttu nimetatakse seda  $m^7GpppN$ -iks, kus N tähistab nukleosiidi (Furuichi, *et al.*, 1975). Tänapäevaks on teada, et esimene nukleotiid pärast 5' cap-i on kõige tõenäolisemalt A, siis C, G ja kõige vähem tõenäolisemalt U (Wang, *et al.*, 2019). Modifikatsioonidega interakteeruvad valke liigitatakse

gruppidesse: modifikatsioonide „kirjutajad“, „kustutajad“ ja „lugejad“, kus esimesed katalüüsivad nukleotiidide modifikatsioone, „kustutajad“ eemaldavad ja „lugejad“ tunnevad ära kindla modifikatsiooni ning aitavad teistel ensüümidel seonduda äratuntud saiti ja täita oma funktsiooni. m<sup>7</sup>G modifikatsiooni kirjutab RNMT ehk RNA guaniin-7 metüültransferaas, mis on seondunud RNA polümeraas II CTD-le (C-terminaalsele domäänile) (McCracken, *et al.*, 1997). Antud modifikatsiooni jaoks ei ole rakus kustutajavalku, kuid uuringute koheselt toimub pigem terve m<sup>7</sup>Gpp cap-struktuuri eemaldamine mRNA cap-eemaldaja ensüüm 2 poolt, jättes alles vaid esimese nukleotiidi pärast 5' cap-i (Steiger, *et al.*, 2003). m<sup>7</sup>G modifikatsioonil on oluline roll cap-siduva kompleksi (CBC) loomises, mis omakorda on vajalik RNA tuumast väljumisel ja splaissosoomi tekkes, mis viib läbi pre-mRNA splaissingut (Pabis, *et al.*, 2013). Üks m<sup>7</sup>G omadustest on veel mRNA kaitsmine 5'→3' eksonukleasidest nii tuumas kui ka tsütoplasmas (Stevens, 1980).

### 1.3.2 Adeniini riboosi ja lämmastikaluse modifikatsioonid: m<sup>6</sup>A, Am, m<sup>6</sup>Am

Kõige levinum mRNA modifikatsioon N6-metüüladenosiin (m<sup>6</sup>A) (Yue, *et al.*, 2015), avastati 1974. aastal (Desrosiers, *et al.*, 1974). Modifikatsiooni lisab kirjutajakompleks WTAP-METTL3-METTL14 ning abistab VIRMA (Wilmsi tuumoriga seotud valk 1, metüültransferaasisarnane valk 3/14, m<sup>6</sup>A-ga seotud Vir-sarnane valk) ja teised valgud (Liu, *et al.*, 2014; Bawankar, *et al.*, 2021; Wang, *et al.*, 2021; Wen, *et al.*, 2018). METTL3 omab katalüütilist võimekust ja lisab modifikatsiooni ning METTL14 leiab vajaliku asukoha, kuhu tuleb lisada modifikatsioon (Liu, *et al.*, 2014). WTAP ja VIRMA interakteeruvad mõlema eelneva valguga soodustades METTL3-METTL14 kompleksi seondumist sihtmärk-adeniinile. Metüülrühma doonorina kasutatakse S-adenosüülmetioniini (SAM) (Schwartz, *et al.*, 2014; Yue, *et al.*, 2018; Bokar, *et al.*, 1997). Modifikatsiooni saavad eemaldada valgud ALKBH5 (alkB homolog 5) (Zheng, *et al.*, 2013) ja FTO (rasvamassiga ja rasvumisega seotud valk) (Jia, *et al.*, 2011). Kõige tuntumad m<sup>6</sup>A lugejavalgud kuuluvad YTH-domääni valgu perekonda, täpsemalt YTHDF1–3 ja YTHDC1–2 (YTH m<sup>6</sup>A RNA-le siduv valk DF1–3 ja DC1–2). Need valgud tunnevad ära m<sup>6</sup>A-rikka RNA ja reguleerivad transkripti alternatiivset splaissingut, translatsiooni tõhusust ja metüleeritud mRNA lagundamist (Wang, *et al.*, 2015; Wang, *et al.*, 2014; Shi, *et al.*, 2017; Xiao, *et al.*, 2016; Hsu, *et al.*, 2017). Kõige enam paikneb modifikatsioon m<sup>6</sup>A kodeerivas alas, täpsemalt TSS-ist (translatsiooni start-sait) allavoolu, stopp-koodonis ja 3' UTR-is (Joonis 1) (Dominissini, *et al.*, 2012; Batista, *et al.*, 2014). Esialgu arvati, et m<sup>6</sup>A esinemissagedus on 0,19-0,22% kõigist nukleotiididest (Wei, *et al.*, 1975; Perry ja Kelley, 1974), kuid uuemate andmete järgi on see maksafibroosi rakuliini HepG2

transkriptoomi puhul näiteks 0,05% ehk umbkaudselt 1,7 modifikatsiooni geeni kohta (Dominissini, *et al.*, 2012) ja hiirte maksafibroosi rakkudel on 80%-l juhtudest 1-3 m<sup>6</sup>A modifikatsiooni transkripti kohta (Fan, *et al.*, 2021).

RNA modifikatsioonile 2'-O-metüüladenosiin (Am) on iseloomulik metüülgrupp riboosi teises positsioonis. Antud modifitseerimist viib läbi mRNA 5' *cap* juures valk CMTR1 (*cap*-i metüültransferaas 1) (Belanger, *et al.*, 2010). CMTR1 muutused mõningates SNP-ides (üksiknukleotiidsetes polümorfismides) on seotud mitmete krooniliste haigustega, näiteks CMTR1 esineb rohkem raske astmaga patsientidel (Dahlin, *et al.*, 2015) ja Alzheimeri tõve puhul (Boza-Serrano, *et al.*, 2018). Samuti on CMTR1 vajalik mitmete interferoonide poolt aktiveeritavate geenide avaldamiseks, mis on tähtsad viirusinfektsioonidega võitlemisel (Williams, *et al.*, 2020). Hetke seisuga pole sellele modifikatsioonile leitud kustutaja- ega lugejavalke. Am lisamise mehhanism toimib läbi CMTR1 kinnitumise RNA polümeraas II CTD-le (Haline-Vaz, *et al.*, 2008) ning Am lisatakse 5' *cap*-struktuuri äratundmisel, mis ei vaja m<sup>7</sup>G esinemist (nn *cap*-0 struktuur), vaid saab olla modifitseerimata G (Byszewska, *et al.*, 2015).

5' *cap*-struktuuri juures esimese nukleotiidina paiknev Am on sihtmärgiks PCIF1 (fosforüleeritud CTD-ga interakteeruv faktor 1) metüültransferaasile, mis moodustab CTBP2-ga (C-terminusega ühenduv valk 2) kompleksi RNA polümeraas II CTD-l ja kasutades SAM-i metüülrühma doonorina muudab Am-i m<sup>6</sup>Am-iks (N6, 2'-O-dimetüüladenosiin) (Joonis 1) (Li, *et al.*, 2023; Fan, *et al.*, 2003; Akichika, *et al.*, 2019). Antud modifikatsioon esineb ka snRNA-s (väike tuuma RNA), kus selle lisamine ei ole piiritletud 5' alaga, vaid modifikatsioon võib esineda molekuli keskel ning seda kirjutab valk METTL4 (Chen, *et al.*, 2020; Goh, *et al.*, 2020). m<sup>6</sup>Am funktsioon seisneb translatsiooni tõhustamises läbi mRNA stabiilsuse tõusu (Akichika, *et al.*, 2019; Mauer, *et al.*, 2017). Samuti ei vajata ilmtingimata m<sup>7</sup>G modifikatsiooni (*cap*-0) ega Am olemasolu, kuid need kiirendavad m<sup>6</sup>Am lisamise protsessi (Yu, *et al.*, 2022; Yu, *et al.*, 2021). Ainus kustutajavalik m<sup>6</sup>Am jaoks on FTO ning see tunneb ära ka eelnevalt mainitud m<sup>6</sup>A modifikatsiooni, kuid FTO-l on kõrgem afiinsus m<sup>6</sup>Am vastu (Mauer, *et al.*, 2017). Samas võib mängida rolli ka FTO lokalisatsioon: rakutuumas on eelistatud substraadina m<sup>6</sup>A ja tsütoplasmas m<sup>6</sup>Am (Wei, *et al.*, 2018). Antud efekt võib tuleneda sellest, et vaadeldi polü(A) mRNA kogust, kuid m<sup>6</sup>Am stabiliseerib mRNA molekuli, mis on tähtis eelkõige tsütoplasmas (Wei, *et al.*, 2018). m<sup>6</sup>Am modifikatsioonil pole hetke seisuga teada lugejavalke. Modifikatsioon mängib tähtsat rolli mitmete haiguste kulgemisel: HIV-1 (inimese immuunpuudulikkuse viirus 1) korral suunab Vpr (viiruse valk R) PCIF1 lagundamisele ja sellega allareguleeritakse ka m<sup>6</sup>Am, mistõttu mitmete transkriptsioonifaktorite (näiteks ETS1 (erütroblasti transformatsiooni spetsiifiline transkriptsioonifaktor 1), mis inhibeerib HIV-i

replikatsioon) mRNA tase langeb (Zhang, *et al.*, 2021). Samuti pakub huvi asjaolu, et viirused kasutavad ära peremehe PCIF1 süsteemi, lisades enda mRNA-le m<sup>6</sup>Am modifikatsioone, maskeerides seeläbi peremehe mRNA-deks, mistõttu rakk ei lagunda viiruslikku RNA-d (Tartell, *et al.*, 2021). Antud modifikatsioon mängib rolli ka vähkkasvaja arengus: täpsemalt maovähi, jämesoolevähi ja peaajukasvaja puhul (Zhuo, *et al.*, 2022; Wang, *et al.*, 2023; Gao, *et al.*, 2022).

#### 1.4. Naha immunoloogia

Nahk on inimese suurim organ, mis koosneb epidermisest, dermisest ja alusnahast. Selle funktsioon on kaitsta organismi välismõjude ja patogeenide eest, mistõttu immuunsüsteem mängib nahas tähtsat rolli. Epidermis on esmane kaitse, mis koosneb pealmisest sarvkihist, mida toodavad keratinotsüüdid. Lisaks eelnevalt nimetatud keratinotsüütidele esinevad epidermisest ka Langerhansi rakud, mis on dendriitrakkude alamtüüp ja dendriitrakud, mis on vajalikud immuunsüsteemi aktiveerimiseks ning on võimelised esitama antigeene (Braathen ja Thorsby, 1980). Dermises asetsevad veresooneid, närvid, nuumrakud, T- ja B-lümfotsüüdid ning makrofaagid, mis saavad fagotsütoosiga eemaldada ebavajalikke komponente nagu surnud rakud või bakterite osised. Alusnahas esinevad närvirakud, veresooneid ja adipotsüüdid.

Kui patogeen läbib epidermise sarvkesta näiteks haavandi kaudu, siis aktiveerub kaasasündinud immuunsus: makrofaagid, NK-rakud (loomulikud tapjarakud) ja tsütotoksilised T-rakud hävitavad patogeene ja dendriitrakud presenteerivad enda pinnal patogeenidest pärit antigeene (Ernst, *et al.*, 2000). See omakorda aktiveerib omandatud immuunsüsteemi, kus aktiveerunud Th-rakud (abistaja T-rakk) hakkavad eritama signaalmolekule, sealhulgas tsütokiine, ning B-rakud antikehi. Keratinotsüüdid samuti reageerivad, näiteks mehhaanilisele kahjustusele ja PAMP-idele (patogeeni seotud molekulaarne muster) ja selle tagajärjel hakatakse sekreteerima tsütokiine ja kemokiine (Leyva-Castillo, *et al.*, 2013; Lebre, *et al.*, 2007; Köck, *et al.*, 1990; Qiao, *et al.*, 2019). Antud signaalvalkudele reageerivad näiteks veres olevad monotsüüdid ja Th17-rakud, kes tunnevad ära CCL20 (C-C motiiviga kemokiini ligand 20) signaliseerimise keratinotsüütide poolt ja liiguvad kemotaksisega infektsioonikohta (Kennedy-Crispin, *et al.*, 2012; Bouma, *et al.*, 2017). Keratinotsüütidel on olemas mitmed retseptorid patogeenidele omaste molekulide äratundmiseks, näiteks *toll-like* retseptorid (Lebre, *et al.*, 2007). On olemas ka mitmed retseptorid tsütokiinide äratundmiseks, mis on kindlad signaali edastamise molekulid, nagu näiteks interferoon gamma (tsütokiin) retseptor 1 ja 2, mis aktiveerivad JAK-STAT (Janus kinaasid ja signaali edasikandvad ja transkriptsiooni aktiveerivad valgud) signalisatsiooniraja, IL-17RA ja IL-17RC (interleukiin-17 retseptor A ja

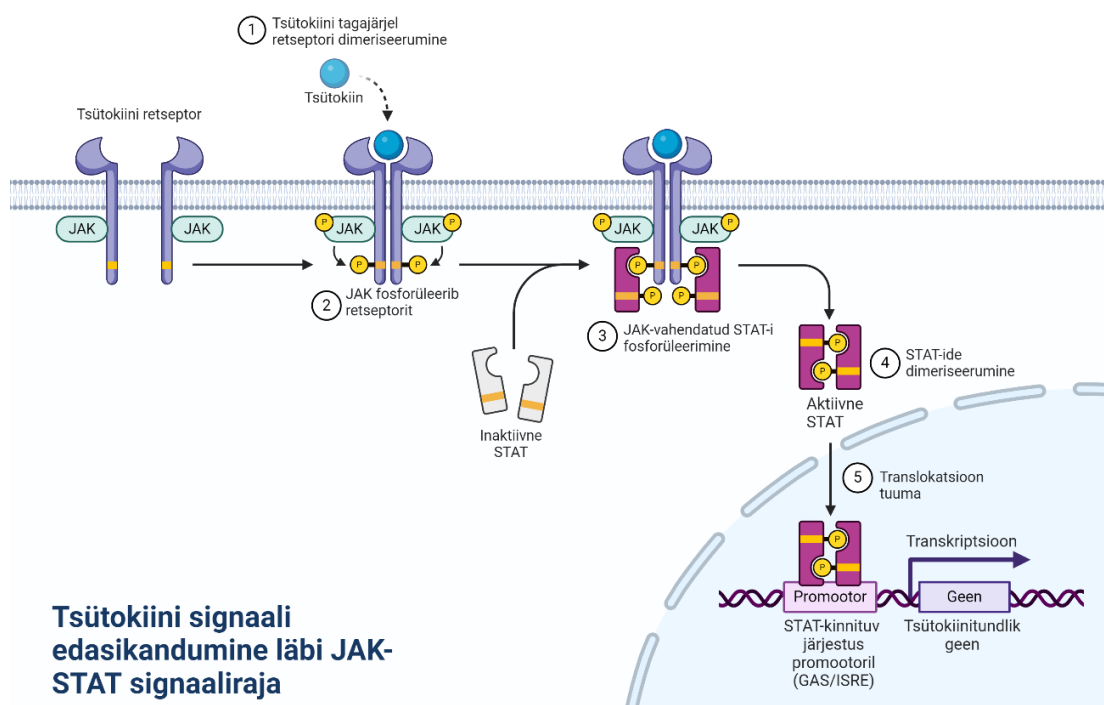
C), mis tunnevad ära IL-17A ja aktiveerivad NF- $\kappa$ B transkriptsioonifaktori (tuuma faktor kappa beeta) signaaliraja (Shao, *et al.*, 2019; Yao, *et al.*, 1995).

#### **1.4.1. Rakuline vastus: NF- $\kappa$ B ja JAK-STAT signaalirajad**

NF- $\kappa$ B ja JAK-STAT on kaks viisi rakkudevahelise põletiku signaali edasikandmiseks. NF- $\kappa$ B on transkriptsiooni reguleerivate valkude perekond, mis on leitav enamus rakkudes. See koosneb valkudest NF- $\kappa$ B1, NF- $\kappa$ B2, Rel (retikuloendoteliioosi viiruslik onkogeen), RelA ja RelB. NF- $\kappa$ B-1 on kaks aktiveerimisrada: kanooniline ja mittekanoniline. Kanooniline rada seisneb kappa-beeta inhibiitori lagundamises läbi ubiquitineerimise, mis viib selle valgu lagundamisele proteasoomi poolt (Fong ja Sun, 2002). See võimaldab RelA ja NF- $\kappa$ B1 valkudel liikuda rakutuuma, kus nad soodustavad transkriptsiooni. Antud rada aktiveerivad näiteks TNF $\alpha$  (vähi nekroosi faktor alfa) ja IL-1 (Osborn, *et al.*, 1989). Mittekanooniline rada seisneb NF- $\kappa$ B2 eellase protsessimises läbi ubiquitineerimise, mistõttu see viiakse proteasoomi lagundamisele ning protsessitud NF- $\kappa$ B2 on kompleksis RelB valguga, mis suundub tuuma ja on tähtis lümfisõlmede arengus ja B-rakkude selektsioonil lümfisõlmes (Xiao, *et al.*, 2001; Weih, *et al.*, 1995; Franzoso, *et al.*, 1997). NF- $\kappa$ B on võimeline inhibeerima keratinotsüütide kasvu ja selle signaaliraja aktiveeritus on madalam psoriaasi puhul (Takao, *et al.* 2003; Lizzul, *et al.*, 2005). Teise töörihma poolt oli aga vastuoluks näidatud, kuidas kappa-beeta inhibiitori puudumise tõttu kontrollimatu NF- $\kappa$ B tase kutsus esile psoriaasi-sarnaseid sümptomeid hiirtel (Rebholz, *et al.*, 2007). Samuti aktiveeritakse NF- $\kappa$ B signaalirada kaudu põletikku soodustavate tsütokiinide tootmist, näiteks IFN $\gamma$  (interferoon gamma), TNF $\alpha$  ja IL-1b (Sica, *et al.*, 1997; Shakhov, *et al.*, 1990; Hiscott, *et al.*, 1993).

JAK-STAT signaalirada koosneb signaali edastavatest ja kandvatest valkudest JAK, TYK (türosiini kinaas), IRF (interferooni regulatoorne faktor) ja STAT (Wilks, *et al.*, 1991; Shuai, *et al.*, 1993). Sellel esinevad ka inhibiitorid SOCS-valkude (tsütokiini signaali supressorvalk) näol, mis on võimelised seonduma STAT või JAK valkudega (Starr, *et al.*, 1997; Endo, *et al.*, 1997). Hetke seisuga on teada JAK-perekonnast valke JAK1, JAK2, JAK3 ja TYK2 ning STAT-perekonnast STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b ja STAT6 (Wilks, *et al.*, 1991; Rane ja Reddy, 1994; Krolewski, *et al.*, 1990; Fu, 1992; Fu, *et al.*, 1992; Zhong, *et al.*, 1994; Mui, *et al.*, 1995; Hou, *et al.*, 1994). Inhibiitorvalkude perekond SOCS koosneb järgnevatest valkudest: CISH (tsütokiiniga indutseeritav SH<sub>2</sub> sisaldav valk), SOCS1–SOCS7 (Yoshimura, *et al.*, 1995; Endo, *et al.*, 1997; Minamoto, *et al.*, 1997; Hilton, *et al.*, 1998). Signaaliülekanne seisneb esialgses signaali äratundmises retseptori poolt, kus JAK-perekonna valk ühendub retseptoriga, peale mida JAK fosforüleeritakse ning fosfaatrühm antakse edasi

STAT-perekonna valgule, kus STAT moodustab dimeeri ning seejärel liigub tuuma ja aktiveerib geeni avaldumist (Joonis 2).



**Joonis 2. Illustratiivne joonis JAK-STAT signaaliraja toimimisest. 1)** Tsütokiin kinnitub retseptorile ja toob esile selle dimeriseerumise, **2)** Dimeriseerunud retseptorit fosforüleerib JAK-valk, **3)** JAK-vahendatud STAT-ide fosforüleerimine ja sellega nende aktiveerimine, **4)** Aktiivsete STAT-ide dimeriseerumine, **5)** Dimeriseerunud aktiivsete STAT-ide translokatsioon tuuma. Pilt kohandatud eesti keelde ning tehtud läbi BioRender veebirakenduse. Esialgsed autorid: R. Medzhitov, A. Iwasaki, J.-H. Lee.

Näiteks IFN $\gamma$  esinemisel fosforüleeritakse esialgu JAK1 ja JAK2, mis omakorda kannavad fosfaatjäägi STAT1-le, mistõttu see aktiveerub. STAT1 moodustab homodimeeri ja liigub rakutuuma importiini abiga ning aktiveerib mitmeid gene, sealhulgas viperiini geeni, IFITM1 (interferooniga indutseeritud transmembraanne valk 1) ja CXCL10 (C-X-C motiiviga kemokiini ligand 10) (Silva, *et al.*, 1994; Shuai, *et al.*, 1992; Shuai, *et al.*, 1994; McBride, *et al.*, 2002; Wiedemann, *et al.*, 2020; Khodarev, *et al.*, 2007; Fryknäs, *et al.*, 2007). SignaaliülekanDES on tähtsal kohal ka regulatsioon läbi negatiivse tagasiside: STAT3 dimeerid aktiveerivad SOCS1 transkriptsiooni, mis inhibeerib STAT3 fosforüleerimist (Naka, *et al.*, 1997). IRF-valkude funktsioon antud rajas seisneb STAT-valkude abistamises. IRF1 abistab STAT1 valkude jõudmist õigesse DNA piirkonda. Näiteks aktiveeritud STAT1 on praktiliselt alati seotud IRF1-ga, mis omakorda suunab STAT1 dimeeri IFN poolt stimuleeritavate geenide transkriptsiooni saitide promootor aladele, kuid samas IRF1 pole alati seotud STAT1-ga ja suudab sõltumatult kinnituda GAS-elementidele (IFN $\gamma$  poolt stimuleeritav aktivatsiooni sait, järjestusega TTCN $_2$ -4GAA (Decker, *et al.*, 1997)) (Zenke, *et al.*, 2018; Abou El Hassan, *et al.*,

2017). Sarnane süsteem esineb ka STAT1 ja STAT2 heterodimeeri puhul, kus IRF9 kinnitub dimeerile, moodustub ISGF3 (IFN-stimuleeritud geeni faktor 3), ja see liigub tuuma ISRE (IFN-tundlik vastuse element, GAAANNGAAA, kus N on C, T, A või G (Fujii, *et al.*, 1999)) järjestusele (Qureshi, *et al.*, 1995; Csumita, *et al.*, 2020).

#### **1.4.2. Nahahaigused psoriaas ja atoopiline dermatiit (AD)**

AD ja psoriaas on kroonilised nahahaigused, mis esinevad lokaalselt põletikuliste lappidena. AD puhul on omane sügelev ja kuiv nahk, mis tihtipeale selgub lapseas (Langan *et al.*, 2020). Psoriaasi iseloomustab kõrgendatud soomusjad nahalaigud, mis võivad valutada ja kalduvad veritsema (Griffiths *et al.*, 2021). Mõlemaid haigusi iseloomustab ülesreguleeritud geenide tase, mis vastutavad rakkude paljunemise eest (SERPINB3/SERPINB4 (serpiini perekond B liige 3/4)) ja allareguleeritud geenid, mis vastutavad rakkude diferentseerumise eest (He, *et al.*, 2021; Guttman-Yassky, *et al.*, 2009).

Atoopilises dermatiidis on paljud põletikulised tsütokiinid ja kemokiinid üleekspresseeritud ja on olemas selline signaalmolekulide muster, mis on omane just AD-le. Need tsütokiinid ja kemokiinid on: IL-4, IL-13, CCL13 ja teised Th2-rakuga seotud tsütokiinid ja kemokiinid (He, *et al.*, 2021). Samuti on haiguse poolt mõjutatud JAK-STAT rada, kus STAT1 tase on kõrgenenud, mis võib olla põhjustatud kõrgenenud IFN $\gamma$  tasemest (He, *et al.*, 2021; Grewe, *et al.*, 1994; Raza, *et al.*, 2008). Lisaks sellele olid kõrgema ekspressiooniga ka IRF1, STAT3, JAK3, STAT4 (He, *et al.*, 2021).

Psoriaasi puhul on samuti paljud tsütokiinid ja kemokiinid üleekspresseeritud ja osa nendest on iseloomulikud psoriaasile. Mõned tsütokiinid/kemokiinid on näiteks: IL-36A/IL-36G, IL-17A, IL-1b, CCL20, CXCL10 ja muud Th1- ja Th17-rakkudega seotud tsütokiinid ja kemokiinid (He, *et al.*, 2021). Samas ei ole need geenid AD puhul märgatavalt kõrgema ekspressiooniga võrreldes haigusteta nahaga (välja arvatud IFN $\gamma$ ), mistõttu võib seda kasutada psoriaasi biomarkerina (He, *et al.*, 2021). Psoriaasis on ka kõrgemad JAK-STAT raja valgud STAT1, IRF1, STAT3, JAK3, STAT4, STAT2 ning madalam JAK1 (He, *et al.*, 2021).

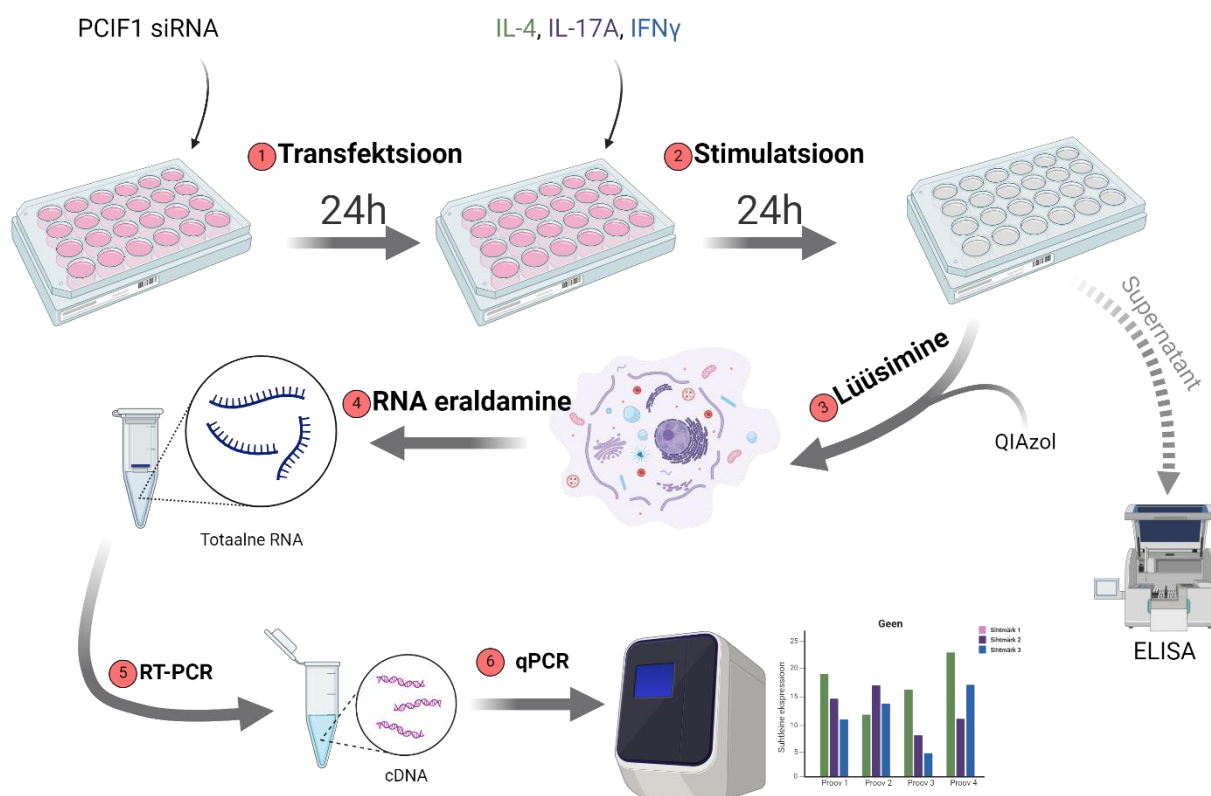
## 2. Eksperimentaalosa

### 2.1. Töö eesmärgid

Antud bakalaureusetöö peamiseks eesmärgiks oli tuvastada, kas ja kuidas m<sup>6</sup>Am modifikatsiooni olemasolu mõjutab rakulist vastust stimuleerimisel tsütokiinidega IL-4, IL-17A ja IFN $\gamma$ .

### 2.2. Materjal ja meetodika

Uuringu skeem on välja toodud illustratiivse joonisena (Joonis 3).



**Joonis 3. Illustratiivne bakalaureusetöös kasutatud meetodikate töökäik.** Meetodite loetelu: **1)** NHEK transfektsioon, **2)** NHEK stimulatsioon, **3)** rakkude lüüsimine, **4)** RNA eraldus, **5)** RT-PCR, **6)** qPCR ja ELISA. Joonis oli tehtud veebirakendus BioRender abil.

#### 2.2.1. Rakukultuur

Töös kasutatakse kommertsiaalselt kättesaadavaid normaalseid inimese epidermaalseid keratinotsüüte (NHEK) (PromoCell). Keratinotsüüte kasvatati söetmel Keratinocyte Growth Medium 3 (PromoCell), kuhu lisati 3,8% kasvufaktoreid (PromoCell), 60  $\mu$ M CaCl<sub>2</sub> (PromoCell), 1% streptomütsiini ja penitsilliini (Gibco). Rakke kasvatati 24 kaevuga plaadil 37 °C ja 5% CO<sub>2</sub> juures Eppendorf CellXpert C170i inkubaatoris. Rakkude kasvu hinnati iga 2-3 päeva tagant ja söödet vahetati iga 2 päeva tagant 80–85% konfluentsuse saavutamiseni.

Vajaliku konfluentsuse saavutamisel pesti rakke Dulbecco fosfaatpuhverdatud füsioloogilise lahusega (DPBS, Sigma-Aldrich) ja koguti kokku kasutades 0,05% trüpsiin-EDTA-d (trüpsiin-etüleendiamiintetraatsetaat) (Gibco).

### **2.2.2. PCIF1 siRNA (väike vaigistav RNA) transfektsioon NHEK rakkudesse**

Rakke transfekteriti PCIF1 siRNA ja negatiivse kontroll-siRNA-ga (Thermo Fisher, PCIF1: kataloog AM16708, ID 133516; kontroll: kataloog 4390843). Transfektsiooni läbiviimiseks kasutati rakku läbivat peptiidi NickFect 71 (NF71), mis valiti selle tõhususe ja väikse tsütotoksilisuse poolest keratinotsüütides (Carreras-Badosa, *et al.*, 2020). Peptiidi järjestus on järgnev: stearüül-HHYHHGO<sup>a</sup>ILLKALKALAKAIL-NH<sub>2</sub>, kus O<sup>a</sup> tähistab seondumist kõrvalahela aminorühmaga, mitte alfa-aminorühmaga (Carreras-Badosa, *et al.*, 2020). Nanopartikleid moodustati kasutades 60 nM siRNA-d ja 1,02 µM NF71 steriilses vees. Transfektsioonisegu lisati rakkudele ja inkubeeriti 24 tundi inkubaatoris (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>), peale mida stimuleeriti tsütokiinidega.

### **2.2.3. NHEK stimulatsioon tsütokiinidega**

Antud töös kasutati stimuleerimiseks tsütokiine IL-4, IL-17A ja IFN $\gamma$ . Lõppkontsentratsioon rakkudel oli järgnev: 40 ng/ml (IL-4), 10 ng/ml (IL-17A), 20 ng/ml (IFN $\gamma$ ). Tsütokiinide valik oli tehtud põhimõttel, et AD puhul on üleekspressioneeritud IL-4 ja psoriaasil IL-17A ning mõlemal on kõrgem IFN $\gamma$  kontsentratsioon (Langan *et al.*, 2020; Griffiths *et al.*, 2021). Tsütokiinid olid lahjendatud Opti-MEM (Gibco) söötmes. Stimuleerimata kontrollile lisati ainult Opti-MEM söödet. Seejärel inkubeeriti plaati (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) 24 tundi.

### **2.2.4. Supernatandi kogumine ELISA jaoks, RNA eraldamine ning RT-qPCR (pöördtranskriptsioon-kvantitatiivne PCR)**

Pärast stimuleerimist koguti rakkudelt supernatant hilisema ELISA (immunoensüümmeetod) jaoks. Selleks koguti supernatant pipetiga eraldi tuubidesse, mida tsentrifugeeriti lauatsentrifuugis Centrifuge 5425 (Eppendorf) (edaspidi lauatsentrifuug) 5 minutit 600 g juures. 450 µl tõsteti ümber uute tuubi ja hoiustati -80 °C juures.

Rakke lüüsi kasutades QIAzol lüüsireagenti (QIAGEN). Rakkudele lisati 400 µl QIAzol lüüsireagenti, kraabiti põhja pipetiotsikuga ja seejärel resuspendeeriti rakke. Lüsaati koguti eraldi tuubidesse ja järgnevalt lisati 80 µl kloroformi (1:5 QIAzol-i ruumalast) ja segati

kasutades Vortex-Genie 2 (Scientific Industries). Pärast segamist oodati faaside jaotumist ja seejärel tõsteti tuubid tsentrifuugi MIKRO 220 (Hettich) 15 minutiks, 13000 pööret, 4 °C (kasutati 48-kohalist rootorit, kataloogi number: 1158-L). Viimaks tõsteti ülemine faas uude tuubi, kuhu lisati 400 µl isopropanooli (1:1 QIAzol-i ruumalast) ning segati. Segu lisati miRNeasy mini kit (QIAGEN) kolonnile ning järgnevalt eraldati RNA tootja protokoll järgi. RNA kogust mõõdeti kasutades NanoDrop 2000c (Thermo Scientific) spektrofotomeetrit.

RT-qPCR teostati kaheetapiliselt: esialgu totaalselt RNA-lt cDNA (komplementaarne RNA-ga DNA) süntees pöördtranskriptaasi (RT) abil ning seejärel qPCR. Pöördtranskriptsiooni PCR teostati kasutades 250 ng RNA-d ning lahjenduseks ribonukleaasivaba vett. Esialgu lisati Oligo(dT)<sub>18</sub> (Thermo Fisher) (5 µM) ja seejärel vajaminev lahjenduse vesi ning seejärel totaalne RNA. Järgnevalt lisati lahus, milles oli ühe proovi kohta: 1x RT (pöördtranskriptaasi) puhver, 1 mM dNTP, 1 U (ensüümi ühik) RiboLock, RevertAid RT 10 U (Thermo Scientific RevertAid RT Reverse Transcription Kit, katalooginumbriga K1691). Ühe reaktsioonisegu maht ühes kaevus oli 20 µl ning reaktsioonilahust segati 96-kaevu plaadil. cDNA süntees viidi läbi Mastercycler nexus (Eppendorf) termotsükleris järgneva programmiga:

1. 42 °C 60 min
2. 70 °C 5 min
3. 4 °C kuni programm peatatakse

Valmis cDNA lahjendati 15 korda vees ja kasutati qPCR-i analüüsi eesmärgil. Esialgu segati kokku 5X HOT FIREPol EvaGreen qPCR Supermix (Solis BioDyne) ja vajamineva praimeride pärisuunalised (*forward*) ja vastassuunalised (*reverse*) järjestused (TAG Copenhagen). Analüüsil võrreldi geenide avaldumist suhtena kontrolliga: eEF1A (eukarüoosi translatsiooni elongatsiooni faktor 1 alfa) mRNA tasemega. Kõigi bakalaureusetöö raames kasutatud praimerite loetelu ja järjestused asuvad Lisa 1-s. Seejärel pipeteeriti 6 µl segu 384-kaevu plaadi aukudesse ja seejärel 6 µl cDNA proovi. qPCR läbiviimiseks kasutati QuantStudio 12K Flex (Applied Biosystems) seadme järgnevat programmi:

<b>Denaturatsioon</b>	<b>50 °C</b>	<b>2 min</b>	
	<b>95 °C</b>	<b>15 min</b>	
<b>Denaturatsioon</b>	<b>95 °C</b>	<b>15 s</b>	} 40 tsükli
<b>Ekstensioon</b>	<b>60 °C</b>	<b>1 min</b>	
<b>Sulamistäpi leidmine</b>	<b>95 °C</b>	<b>15 s</b>	

60 °C	1 min
95 °C	15s

Andmete analüüsil kasutati  $2^{-\Delta\Delta CT}$  meetodit. Täpsemalt:  $2^{-((Ctp2-Ctk2)-(Ctp1-Ctk1))}$ , kus Ctp2 on uuritava proovi tsükkel, millest valgussignaali ületas lävendi, Ctk2 on koduhoidja (eEF1A) geeni tsükkel, Ctp1 kontrolli proovi tsükkel, mille järgi on teised normaliseeritud, Ctk1 on koduhoidja geeni tsükkel, mille järgi on normaliseeritud. Analüüs oli tehtud MS Exceli abil. Edaspidi kasutati andmete visualiseerimiseks ja analüüsimiseks rakendust GraphPad 10 ning statistika leidmiseks kasutati sisseehitatud programmi Studenti kahesuunalist t-testi,  $\alpha=0,05$ . p-väärtuse leidmiseks kasutati Holm-Šidak meetodit. Referentsgeeniks kasutati koduhoidjageeni eEF1A, kuna selle ekspressioon ei muutu stimulatsiooni käigus (Chen, et al., 2013).

### 2.2.5. Kihiline immunoensüümmeetod (*sandwich* ELISA)

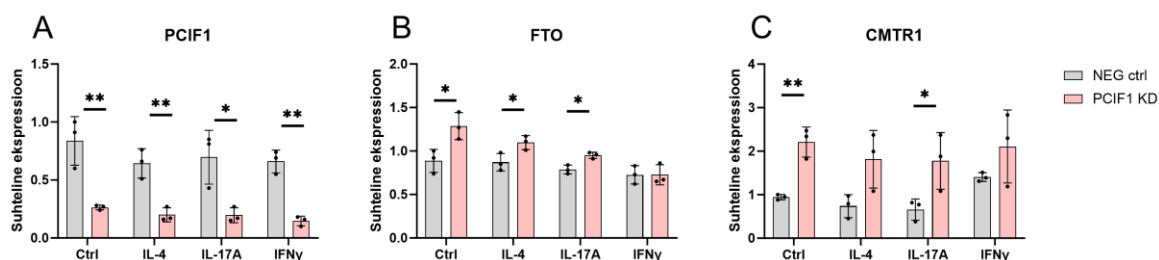
Kogutud supernatant kasutati ELISA-s rakulise vastuse valkude kontsentratsiooni määramiseks. Töös kasutati ELISA MAX Deluxe Set (BioLegend) komplekti ning uuriti järgnevaid valke: CCL5, CXCL10, IL-1b. Meetodi tegemisel järgiti komplektis olevat juhist. ELISA lõpetamiseks kasutati 1 M väävelhapet ning juhiste järgi mahtu. ELISA jaoks olid mõningad proovide supernatandid lahjendatud *assay diluent* A-s, mis oli komplektis olemas. CCL5 kontroll siRNA proovi Opti-MEM, IL-4 ja IL-17A-ga lahjendati kaks korda, IFN $\gamma$  puhul 10 korda. PCIF1 siRNA puhul lahjendati kõik proovid 30 korda. CXCL10 kontroll siRNA IFN $\gamma$  proovi ja kõik PCIF1 siRNA proovid 20 korda. Valguse neelduvuse andmete saamiseks kasutati mikroplaadi lugejat Ledetect 96 ning selle tarkvara Capture96. Tarkvaras mõõdeti ühte tulemust kolm korda: mõõtmisfiltriga 450 nm ja referentsfiltriga 540 nm; mõõtmisfiltriga 450 nm ja referentsfiltriga 0 nm; mõõtmisfiltriga 540 nm ja referentsfiltriga 0 nm. Andmete analüüsil kasutati mõõtmistulemusi mõõtmisfiltriga 450 nm ja referentsfiltriga 540 nm.

ELISA andmete analüüs toimus läbi veebirakenduse MyAssays, kus otsinguribalt leiti “Four Parameter Logistic Curve”. Edaspidi sisestati mõõtmistulemusi, märgistati ära, kus asetses kindel proov, sisestati standardite lahjendusrida, lahjendusfaktorid ning nimetati ära proovid ja veebirakenduses algatati kalkuleerimine. Väljundfailist võeti kontsentratsioonid ning sarnaselt qPCR analüüsile moodustati graafikud ja teostati analüüs rakenduses GraphPad 10.

## 2.3. Tulemused

### 2.3.1. PCIF1 KD puhul tõstetakse m<sup>6</sup>Am-seotud valkude mRNA ekspressiooni

Esimesena hinnati, kui võrd tõhus oli siRNA transfektsioon ja PCIF1 geeni vaigistamine puhul ehk kas antud siRNA ja rakku läbiva peptiidi NF71 kombinatsioon on sobilik kasutamiseks NHEK rakkudes. PCIF1 KD edukus võrreldes kontrolli siRNA transfektsiooniga oli umbkaudu 70% kõikides tingimustes (Joonis 4A). Kuna PCIF1 KD osutus edukaks, siis kõik järgnevad erinevused geenide avaldumise mõõtmises tulenevad suure tõenäosusega vähenenud PCIF1 kogusest ja vastavalt m<sup>6</sup>Am arvukuse vähenemisest. Analüüsid teisi m<sup>6</sup>Am-ga seotud valke, FTO puhul (Joonis 4B) leidsime, et PCIF1 KD kutsus esile märkimisväärset üleekspressiooni kõikides tingimustes, välja arvatud stimuleerimine IFN $\gamma$ -ga. CMTR1 puhul aga statistiliselt oluline üleekspressioon on vaid stimuleerimata ja IL-17A-ga töödeldud rakkudes PCIF1 KD puhul (Joonis 4C). CMTR1 üleekspressioon võib olla seotud kõrgegenenud vajadusega teiste valkude osas, et kompenseerida PCIF1 puudust, mis omakorda mõjutab mRNA stabiliseerimist, mis omakorda mõjutab laiemalt transkriptsiooni, RNA metabolismi, translatsiooni, histoonide ja ribosomaalsete valkude sünteesi (Liang, *et al.*, 2022). PCIF1 KD mõju FTO ekspressioonile on suhteliselt vähene, kuid on huvitavam selle poolest, et FTO eemaldab m<sup>6</sup>Am modifikatsiooni, samas seda modifikatsiooni on niigi vähem PCIF1 KD tõttu. Samas FTO kõrgegenenud ekspressioon on seotud reaktiivsete hapnikuühendite tootmisega, mis on võimelised aktiveerima NF- $\kappa$ B läbi kappa beeta inhibiitori suunamise lagundamisele (Fan, *et al.*, 2015).

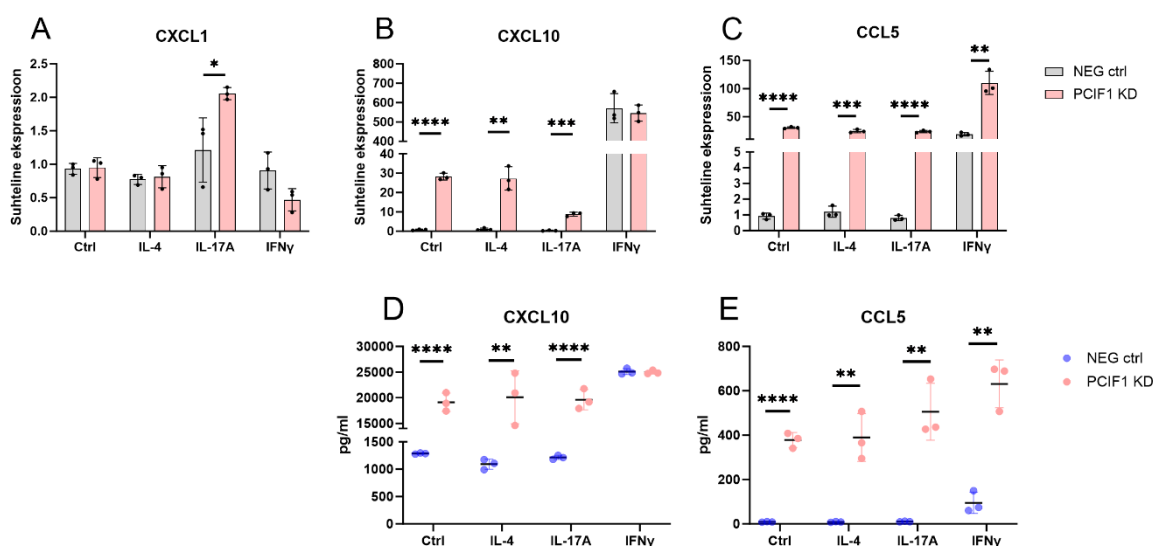


**Joonis 4. m<sup>6</sup>Am-assotsieerunud valkude tasemed on mõjutatud PCIF1 KD-ga NHEK rakkudes. A) PCIF1, B) FTO ja C) CMTR1 mRNA suhteline ekspressioon stimuleerimata ja tsütokiinidega stimuleeritud NHEK WT ja PCIF1 KD rakkudes. Analüüsimiseks kasutati kahe-suunalist Studenti t-testi, \* p  $\leq$  0,05; \*\* p  $\leq$  0,01; märkimata on võrdväärne statistilise ebaolulisusega.**

### 2.3.2. PCIF1 KD tulemusena aktiveerub IFN (JAK/STAT) signaalirada

Vastuseks välismõjudele, näiteks antud töös kasutatud tsütokiinid, keratinotsüüdid kalduvad eritama kindlat mustrit põletikku soodustavatest tsütokiinidest ja kemokiinidest nagu CXCL1,

CXCL10, CCL5 (He, *et al.*, 2021). Mainitud kemokiinide ekspressioonitase oli mõõdetud läbi RT-qPCR (mRNA) ja ELISA (valk) (Joonis 5). CXCL1 puhul täheldati vaid mõningane üleekspressioon vastusena IL-17A-le PCIF1 KD olukorras, siiski puudus efekt stimuleerimisel teiste tsütokiinidega (Joonis 5A). CCL5 ja CXCL10 teisalt olid ülesreguleeritud PCIF1 KD puhul nii mRNA (Joonis 5B, C) kui ka valgu tasemel (Joonis 5D–E). Huvitaval määral CXCL1 on toodetav läbi NF- $\kappa$ B, CCL5 on toodetav nii NF- $\kappa$ B ja JAK-STAT signaaliraja ning CXCL10 rangelt läbi JAK-STAT signaaliraja (Wu, *et al.*, 2018; Yeo, *et al.*, 2020; Liu, *et al.*, 2022; Panzer, *et al.*, 2008). Saadud tulemused viitavad, et m<sup>6</sup>Am võib olla oluline IFN signaaliraja jaoks, eriti arvestades asjaolu, kus IFN $\gamma$ -ga stimuleeritud PCIF1 KD NHEK rakkudes CXCL10 ekspressiooni tase ei muutu (Joonis 5B, D). Üks seletustest võib olla see, et m<sup>6</sup>Am puudumisel IFN signaaliraja piirangud on madalamad, mistõttu väliseid mõjusid pole enam vaja. Tugev ja järjepidev IFN signaaliraja aktivatsioon keratinotsüütides võib olla düsregulatsiooni põhjuseks põletikulises vastuses ja viia immuunvahendatud nahahaiguste tekkeni.

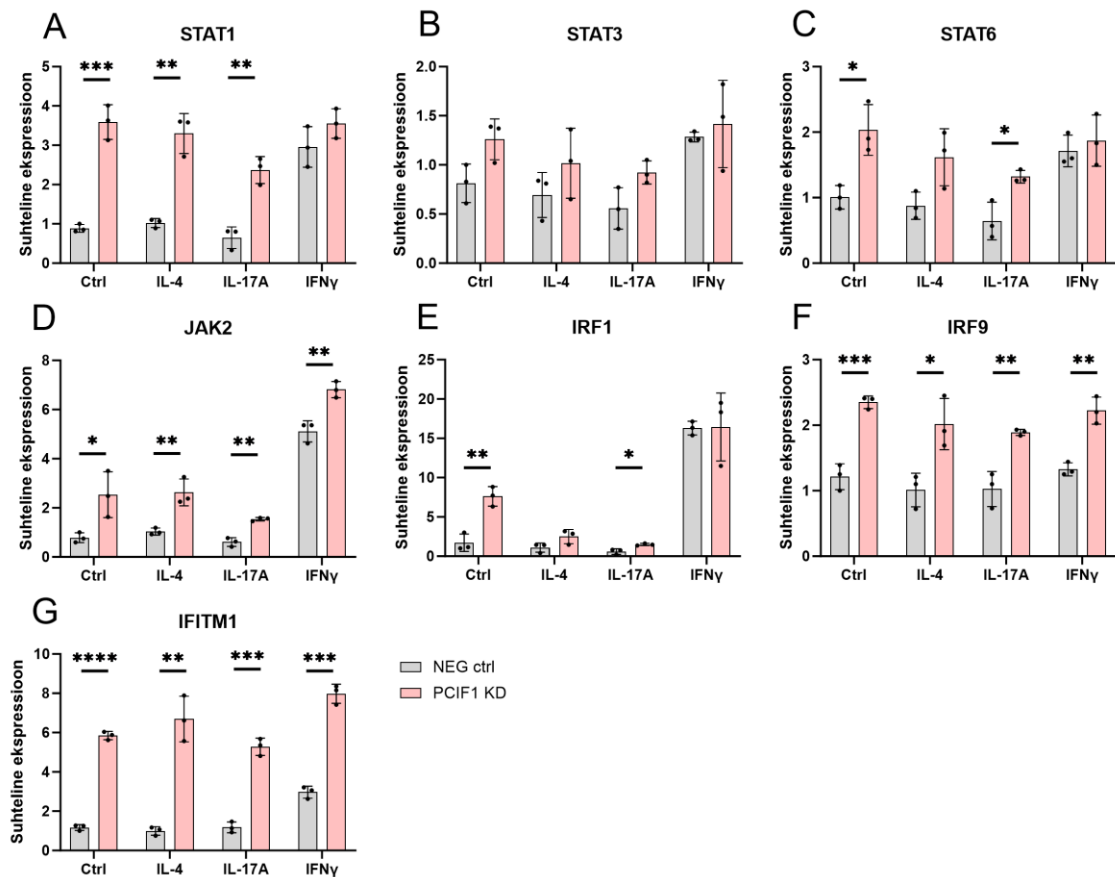


**Joonis 5. Kemokiinide CXCL1, CXCL10, CCL5 suhteline ekspressioon ja valgu tase NHEK rakkudes. A) CXCL1, B) CXCL10 ja C) CCL5 mRNA suhteline ekspressioon stimuleerimata ja stimuleeritud tsütokiinidega NHEK WT ja PCIF1 KD rakkudes. D) CXCL10 ja E) CCL5 valgu tase stimuleerimata ja stimuleeritud tsütokiinidega NHEK WT ja PCIF1 KD rakkudes. Analüüsimiseks kasutati kahe-suunalist Studenti t-testi, \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ ; märkimata on võrdväärne statistilise ebaolulisusega.**

### 2.3.3. PCIF1 KD ülesreguleerib IFN-stimuleeritud JAK-STAT signaaliraja ekspressiooni

Järgnevalt teostati RT-qPCR analüüs mitmetest JAK-STAT signaaliraja valkudest selleks, et paremini saada aru m<sup>6</sup>Am rollist IFN signaaliraja reguleerimises. Täpsemalt analüüsiti

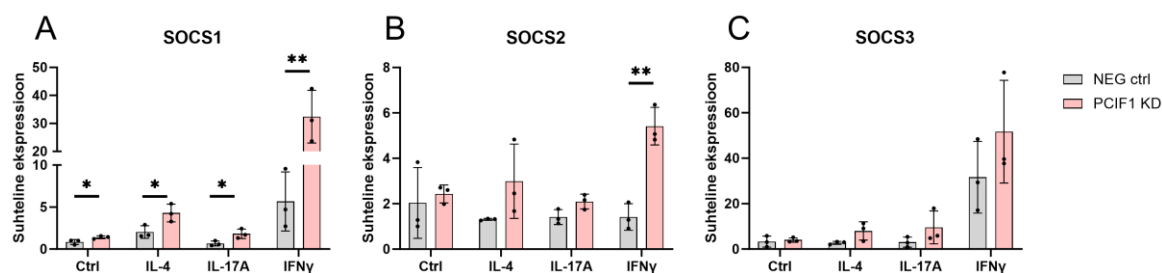
järgmiste geenide avaldumist: STAT1, STAT3, STAT6, JAK2, IRF1, IRF9 ning ka IFN stimuleeritud JAK-STAT raja poolt aktiveeritav valk IFITM1 (Joonis 6). Täheledata, et STAT1 puhul ekspressioon tõusis PCIF1 KD puhul kõikides vaadeldud tingimustes, välja arvatud IFN $\gamma$ -stimuleeritud rakkudes (Joonis 6A). See tulemus on kooskõlas varasemate andmetega (Joonis 5B, D), kuna STAT1 mängib tähtsat rolli tüüp I IFN (IFN $\alpha$ /IFN $\beta$ ) ja tüüp II IFN (IFN $\gamma$ ) signaliseerimisel ning on vastutav CXCL10 geeni avaldumise eest (Darnell, *et al.*, 1994; Tomita, *et al.*, 2017). Samuti oli kõrgeenenud STAT6 suhteline ekspressioon stimuleerimata ja IL-17A-stimuleeritud rakkudes PCIF1 KD puhul (Joonis 6C). STAT6 dimeriseerub IL-4 ja IL-13 stimuleerimise tagajärjel ja on huvipakkuv seoses selle olulisusega AD kontekstis (Shimoda, *et al.*, 1996; Takeda, *et al.*, 1996). JAK2 suhteline ekspressioon on üleekspressioon kõikides vaadeldud tingimustes PCIF1 KD rakkudes (Joonis 6D). JAK2 on vajalik IFN $\gamma$  signaali edasikandmiseks JAK-STAT signaalirajas (Bellucci, *et al.*, 2015). IRF1 puhul esines kõrgeenenud suhteline ekspressioon stimuleerimata ja IL-17A-stimuleeritud PCIF1 KD rakkudes (Joonis 6E). Peatükis 1.2.1. oli mainitud antud valgu tähtsus IFN $\gamma$  signaali edasi kandmisel ja sarnane funktsioon on ka IRF9 valgu puhul, mis oli üleekspressioon kõikides vaadeldud tingimustes (Joonis 6F). PCIF1 KD puhul IFITM1 transkriptsioon on aktiveeritav läbi JAK-STAT signaaliraja IRF9-STAT1-STAT2 kompleksi poolt (nn ISGF3) ja selle kõrgeenenud tase PCIF1 KD puhul (Joonis 6G), eriti võttes arvesse kõrgeenenud STAT1 ja IRF9 taset (Joonis 6A, F), mis viitab, et see signaalirada on üldiselt ülesreguleeritud (Nowicka, *et al.*, 2023).



**Joonis 6. JAK-STAT signaaliraja valkude ja signaaliraja poolt aktiveeritava valgu IFITM1 suhteline ekspressioon. A) STAT1, B) STAT3, C) STAT6, D) JAK2, E) IRF1, F) IRF9 ja G) IFITM1 mRNA suhtelised ekspressioonid. Analüüsimiseks kasutati kahe-suunalist Studenti t-testi, \* p  $\leq$  0,05; \*\* p  $\leq$  0,01; \*\*\* p  $\leq$  0,001; \*\*\*\* p  $\leq$  0,0001; märkimata on võrdväärne statistilise ebaolulisusega.**

### 2.3.4. PCIF1 KD tõstab IFN-stimuleeritavate JAK-STAT inhibiitorvalkude SOCS ekspressiooni

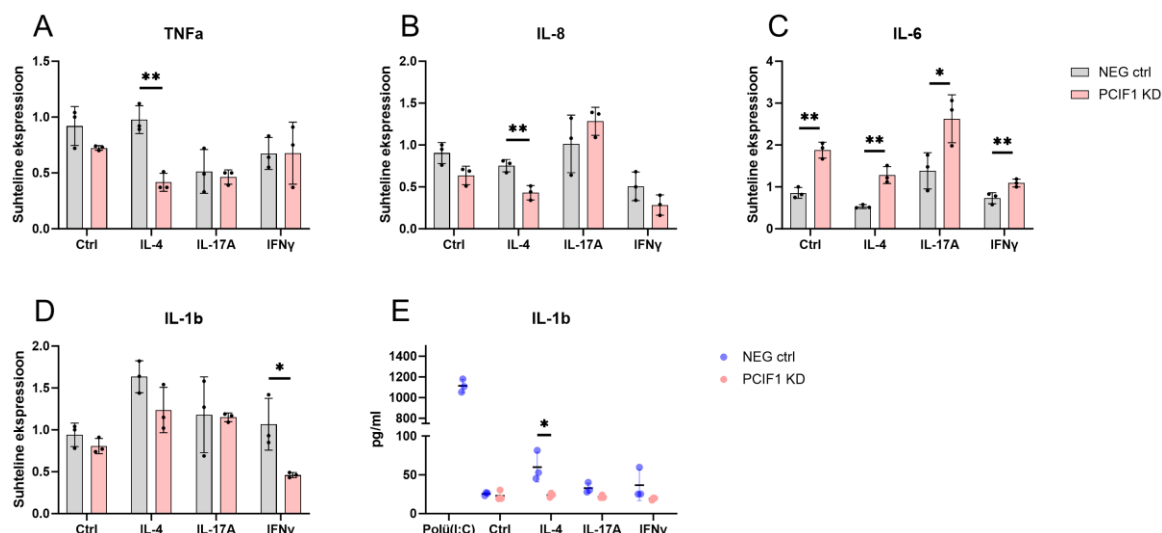
Järgmise etapina vaadati, kas on erinevusi JAK-STAT signaaliraja inhibiitorvalkude SOCS ekspressioonis. Selleks uuriti SOCS1–3 (Joonis 7) mRNA suhtelist ekspressiooni kasutades RT-qPCR analüüsi. SOCS1 puhul kõikides PCIF1 KD proovides on kõrgenenud suhteline ekspressioon (Joonis 7A). Kõrgenenud taset võib seletada sellega, et SOCS1 transkriptsioon on aktiveeritav STAT1 kaudu IFN $\gamma$  stimuleerimisel (Li, *et al.*, 2007). Kuna STAT1 suhtelise ekspressiooni tase oli kõrgenenud ja on võimalik, et valgu tase on samuti kõrgenenud, mistõttu SOCS1 suhteline ekspressioon tõuseb. SOCS2 suhteline ekspressioon on kõrgenenud PCIF1 KD rakkudes stimuleerimisel IFN $\gamma$ -ga (Joonis 7B). SOCS2 puhul tõenäoliselt esineb samuti erinevus PCIF1 KD rakkudes kontrolli puhul ja stimuleerimisel IL-4, IL-17A-ga, kuid on vaja täpsemaid mõõtmistulemusi.



**Joonis 7. JAK-STAT inhibiitorvalkude perekond SOCS mRNA suhteline ekspressioon on muudetud. A) SOCS1, B) SOCS2, C) SOCS3 mRNA suhteline ekspressioon. Analüüsimiseks kasutati kahe-suunalist Studenti t-testi, \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; märkimata on võrdväärne kui „pole statistiliselt oluline“.**

### 2.3.5. PCIF1 KD allareguleerib NF- $\kappa$ B signaalirada IL-4 stimuleerimise puhul

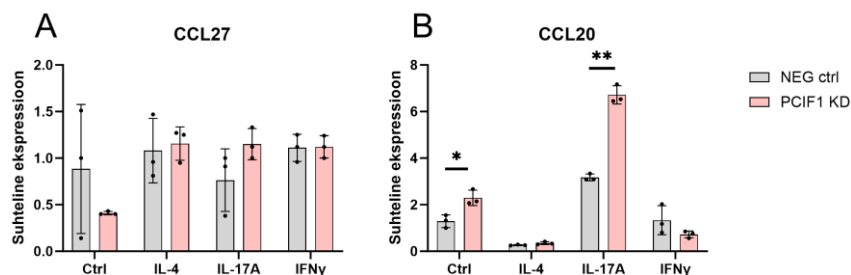
Vastuseks kindlale signaalile on keratinotsüüdid võimelised tootma nii kemokiine (vt 2.3.2.) kui ka tsütokiine, kaasa arvatud põletikku soodustavaid TNF $\alpha$ , IL-6, IL-8 ja IL-1b (Joonis 8). PCIF1 KD mõjutab rakulise vastuse IL-4 stimuleerimise puhul allareguleerides TNF $\alpha$  ja IL-8 tootmist (Joonis 8A, B). IL-6 ekspressioon on aga ülesreguleeritud kõikides vaadeldud tingimustes PCIF1 KD rakkudes (Joonis 8C). Põhjus võib seisneda selles, et IL-6 ei toodeta ainult läbi NF- $\kappa$ B rada, vaid ka läbi JAK-STAT signaalirada, mis ei ole iseloomulik teistele analüüsitud tsütokiinidele (Čokic, *et al.*, 2015). Kuigi me ei näinud IL-4 mõju IL-1b mRNA ekspressioonile, oli küpse IL-1b valgu tootmine madalam PCIF1 KD rakkudes (Joonis 8D, E). Funktsionaalse IL-1b tootmine erineb teistest tsütokiinidest selle poolest, et esialgul sünteesitakse IL-1b prekursor ja alles pärast prekursori töötlemise kaspas-1-ga (aktiveeritav inflammasoomiga) poolt moodustub küps IL-1b (Thornberry, *et al.*, 1992; Martinon, *et al.*, 2002). IL-1b mRNA taseme analüüs ei ole ilmtingimata sobilik antud olukorras ning valgu kontsentratsiooni mõõtmine annab tõenäolisema ja usaldusväärsema tulemuse.



**Joonis 8. Läbi NF-κB signaaliraja toodetavate tsütokiinide suhteline ekspressioon WT ja PCIF1 KD NHEK rakkudes. A) TNFα, B) IL-8, C) IL-6 ja D) IL-1b mRNA suhtelised ekspressioonid. E) IL-1b valgu tase, kus polü(I:C) töötlust kasutati positiivse kontrollina. Analüüsimiseks kasutati kahe-suunalist Studenti t-testi, \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; märkimata on võrdväärne kui „pole statistiliselt oluline“.**

### 2.3.6. PCIF1 KD tõstab Th17- ja Treg-rakkude (regulaatorne T-rakk) nahka inkorporeerivat tsütokiini CCL20 ekspressiooni

Lõpuks soovisime vaadata ka mõningaid psoriaasi biomarkereid. Selleks valisime CCL20 ja CCL27, kuna antud kemokiinid on kemoatraktandid T-rakkudele (Joonis 9). Kemokiini CCL20 toodavad tüüpiliselt makrofaagid ja Th17-rakud ning see on võimeline meelitama Treg ja Th17-rakke ning on aktiivselt ekspresseeritud psoriaasi puhul (Tan, *et al.*, 2022; Yamazaki, *et al.*, 2008; He, *et al.*, 2021). CCL27 roll seisneb CCR10 (kemokiini retseptor 10) T-rakkude (näiteks Th22-rakk) lokaliseerimisel nahas ning on psoriaasi puhul allasurutud (Davila, *et al.*, 2022; Gudjonsson, *et al.*, 2010). Antud andmete põhjal ei täheldatud muutusi CCL27 puhul (Joonis 9A), kuid erinevus seisnes CCL20 kemokiini mRNA ekspressiooni tasemes (Joonis 9B). Antud töö raames leiti, et PCIF1 KD puhul stimuleerimata ja IL-17A-stimuleeritud rakkudes on kõrgem CCL20 transkriptsioon, mis võib viidata kõrgele Th17- ja Treg-rakkude inkorporatsioonile m<sup>6</sup>Am-vaeses nahas.



**Joonis 9. Psoriaasiga seotud kemokiinide CCL20 ja CCL27 suhtelised ekspressioonid. A) CCL27, B) CCL20 mRNA suhteline ekspressioon. Analüüsimiseks kasutati kahesuunalist Studenti t-testi, \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; märkimata on võrdväärne kui „pole statistiliselt oluline“.**

## 2.4. Arutelu

Antud bakalaureusetöö eesmärk oli uurida mRNA modifikatsiooni  $m^6A$  osalust rakulise vastuse regulatsioonis NHEK rakkudes, et edaspidi saaks seostada antud modifikatsiooni olulisust signaaliradades järgnevas töödes, mis on suunatud uurimaks  $m^6A$  tähtsust nahahaigustes. Selleks, et uurida modifikatsiooni olulisust, teostati ainsa  $m^6A$  modifikatsiooni katalüüsija, PCIF1, KD ja stimuleeriti NHEK rakke 24 tundi, et kutsuda esile rakuline vastus reageerimaks kindlatele tsütokiinidele. Tsütokiinide valik seisnes nende rolli põhjal sellistes nahahaigustes nagu AD ja psoriaas. IL-17A, põletikuvastane tsütokiin, on tugevalt ekspresseeritav psoriaasis ning IL-4, põletikuvastane tsütokiin, on omakorda seotud atoopilise dermatiidiga ja IFN $\gamma$  on üleekspressioneeritud mõlema haiguse puhul.

Täheldati CXCL10, CCL5 (Joonis 5B–D) ja IFITM1 (Joonis 6G) tugevat mRNA üleekspressiooni  $m^6A$  modifikatsiooni puudumisel. Antud geenid on reguleeritud läbi JAK-STAT signaaliraja, mis viitab  $m^6A$  potentsiaalse olulisusele antud rajas (Joonis 2). Et täpsemalt teada saada, kas mainitud rada on mõjutatud, uuriti täpsemalt JAK-STAT signaaliraja valke (Joonis 6A–F). Mõndade geenide ekspressioon oli kõrgenenud, mistõttu saadi toetust hüpoteesile modifikatsiooni  $m^6A$  olulisusest IFN signaaliraja reguleerimisel. Kuna aga JAK-STAT signaali edasikandumine toimub läbi JAK valkude kinaasse aktiivsuse, on vaja lähemalt uurida JAK-ide ja STAT-ide fosforüleeritust, et teha kindlaks, mis etappides  $m^6A$  mängib olulist rolli. Lisaks sellele võeti arvesse ka inhibitoorseid valke. Kuna  $m^6A$  olulisus seisneb mRNA stabiilsuse tõstmiseks, siis selle puudumisel võib inhibitoorse valgu mRNA olla allareguleeritud ja seetõttu ülesreguleeritud signaalvalgud JAK-STAT rajas. Kuigi vaadeldi SOCS valke, mis inhibeerivad JAK-ide kinaasset aktiivsust, ei leitud suurt efekti nende ekspressioonile PCIF1 KD puhul. Siinkohal on samuti vaja täpsemalt uurida ka teiste SOCS-valgu perekondade ekspressiooni taset. Töös pole uuritud lähemalt  $m^6A$  puudumise võimalikku rolli PIAS (aktiveeritud STAT-i valguline inhibiitor) valkudele, mis on aktiveeritud

STAT-ide inhibiitorid ning takistavad nende transkriptsiooni aktiveerivat efekti (Niu, *et al.*, 2018). Kuigi nähti selget m<sup>6</sup>Am efekti IFN signaaliraja regulatsioonile, on vaja lähemalt uurida modifikatsiooni molekulaarsete mehhanismide efekti antud rajas.

Täheldati ka põletikku soodustavate tsütokiinide allareguleeritust IL-4 stimuleerimisel PCIF1 KD NHEK rakkudes (Joonis 8A, B, E). Kas on võimalik, et m<sup>6</sup>Am mõjutab IL-4 vastuse rada? Et vastata antud küsimusele, on vaja teostada edasisi uuringuid. Vaatamata sellele võimaldavad andmed seostada modifikatsiooni m<sup>6</sup>Am ja IL-4 signaliseerimist ning läbi selle ka ühendada AD-ga, kus IL-4 on tuntud kui tsütokiin, mis omab selle haiguse patogeneesis olulist rolli.

Psoriaasi korral on aktiivne IL-17A signaalirada ning psoriaasi patsientide lööbelises nahas on CCL20 kõrgeks ekspresseeritud (He, *et al.*, 2021). Vähem tuntud on CCL20, mis meelitab immuunrakke põletiku keskmesse. PCIF1 KD puhul täheldati CCL20 ülesreguleeritust IL-17A-stimuleeritud NHEK rakkudes (Joonis 9B). Seega, võib m<sup>6</sup>Am omada põletikuvastast toimet psoriaasis, kuna selle puudumisel IFN ja IL-17A signaaliraja geenid olid kõrgema ekspressiooniga.

Kokkuvõttes näitavad töö tulemused, et m<sup>6</sup>Am võib olla oluline mRNA modifikatsioon, mis võib mõjutada psoriaasi ja AD-ga seotud põletikulisi protsesse nahas. Edaspidi oleks vaja läbi viia m<sup>6</sup>Am-iga modifitseeritud transkriptidele RNA sekveneerimine, mis võimaldaks teha kindlaks, mis geenide mRNA-d m<sup>6</sup>Am modifikatsiooni poolt mõjutatud psoriaasi ja AD korral, ning hinnata geenide tähtsust immuunsüsteemi signaaliradades.

## Kokkuvõte

mRNA modifikatsioon  $m^6Am$  on tähtis mRNA stabiilsuse ja seeläbi translatsiooni tõhususe tõstmisel (Akichika, et al., 2019). Modifikatsiooni katalüüsib PCIF1 ning eemaldab FTO (Li, et al., 2023; Mauer, et al., 2017). Hetkeseisuga pole teada  $m^6Am$  mõju atoopilise dermatiidi ja psoriaasi tekkele.

Käesoleva töö eesmärk oli tuvastada, kas ja kuidas modifikatsioon  $m^6Am$  mõjutab rakulise vastuse signaaliradade geenide transkriptsiooni ja valgu taset. Selleks teostati PCIF1 vaigistamist (KD) NHEK rakkudes ja stimuleeriti neid tsütokiinidega IFN $\gamma$ , IL-4 ja IL-17A, mis on olulised nahahaigustes AD (omane IFN $\gamma$  ja IL-4 üleekspressioon) ja psoriaas (omane IFN $\gamma$  ja IL-17A üleekspressioon). Esimesena uuriti keratinotsüütidele omaste kemokiinide ja tsütokiinide tootmist. Seejärel analüüsiti nende tootmise eest vastutavate signaaliradade, NF- $\kappa$ B ja JAK-STAT, aktiveeritust. Hiljemalt vaadeldi JAK-STAT inhibiitorvalkude perekonna SOCS ekspresseeritust. Viimaks analüüsiti kemokiinide CCL20 ja CCL27, mis on kõrgelt ekspresseerunud psoriaasis, tootmist PCIF1 KD puhul.

Pärast PCIF1 KD eduka saavutamist uuriti  $m^6Am$ -seotud geenide FTO ja CMTR1 avaldumist. Mõlemad geenid olid vähesel määral ülesreguleeritud. Analüüsides keratinotsüütide poolt sünteesitavaid signaalmolekule, leiti, et IFN signaaliraja kemokiinid CXCL10 ja CCL5 olid tugevalt üleekspreseerunud PCIF1 puudumisel. Seepärast uuriti IFN vastust reguleeriva JAK-STAT signaaliraja liikmeid ning leiti kõrgenenud STAT1, JAK2, IRF9 ja signaalirajast allavoolu jääva geeni IFITM1 avaldumist. See viitab üldise JAK-STAT signaaliraja hüperaktiveerumisele. JAK-STAT signaaliraja inhibiitorite perekonna: SOCS-valkude, mRNA ekspressioon oli samuti kõrgenenud mõndades vaadeldud tingimustes PCIF1 puudumisel. Põletikku soodustavate tsütokiinide, mis on reguleeritud läbi NF- $\kappa$ B signaaliraja, nimelt TNF $\alpha$ , IL-8 ja IL-1b, ekspressioonitasemed olid allareguleeritud PCIF1 KD IL-4-stimuleeritud NHEK rakkudes. IL-6 puhul leiti ülesregulatsiooni nii stimuleerimata kui ka stimuleeritud PCIF1 KD rakkudes, kuna see tsütokiin on reguleeritav nii läbi NF- $\kappa$ B kui ka JAK-STAT signaaliraja. Samuti oli märkimisväärselt kõrgenenud psoriaasi biomarkeri CCL20 tootmine vastusena IL-17A stimuleerimisele PCIF1 puudumisel, mis võib viidata  $m^6Am$  potentsiaalsele rollile psoriaasi tekkes.

Antud bakalaureusetöö raames näidati RNA modifikatsiooni  $m^6Am$  võimaliku olulisust rakulisele vastusele keratinotsüütides. Pakuti välja ka selle potentsiaalset osalust psoriaasi ja AD tekkes. Vaatamata sellele on vaja läbi viia edasisi põhjalikke uuringuid, et täpsemini välja selgitada  $m^6Am$  mõju AD ja psoriaasi molekulaarsetele mehhanismidele.

# Resümee

## RNA modification m<sup>6</sup>Am role in cellular response regulation in keratinocytes

Martin Kirpu

### SUMMARY

mRNA modification m<sup>6</sup>Am is responsible for enhanced stability and increased translational efficiency of the molecule (Akichika, *et al.*, 2019). Modification is catalyzed by PCIF1 and it is removed by FTO (Li, *et al.*, 2023; Mauer, *et al.*, 2017). The importance of m<sup>6</sup>Am for the development of immune-mediated skin diseases such as atopic dermatitis and psoriasis remains unstudied.

Aim of the current thesis is to identify, whether and how mRNA modification m<sup>6</sup>Am influences transcription and translation levels of the genes involved in the regulation of cellular response signaling pathways. m<sup>6</sup>Am effect was studied through the depletion of m<sup>6</sup>Am writer PCIF1 in NHEK cells, stimulated with cytokines IFN $\gamma$ , IL-4, and IL-17A, which are important in AD (which has upregulated levels of IFN $\gamma$  and IL-4) and psoriasis (which has upregulated levels of IFN $\gamma$  and IL-17A). The production of chemokines and cytokines in PCIF1 KD cells was assessed, followed by the investigation of signaling pathways involved in their production, namely NF- $\kappa$ B and JAK-STAT pathways. Additionally, we analyzed the expression levels of SOCS protein family of JAK-STAT pathway inhibitors. Lastly, we looked into whether or not CCL20 and CCL27, highly expressed in psoriasis, were affected by PCIF1 KD.

After the successful KD of PCIF1 we investigated expression of m<sup>6</sup>Am-related genes FTO and CMTR1. Both genes were slightly upregulated. We analyzed production of signal molecules by keratinocytes and observed highly increased expression of CXCL10 and CCL5 in absence of PCIF1. Since both of these genes are regulated via IFN signaling pathway we looked into members of JAK-STAT family that affect IFN signaling pathway and found an elevated expression of STAT1, JAK2, and IRF9 as well as downstream-activated gene of this pathway: IFITM1. This data hints on hyperactivation of JAK-STAT signaling pathway. JAK-STAT inhibitory family of SOCS proteins mRNA expression was also increased in some of the conditions in absence of PCIF1. Pro-inflammatory cytokines, regulated through NF- $\kappa$ B, such as TNF $\alpha$ , IL-8, and IL-1b, were downregulated during PCIF1 KD in IL-4 stimulated NHEK cells. Additionally, we observed increased expression of IL-6 in non-stimulated and stimulated cells. Also we saw upregulation of psoriasis-associated CCL20 in response to IL-17A stimulation in absence of PCIF1, which can hint on potential role of m<sup>6</sup>Am in psoriasis pathogenesis.

The current thesis showed importance of m<sup>6</sup>Am in cellular response in keratinocytes and suggested its potential role of m<sup>6</sup>Am in psoriasis and AD development. Despite this, further investigations are needed to precisely determine the importance of this modification in the molecular mechanisms of AD and psoriasis.

## **Tänuõnad**

Soovin avaldada suurimad tänuõnad oma juhendajale Pavel Kudrinile juhendamise, abivalmiduse ja kannatlikkuse eest kahe aasta vältel.

Täna professor Ana Rebast ning ülejäänud bio- ja siirdemeditsiini instituudi RNA bioloogia uurimisrühma toetuse ja abivalmiduse eest.

Lõpetuseks tänan Agnes Vahti keelenõuande ja toetuse eest.

## Kasutatud kirjandus

- Abou El Hassan, M., Huang, K., Eswara, M. B. K., ... Bremner, R. (2017). Properties of STAT1 and IRF1 enhancers and the influence of SNPs. *BMC Molecular Biology*. 18: artikkel 6. <https://doi.org/10.1186/s12867-017-0084-1>.
- Akichika, S., Hirano, S., Shichino, Y., ... Suzuki, T. (2019). Cap-specific terminal N6-methylation of RNA by an RNA polymerase II-associated methyltransferase. *Science*. 363: artikkel 6423. <https://doi.org/10.1126/science.aav0080>.
- Batista, P. J., Benoit M., Jinkai W., ... Chang, H. Y. (2014). m6A RNA Modification Controls Cell Fate Transition in Mammalian Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell*. 15: 707–719. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.09.019>.
- Bawankar, P., Lence, T., Paolantoni, C., ... Roignant, J.-Y. (2021). Hakai Is Required for Stabilization of Core Components of the m6A mRNA Methylation Machinery. *Nature Communications*. 12: artikkel 3778. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23892-5>.
- Bélanger, F., Stepinski, J., Darzynkiewicz, E., Pelletier, J. (2010). Characterization of hMTr1, a Human Cap1 2'-O-Ribose Methyltransferase \*. *Journal of Biological Chemistry*. 285: 33037–33044. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.155283>.
- Bellucci, R., Martin, A., Bommarito, D., Wang, K., Hansen, S. H., Freeman, G. J., Ritz J. (2015). Interferon- $\gamma$ -induced activation of JAK1 and JAK2 suppresses tumor cell susceptibility to NK cells through upregulation of PD-L1 expression. *Oncoimmunology*. 4: artikkel e1008824. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2015.1008824>.
- Bokar, J. A., Shambaugh, M. E., Polayes, D., Matera, A. G., Rottman, F. M. (1997). Purification and cDNA Cloning of the AdoMet-Binding Subunit of the Human mRNA (N6-Adenosine)-Methyltransferase. *RNA*. 3: 1233–1247.
- Boza-Serrano, A., Yang, Y., Paulus, A., Deierborg, T. (2018). Innate Immune Alterations Are Elicited in Microglial Cells before Plaque Deposition in the Alzheimer's Disease Mouse Model 5xFAD. *Scientific Reports*. 8: artikkel 1550. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19699-y>.
- Bouma, G., Zamuner, S., Hicks, K., ... Tarzi, R. (2017). CCL20 neutralization by a monoclonal antibody in healthy subjects selectively inhibits recruitment of CCR6+ cells in an experimental suction blister. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 83: 1976–90. <https://doi.org/10.1111/bcp.13286>.
- Braathén, L. R., Thorsby, E. (1980). Studies on Human Epidermal Langerhans Cells. I. Allo-Activating and Antigen-Presenting Capacity. *Scandinavian Journal of Immunology*. 11: 401–408. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.1980.tb00006.x>.
- Byszewska, M., Śmietański, M., Purta, E., Bujnicki, J. M. (2015). RNA methyltransferases involved in 5' cap biosynthesis. *RNA Biology*. 11: 1597–1607. <https://doi.org/10.1080/15476286.2015.1004955>.
- Carreras-Badosa, G., Maslovskaja, J., Periyasamy, K., ... Rebane, A. (2020). NickFect type of cell-penetrating peptides present enhanced efficiency for microRNA-146a delivery into dendritic cells and during skin inflammation. *Biomaterials*. 262: artikkel 120316. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.120316>.
- Chen, H., Gu, L., Orellana, E. A., ... Yang, S. (2020). METTL4 is an snRNA m6Am methyltransferase that regulates RNA splicing. *Cell Research*. 30: 544–547. <https://doi.org/10.1038/s41422-019-0270-4>.

- Chen, X., Zhang B., Zhao, Y., Liu, P., Zhou, Y. (2013). EF1 $\alpha$  Is a Suitable Housekeeping Gene for RT-qPCR Analysis during Osteogenic Differentiation of Mouse Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Acta Biochimica Polonica*. 60: 381–386.
- Cohn, W. E. (1960). Pseudouridine, a Carbon-Carbon Linked Ribonucleoside in Ribonucleic Acids: Isolation, Structure, and Chemical Characteristics. *The Journal of Biological Chemistry*. 235: 1488–1498.
- Čokić, V. P., Mitrović-Ajtić, O., Beleslin-Čokić, B. B., ... Raj, P. K. (2015). Proinflammatory Cytokine IL-6 and JAK-STAT Signaling Pathway in Myeloproliferative Neoplasms. *Mediators of Inflammation*. 2015: artikkel 453020. <https://doi.org/10.1155/2015/453020>.
- Csumita, M., Csermely, A., Horvath, A., Nagy, G., Monori, F., Göczi, L., Orbea, H.-A., Reith, W., Széles, L. (2020). Specific enhancer selection by IRF3, IRF5 and IRF9 is determined by ISRE half-sites, 5' and 3' flanking bases, collaborating transcription factors and the chromatin environment in a combinatorial fashion. *Nucleic Acids Research*. 48: 589–604. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1112>.
- Dahlin, A., Denny, J., Roden, D. M., ... Wu, A. C. (2015). CMTR1 Is Associated with Increased Asthma Exacerbations in Patients Taking Inhaled Corticosteroids. *Immunity, Inflammation and Disease*. 3: 350–359. <https://doi.org/10.1002/iid3.73>.
- Darnell, J. E., Kerr, I. M., Stark, G. R. (1994). Jak-STAT Pathways and Transcriptional Activation in Response to IFNs and Other Extracellular Signaling Proteins. *Science*. 264: 1415–1421. <https://doi.org/10.1126/science.8197455>.
- Davila, M. L., Xu, M., Huang, C., Gaddes, E. R., Winter, L., Cantorna, M. T., Wang, Y., Xiong, N. (2022). CCL27 is a crucial regulator of immune homeostasis of the skin and mucosal tissues. *iScience*. 25: artikkel 104426. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.104426>.
- Decker, T., Kovarik, P., Meinke, A. (1997). GAS Elements: A Few Nucleotides with a Major Impact on Cytokine-Induced Gene Expression. *Journal of Interferon & Cytokine Research*. 17: 121–134. <https://doi.org/10.1089/jir.1997.17.121>.
- Desrosiers, R., Friderici, K., Rottman, F. (1974). Identification of Methylated Nucleosides in Messenger RNA from Novikoff Hepatoma Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 71: 3971–3975. <https://doi.org/10.1073/pnas.71.10.3971>.
- Dominissini, D., Moshitch-Moshkovitz, S., Schwartz, S., ... Rechavi, G. (2012). Topology of the Human and Mouse m6A RNA Methylomes Revealed by m6A-Seq. *Nature*. 485: 201–206. <https://doi.org/10.1038/nature11112>.
- Endo, T. A., Masuhara, M., Yokouchi, M., ... Yoshimura, A. (1997). A New Protein Containing an SH2 Domain That Inhibits JAK Kinases. *Nature*. 387: 921–924. <https://doi.org/10.1038/43213>.
- Ernst, W. A., Thoma-Uszynski, S., Teitelbaum, R., ... Modlin, R. L. (2000). Granulysin, a T Cell Product, Kills Bacteria by Altering Membrane Permeability. *Journal of Immunology*. 165: 7102–7108. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.12.7102>.
- Fan, C., Ma, Y., Chen, S., Zhou, Q., Jiang, H., Zhang, J., Wu, F. (2021). Comprehensive Analysis of the Transcriptome-Wide m6A Methylation Modification Difference in Liver Fibrosis Mice by High-Throughput m6A Sequencing. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.767051>.
- Fan, H., Sakuraba, K., Komuro, A., Kato, S., Harada, F., Hirose, Y. (2003). PCIF1, a novel

- human WW domain-containing protein, interacts with the phosphorylated RNA polymerase II. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 301: 378–385. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)03015-2](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)03015-2).
- Fan, H.-Q., He, W., Xu, K.-F., Wang, Z.-X., Xu, X.-Y., Chen, H. (2015). FTO Inhibits Insulin Secretion and Promotes NF- $\kappa$ B Activation through Positively Regulating ROS Production in Pancreatic  $\beta$  cells. *PLOS ONE*. 10: artikel e0127705. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127705>.
- Fong, A., Sun, S.-C. (2002). Genetic Evidence for the Essential Role of  $\beta$ -Transducin Repeat-containing Protein in the Inducible Processing of NF- $\kappa$ B2/p100\*. *Journal of Biological Chemistry*. 277: 22111–22114. <https://doi.org/10.1074/jbc.C200151200>.
- Ford, L. P., Bagga, P. S., Wilusz, J. (1997). The Poly(A) Tail Inhibits the Assembly of a 3'-to-5' Exonuclease in an in Vitro RNA Stability System. *Molecular and Cellular Biology*. 17: 398–406. <https://doi.org/10.1128/mcb.17.1.398>.
- Franzoso, G., Carlson, L., Xing, L., Poljak, L., Shores, E. W., Brown, K. D., Leonard, A., Tran, T., Boyce, B. F., Siebenlist, U. (1997). Requirement for NF- $\kappa$ B in Osteoclast and B-Cell Development. *Genes & Development*. 11: 3482–3496. <https://doi.org/10.1101/gad.11.24.3482>.
- Fryknäs, M., Dhar, S., Öberg, F., ... Isaksson, A. (2007). STAT1 Signaling Is Associated with Acquired Crossresistance to Doxorubicin and Radiation in Myeloma Cell Lines. *International Journal of Cancer*. 120: 189–195. <https://doi.org/10.1002/ijc.22291>.
- Fu, X. Y. (1992). A Transcription Factor with SH2 and SH3 Domains Is Directly Activated by an Interferon Alpha-Induced Cytoplasmic Protein Tyrosine Kinase(s). *Cell*. 70: 323–335. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90106-m](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90106-m).
- Fu, X. Y., Schindler, C., Improtta, T., Aebersold, R., Darnell, J. E. (1992). The Proteins of ISGF-3, the Interferon Alpha-Induced Transcriptional Activator, Define a Gene Family Involved in Signal Transduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 89: 7840–7843. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.16.7840>.
- Fujii, Y., Shimizu, T., Kusumoto, M., Kyogoku, Y., Taniguchi, T., Hakoshima, T. (1999). Crystal Structure of an IRF-DNA Complex Reveals Novel DNA Recognition and Cooperative Binding to a Tandem Repeat of Core Sequences. *The EMBO Journal*. 18: 5028–5041. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.18.5028>.
- Furuichi, Y., Morgan, M., Muthukrishnan, S., Shatkin, A. J. (1975). Reovirus Messenger RNA Contains a Methylated, Blocked 5'-Terminal Structure: M-7G(5')Ppp(5')G-MpCp-. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 72: 362–366. <https://doi.org/10.1073/pnas.72.1.362>.
- Gao, S., Zhou, J., Hu, Z., ... Yu, R. (2022). Effects of the m6Am Methyltransferase PCIF1 on Cell Proliferation and Survival in Gliomas. *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease*. 1868: artikel 166498. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2022.166498>.
- Goh, Y. T., Koh, C. W. Q., Sim, D. H., Roca, X., Goh, W. S. S. (2020). METTL4 catalyzes m6Am methylation in U2 snRNA to regulate pre-mRNA splicing. *Nucleic Acids Research*. 48: 9250–9261. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa684>.
- Grewe, M., Gyufko, K., Schöpf, E., Krutmann, J. (1994). Lesional expression of interferon- $\gamma$  in atopic eczema. *The Lancet*. 343: 25–26. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(94\)90879-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(94)90879-6).
- Griffiths, C. E. M., Armstrong, A. W., Gudjonsson, J. E., Barker, J. N. W. N. (2021). Psoriasis.

- Lancet*. 397: 1301–1315. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32549-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32549-6).
- Grifo, J. A., Tahara, S. M., Morgan, M. A., Shatkin, A. J., Merrick, W. C. (1983). New Initiation Factor Activity Required for Globin mRNA Translation. *The Journal of Biological Chemistry*. 258: 5804–5810.
- Gudjonsson, J. E., Ding, J., Johnston, A., Tejasvi, T., Guzman, A. M., Nair, R. P., Voorhees, J. J., Abecasis, G. R., Elder, J. T. (2010). Assessment of the Psoriatic Transcriptome in a Large Sample: Additional Regulated Genes and Comparisons with *In Vitro* Models. *Journal of Investigative Dermatology*. 130: 1829–1840. <https://doi.org/10.1038/jid.2010.36>.
- Guttman-Yassky, E., Suárez-Fariñas, M., Chiricozzi, A., ... Krueger, J. G. (2009). Broad defects in epidermal cornification in atopic dermatitis identified through genomic analysis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 124: 1235-1244. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.031>.
- Haline-Vaz, T., Lima Silva, T. C. Zanchin, N. I. T. (2008). The human interferon-regulated ISG95 protein interacts with RNA polymerase II and shows methyltransferase activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 372: 719–724. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.05.137>.
- He, H., Bissonnette, R., Wu, J., ... Guttman-Yassky, E. (2021). Tape strips detect distinct immune and barrier profiles in atopic dermatitis and psoriasis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 147: 199–212. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2020.05.048>.
- Hilton, D. J., Richardson, R. T., Alexander, W. S., Viney, E. M., Willson, T. A., Sprigg, N. S., Starr, R., Nicholson, S. E., Metcalf, D., Nicola, N. C. (1998). Twenty proteins containing a C-terminal SOCS box form five structural classes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95: 114–119.
- Hiscott, J., Marois, J., Garoufalos, J., D'Addario, M., Roulston, A., Kwan, I., Pepin, N., Lacoste, J., Nguyen, H., Bensi, G. (1993). Characterization of a Functional NF-Kappa B Site in the Human Interleukin 1 Beta Promoter: Evidence for a Positive Autoregulatory Loop. *Molecular and Cellular Biology*. 13: 6231–6240. <https://doi.org/10.1128/mcb.13.10.6231>.
- Hou, J., Schindler, U., Henzel, W. J., Ho, T. C., Brasseur, M., McKnight, S. L. (1994). An Interleukin-4-Induced Transcription Factor: IL-4 Stat. *Science*. 265: 1701–1706. <https://doi.org/10.1126/science.8085155>.
- Hsu, P. J., Zhu, Y., Ma, H., ... He, C. (2017). Ythdc2 is an N6-methyladenosine binding protein that regulates mammalian spermatogenesis. *Cell Research*. 27: 1115–1127. <https://doi.org/10.1038/cr.2017.99>.
- Jia, G., Fu, Y., Zhao, X., ... He, C. (2011). N6-Methyladenosine in Nuclear RNA is a Major Substrate of the Obesity-Associated FTO. *Nature chemical biology*. 7: 885–887. <https://doi.org/10.1038/nchembio.687>.
- Karikó, K., Muramatsu, H., Welsh, F. A., Ludwig, J., Kato, H., Akira, S., Weissman, D. (2008). Incorporation of Pseudouridine Into mRNA Yields Superior Nonimmunogenic Vector With Increased Translational Capacity and Biological Stability. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 16: 1833–1840. <https://doi.org/10.1038/mt.2008.200>.
- Kennedy-Crispin, M., Billick, E., Mitsui, H., Gulati, N., Fujita, H., Gilleaudeau, P., Sullivan-Whalen, M., Johnson-Huang, L. M., Suárez-Fariñas, M., Krueger, J. G. (2012). Human

- Keratinocytes' Response to Injury Upregulates CCL20 and Other Genes Linking Innate and Adaptive Immunity. *Journal of Investigative Dermatology*. 132: 105–113. <https://doi.org/10.1038/jid.2011.262>.
- Khodarev, N. N., Minn, A. J., Efimova, E. V., Darga, T. E., Labay, E., Beckett, M., Mauceri, H. J., Roizman, B., Weichselbaum, R. R. (2007). Signal Transducer and Activator of Transcription 1 Regulates Both Cytotoxic and Prosurvival Functions in Tumor Cells. *Cancer Research*. 67: 9214–9220. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-1019>.
- Krolewski, J. J., Lee, R., Eddy, R., Shows, T. B., Dalla-Favera, R. (1990). Identification and Chromosomal Mapping of New Human Tyrosine Kinase Genes. *Oncogene*. 5: 277–282.
- Köck, A., Schwarz, T., Kirnbauer, R., Urbanski, A., Perry, P., Ansel, J. C., Luger, T. A. (1990). Human keratinocytes are a source for tumor necrosis factor alpha: evidence for synthesis and release upon stimulation with endotoxin or ultraviolet light. *Journal of Experimental Medicine*. 172: 1609–1614. <https://doi.org/10.1084/jem.172.6.1609>.
- Langan, S. M., Irvine, A. D., Weidinger, S. (2020). Atopic Dermatitis. *Lancet*. 396: 345–360. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31286-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31286-1).
- Lebre, M. C., van der Aar, A. M. G, van Baarsen, L., van Capel, T. M. M., Schuitemaker, J. H. N., Kapsenberg, M. L., de Jong, E. C. (2007). Human Keratinocytes Express Functional Toll-Like Receptor 3, 4, 5, and 9. *Journal of Investigative Dermatology*. 127: 331–341. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700530>.
- Leyva-Castillo, J. M., Hener, P., Jiang, H., Li, M. (2013). TSLP Produced by Keratinocytes Promotes Allergen Sensitization through Skin and Thereby Triggers Atopic March in Mice. *Journal of Investigative Dermatology*. 133: 154–163. <https://doi.org/10.1038/jid.2012.239>.
- Li, J., Yu, B., Song, L., Eschrich, S., Haura, E. B. (2007). Effects of IFN- $\gamma$  And Stat1 on Gene Expression, Growth, And Survival in Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *Journal of Interferon & Cytokine Research*. 27: 209–220. <https://doi.org/10.1089/jir.2006.0111>.
- Li, K., Chen, J., Zhang, C., ... Chen, D. (2023). The CTBP2-PCIF1 Complex Regulates m<sup>6</sup>Am Modification of mRNA in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *The Journal of Clinical Investigation*. 133: artikel e170173. <https://doi.org/10.1172/JCI170173>.
- Liang, S., Silva, J. C., Suska, O., Lukoszek, R., Almohammed, R., Cowling, V. H. (2022). CMTR1 is recruited to transcription start sites and promotes ribosomal protein and histone gene expression in embryonic stem cells. *Nucleic Acids Research*. 50: 2905–2922. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac122>.
- Lizzul, P. F., Aphale, A., Malaviya, R., Sun, Y., Masud, S., Dombrovskiy, V., Gottlieb, A. B. (2005). Differential Expression of Phosphorylated NF- $\kappa$ B/RelA in Normal and Psoriatic Epidermis and Downregulation of NF- $\kappa$ B in Response to Treatment with Etanercept. *Journal of Investigative Dermatology*. 124: 1275–1283. <https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2005.23735.x>.
- Liu, J., Yue, Y., Han, D., ... He, C. (2014). A METTL3-METTL14 complex mediates mammalian nuclear RNA N<sup>6</sup>-adenosine methylation. *Nature chemical biology*. 10: 93–95. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1432>.
- Liu, Q., Li, S., Yu, L., Yin, X, Liu, X., Ye, J., Lu, G. (2022). CCL5 Suppresses Klotho Expression via p-STAT3/DNA Methyltransferase1-Mediated Promoter Hypermethylation. *Frontiers in Physiology*. 13: artikel 856088. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.856088>.

- Macke, T. J., Ecker, D. J., Gutell, R. R., Gautheret, D., Case, D. A., Sampath, R. (2001). RNAMotif, an RNA Secondary Structure Definition and Search Algorithm. *Nucleic Acids Research*. 29: 4724–4735. <https://doi.org/10.1093/nar/29.22.4724>.
- Martinon, F., Burns, K., Tschopp, J. (2002). The Inflammasome: A Molecular Platform Triggering Activation of Inflammatory Caspases and Processing of proIL- $\beta$ . *Molecular Cell*. 10: 417–426. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00599-3](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00599-3).
- Mauer, J., Luo, X., Blanjoie, A., ... Jaffrey, S. R. (2017). Reversible methylation of m6Am in the 5' cap controls mRNA stability. *Nature*. 541: 371–375. <https://doi.org/10.1038/nature21022>.
- McBride, K. M., Banninger, G., McDonald, C., Reich, N. C. (2002). Regulated nuclear import of the STAT1 transcription factor by direct binding of importin- $\alpha$ . *The EMBO Journal*. 21: 1754–1763. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.7.1754>.
- McCracken, S., Fong, N., Rosonina, E., Yankulov, K., Brothers, G., Siderovski, D., Hessel, A., Foster, S., Shuman, S., Bentley, D. L. (1997). 5'-Capping Enzymes Are Targeted to Pre-mRNA by Binding to the Phosphorylated Carboxy-Terminal Domain of RNA Polymerase II. *Genes & Development*. 11: 3306–3318. <https://doi.org/10.1101/gad.11.24.3306>.
- Minamoto, S., Ikegame, K., Ueno, K., Narazaki, M., Naka, T., Yamamoto, H., Matsumoto, T., Saito, H., Hosoe, S., Kishimoto, T. (1997). Cloning and Functional Analysis of New Members of STAT Induced STAT Inhibitor (SSI) Family: SSI-2 and SSI-3. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 237: 79–83. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.7080>.
- Mui, A. L., Wakao, H., O'Farrell, A. M., Harada, N., Miyajima, A. (1995). Interleukin-3, granulocyte-macrophage colony stimulating factor and interleukin-5 transduce signals through two STAT5 homologs. *The EMBO Journal*. 14: 1166–1175.
- Naka, T., Narazaki, M., Hirata, M., ... Kishimoto, T. (1997). Structure and Function of a New STAT-Induced STAT Inhibitor. *Nature*. 387: 924–929. <https://doi.org/10.1038/43219>.
- Niu, G.-J., Xu, J.-D., Yuan, W.-J., Sun, J.-J., Yang, M.-C., He, Z.-H., Zhao, X.-F., Wang, J.-W. (2018). Protein Inhibitor of Activated STAT (PIAS) Negatively Regulates the JAK/STAT Pathway by Inhibiting STAT Phosphorylation and Translocation. *Frontiers in Immunology*. 9: artikkel 2392. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02392>.
- Nowicka, H., Sekrecka, A., Blaszczyk, K., Kluzek, K., Chang, C.-Y., Wesoly, J., Lee, C.-K., Bluysen, H. A. R. (2023). ISGF3 and STAT2/IRF9 Control Basal and IFN-Induced Transcription through Genome-Wide Binding of Phosphorylated and Unphosphorylated Complexes to Common ISRE-Containing ISGs. *International Journal of Molecular Sciences*. 24: artikkel 17635. <https://doi.org/10.3390/ijms242417635>.
- Osborn, L., Kunkel, S., Nabel, G. J. (1989). Tumor Necrosis Factor Alpha and Interleukin 1 Stimulate the Human Immunodeficiency Virus Enhancer by Activation of the Nuclear Factor Kappa B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 86: 2336–2340. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.7.2336>.
- Otero, L. J., Ashe, M. P., Sachs, A. B. (1999). The yeast poly(A)-binding protein Pab1p stimulates in vitro poly(A)-dependent and cap-dependent translation by distinct mechanisms. *The EMBO Journal*. 18: 3153–3163. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.11.3153>.

- Pabis, M., Neufeld, N., Steiner, M. C., Bojic, T., Shav-Tal, Y., Neugebauer, K. M. (2013). The nuclear cap-binding complex interacts with the U4/U6·U5 tri-snRNP and promotes spliceosome assembly in mammalian cells. *RNA*. 19: 1054–1063. <https://doi.org/10.1261/rna.037069.112>.
- Panzer, U., Zahner, G., Wienberg, U., Steinmetz, O. M., Peters, A., Turner, J.-E., Paust, H.-J., Wolf, G., Stahl, R. A. K., Schneider, A. (2008). 15-Deoxy- $\Delta$ 12,14-prostaglandin J2 inhibits INF- $\gamma$ -induced JAK/STAT1 signalling pathway activation and IP-10/CXCL10 expression in mesangial cells. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 23: 3776–3785. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfn361>.
- Perry, R. P., Kelley, D. E. (1974). Existence of methylated messenger RNA in mouse L cells. *Cell*. 1: 37–42. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(74\)90153-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(74)90153-6).
- Qiao, P., Guo, W., Ke, Y., ... Wang, G. (2019). Mechanical Stretch Exacerbates Psoriasis by Stimulating Keratinocyte Proliferation and Cytokine Production. *Journal of Investigative Dermatology*. 139: 1470–1479. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2018.12.019>.
- Qureshi, S. A., Salditt-Georgieff, M., Darnell, J. E. (1995). Tyrosine-Phosphorylated Stat1 and Stat2 plus a 48-kDa Protein All Contact DNA in Forming Interferon-Stimulated-Gene Factor 3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 92: 3829–3833. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.9.3829>.
- Rane, S. G., Reddy, E. P. (1994). JAK3: A Novel JAK Kinase Associated with Terminal Differentiation of Hematopoietic Cells. *Oncogene*. 9: 2415–2423.
- Raza, S., Robertson, K. A., Lacaze, P. A., Page, D., Enright, A. J., Ghazal, P., Freeman, T. C. (2008). A logic-based diagram of signalling pathways central to macrophage activation. *BMC Systems Biology*. 2: artikel 36. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-2-36>.
- Rebholz, B., Haase, I., Eckelt, B., ... Rupec, R. A. (2007). Crosstalk between Keratinocytes and Adaptive Immune Cells in an I $\kappa$ B $\alpha$  Protein-Mediated Inflammatory Disease of the Skin. *Immunity*. 27: 296–307. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.05.024>.
- Roost, C., Lynch, S. R., Batista, P. J., Qu, K., Chang, H. Y., Kool, E. T. (2015). Structure and Thermodynamics of N6-Methyladenosine in RNA: A Spring-Loaded Base Modification. *Journal of the American Chemical Society*. 137: 2107–2115. <https://doi.org/10.1021/ja513080v>.
- Roundtree, I. A., Evans, M. E., Pan, T., He, C. (2017). Dynamic RNA Modifications in Gene Expression Regulation. *Cell*. 169: 1187–1200. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.045>.
- Schwartz, S., Mumbach, M. R., Jovanovic, M., ... Regev, A. (2014). Perturbation of m6A writers reveals two distinct classes of mRNA methylation at internal and 5' sites. *Cell reports*. 8: 284–296. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.05.048>.
- Shakhov, A. N., Collart, M. A., Vassalli, P., Nedospasov, S. A., Jongeneel, C. V. (1990). Kappa B-Type Enhancers Are Involved in Lipopolysaccharide-Mediated Transcriptional Activation of the Tumor Necrosis Factor Alpha Gene in Primary Macrophages. *The Journal of Experimental Medicine*. 171: 35–47. <https://doi.org/10.1084/jem.171.1.35>.
- Shao, S., Tsoi, L. C., Sarkar, M. K., Gudjonsson, J. E. (2019). IFN- $\gamma$  enhances cell-mediated cytotoxicity against keratinocytes via JAK2/STAT1 in lichen planus. *Science translational medicine*. 11: artikel eaav7561. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aav7561>.
- Shi, H., Wang, X., Lu, Z., Zhao, B. S., Ma, H., Hsu, P. J., Liu, C., He, C. (2017). YTHDF3

- facilitates translation and decay of N<sup>6</sup>-methyladenosine-modified RNA. *Cell Research*. 27: 315–328. <https://doi.org/10.1038/cr.2017.15>.
- Shimoda, K., van Deursen, J., Sangster, M. Y., ... Ihle, J. N. (1996). Lack of IL-4-Induced Th2 Response and IgE Class Switching in Mice with Disrupted Stat6 Gene. *Nature*. 380: 630–633. <https://doi.org/10.1038/380630a0>.
- Shuai, K., Horvath, C. M., Huang, L. H. T., Qureshi, S. A., Cowburn, D., Darnell, J. E. (1994). Interferon activation of the transcription factor Stat91 involves dimerization through SH2-phosphotyrosyl peptide interactions. *Cell*. 76: 821–828. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90357-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90357-3).
- Shuai, K., Schindler, C., Prezioso, V. R., Darnell, J. E. (1992). Activation of Transcription by IFN- $\gamma$ : Tyrosine Phosphorylation of a 91-kD DNA Binding Protein. *Science*. 258: 1808–1812. <https://doi.org/10.1126/science.1281555>.
- Shuai, K., Stark, G. R., Kerr, I. M., Darnell, J. E. (1993). A Single Phosphotyrosine Residue of Stat91 Required for Gene Activation by Interferon- $\gamma$ . *Science*. 261: 1744–1746. <https://doi.org/10.1126/science.7690989>.
- Sica, A., Dorman, L., Viggiano, V., Cippitelli, M., Ghosh, P., Rice, N., Young, H. A. (1997). Interaction of NF- $\kappa$ B and NFAT with the Interferon- $\gamma$  Promoter \*. *Journal of Biological Chemistry*. 272: 30412–30420. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.48.30412>.
- Silva, C. M., Lu, H., Weber, M. J., Thorner, M. O. (1994). Differential Tyrosine Phosphorylation of JAK1, JAK2, and STAT1 by Growth Hormone and Interferon-Gamma in IM-9 Cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 269: 27532–27539.
- Sonenberg, N., Hinnebusch, A. G. (2007). New Modes of Translational Control in Development, Behavior, and Disease. *Molecular Cell*. 28: 721–729. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.11.018>.
- Starr, R., Willson, T. A., Viney, E. M., ... Hilton, D. J. (1997). A Family of Cytokine-Inducible Inhibitors of Signalling. *Nature*. 387: 917–921. <https://doi.org/10.1038/43206>.
- Steiger, M., Carr-Schmid, A., Schwartz, D. C., Kiledjian, M., Parker, R. (2003). Analysis of recombinant yeast decapping enzyme. *RNA*. 9: 231–238. <https://doi.org/10.1261/rna.2151403>.
- Stevens, A. (1980). Purification and Characterization of a *Saccharomyces Cerevisiae* Exoribonuclease Which Yields 5'-Mononucleotides by a 5' Leads to 3' Mode of Hydrolysis. *The Journal of Biological Chemistry*. 255: 3080–3085.
- Zenke, K., Muroi, M., Tanamoto, K.-I. (2018). IRF1 Supports DNA Binding of STAT1 by Promoting Its Phosphorylation. *Immunology and Cell Biology*. 96: 1095–1103. <https://doi.org/10.1111/imcb.12185>.
- Zhang, Q., Kang, Y., Wang, S., Gonzalez, G. M., Li, W., Hui, H., Wang, Y., Rana, T. M. (2021). HIV Reprograms Host m<sup>6</sup>Am RNA Methylome by Viral Vpr Protein-Mediated Degradation of PCIF1. *Nature Communications*. 12: artikel 5543. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25683-4>.
- Zhang, W., Foo, M., Eren, A. M., Pan, T. (2022). tRNA modification dynamics from individual organisms to metaepitranscriptomics of microbiomes. *Molecular cell*. 82: 891–906. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.12.007>.
- Zheng, G., Dahl, J. A., Niu, Y., ... He, C. (2013). ALKBH5 Is a Mammalian RNA Demethylase that Impacts RNA Metabolism and Mouse Fertility. *Molecular cell*. 49: 18–29. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.10.015>.

- Zhong, Z. , Wen, Z., Darnell, J. E. (1994). Stat3 and Stat4: members of the family of signal transducers and activators of transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 91: 4806–4810. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.11.4806>.
- Zhuo, W., Sun, M., Wang, K., ... Zhou, T. (2022). m6Am Methyltransferase PCIF1 Is Essential for Aggressiveness of Gastric Cancer Cells by Inhibiting TM9SF1 mRNA Translation. *Cell Discovery*. 8: 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41421-022-00395-1>.
- Takao, J., Yudate, T., Das, A., Shikano, S., Bonkobara, M., Ariizumi, K., Cruz, P.D. Jr. (2003). Expression of NF- $\kappa$ B in epidermis and the relationship between NF- $\kappa$ B activation and inhibition of keratinocyte growth. *British Journal of Dermatology*. 148: 680–688. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2133.2003.05285.x>.
- Takeda, K., Kamanaka, M., Tanaka, T., Kishimoto, T., Akira, S. (1996). Impaired IL-13-Mediated Functions of Macrophages in STAT6-Deficient Mice. *Journal of Immunology*. 157: 3220–3222.
- Tan, J., Xu, T., Gou, Y., Wang, H., Liang, Z., Cao, Y., Wang, H., Yu, Y., Jiao, N., Zhang, Z. (2022). CCL20/CCR6 axis mediates macrophages to promote proliferation and migration of ESCs by blocking autophagic flux in endometriosis. *Stem Cell Research & Therapy*. 13: artikkel 294. <https://doi.org/10.1186/s13287-022-02981-2>.
- Tartell, M. A., Boulias, K., Hoffmann, G. B., Bloyet, L.-M., Greer, E. L., Whelan, S. P. J. (2021). Methylation of Viral mRNA Cap Structures by PCIF1 Attenuates the Antiviral Activity of Interferon- $\beta$ . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 118: artikkel e2025769118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2025769118>.
- Thornberry, N. A., Bull, H. G., Calaycay, J. R., Chapman, K. T., Howard, A. D., Kostura, M. J., Miller, D. K., Molineaux, S. M., Weidner, J. R., Aunins, J. (1992). A Novel Heterodimeric Cysteine Protease Is Required for Interleukin-1 Beta Processing in Monocytes. *Nature*. 356: 768–774. <https://doi.org/10.1038/356768a0>.
- Tomita, K., Kabashima, A., Freeman, B. L., Bronk, S. F., Hirsova, P., Ibrahim, S. H. (2017). Mixed Lineage Kinase 3 Mediates the Induction of CXCL10 by a STAT1-Dependent Mechanism During Hepatocyte Lipotoxicity. *Journal of Cellular Biochemistry*. 118: 3249–3259. <https://doi.org/10.1002/jcb.25973>.
- van der Velden, A. W., Thomas, A. A. (1999). The Role of the 5' Untranslated Region of an mRNA in Translation Regulation during Development. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 31: 87–106. [https://doi.org/10.1016/s1357-2725\(98\)00134-4](https://doi.org/10.1016/s1357-2725(98)00134-4).
- Villa, N., Fraser, C. S. (2024). Human Eukaryotic Initiation Factor 4G Directly Binds the 40S Ribosomal Subunit to Promote Efficient Translation. *Journal of Biological Chemistry*. 300, artikkel 107242. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2024.107242>.
- Wang, J., Chew, B. L. A., Lai, Y., ... Dedon, P. C. (2019). Quantifying the RNA Cap Epitranscriptome Reveals Novel Caps in Cellular and Viral RNA. *Nucleic Acids Research*. 47: artikkel e130. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz751>.
- Wang, L., Wu, L., Zhu, Z., Zhang, Q., Li, W., Gonzalez, G. M., Wang, Y., Rana, T. M. (2023). Role of PCIF1-Mediated 5'-Cap N6-Methyladenosine mRNA Methylation in Colorectal Cancer and Anti-PD-1 Immunotherapy. *The EMBO Journal*. 42: artikkel e111673. <https://doi.org/10.15252/embj.2022111673>.
- Wang, X., Lu, Z., Gomez, A., ... He, C. (2014). m6A-dependent regulation of messenger RNA

- stability. *Nature*. 505: 117–120. <https://doi.org/10.1038/nature12730>.
- Wang, X., Zhao, B. S., Roundtree, I. A., Lu, Z., Han, D., Ma, H., Weng, X., Chen, K., Shi, H., He, C. (2015). N6-methyladenosine Modulates Messenger RNA Translation Efficiency. *Cell*. 161: 1388–1399. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.014>.
- Wang, X., Tian, L., Li, Y., Sun, Y. (2021). RBM15 facilitates laryngeal squamous cell carcinoma progression by regulating TMBIM6 stability through IGF2BP3 dependent. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 40: artikel 80. <https://doi.org/10.1186/s13046-021-01871-4>.
- Wei, C. M., Gershowitz, A., Moss, B. (1975). Methylated Nucleotides Block 5' Terminus of HeLa Cell Messenger RNA. *Cell*. 4: 379–386. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(75\)90158-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(75)90158-0).
- Wei, J., Liu, F., Lu, Z., He, C. (2018). Differential m6A, m6Am, and m1A Demethylation Mediated by FTO in Cell Nucleus and Cytoplasm. *Molecular cell*. 71: 973-985.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.08.011>.
- Weih, F., Carrasco, D., Durham, S. K., Barton, D. S., Rizzo, C. A., Ryseck, R. P., Lira, S. A., Bravo, R. (1995). Multiorgan Inflammation and Hematopoietic Abnormalities in Mice with a Targeted Disruption of RelB, a Member of the NF-Kappa B/Rel Family. *Cell*. 80: 331–340. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90416-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90416-6).
- Wen, J., Lv, R., Ma, H., ... Diao, J. (2018). Zc3h13 Regulates Nuclear RNA m6A Methylation and Mouse Embryonic Stem Cell Self-Renewal. *Molecular Cell*. 69: 1028-1038.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.02.015>.
- Wiedemann, G. M., Geary, C., Lau, C. M., Sun, J. C. (2020). STAT1-mediated epigenetic control of Rsad2 promotes clonal expansion of antiviral NK cells. *Journal of immunology*. 205: 21–25. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2000086>.
- Wilks, A. F., Harpur, A. G., Kurban, R. R., Ralph, S. J., Zürcher, G., Ziemiecki, A. (1991). Two Novel Protein-Tyrosine Kinases, Each with a Second Phosphotransferase-Related Catalytic Domain, Define a New Class of Protein Kinase. *Molecular and Cellular Biology*. 11: 2057–2065. <https://doi.org/10.1128/mcb.11.4.2057-2065.1991>.
- Williams, G. D., Gokhale, N. S., Snider, D. L., Horner, S. M. (2020). The mRNA Cap 2'-O-Methyltransferase CMTR1 Regulates the Expression of Certain Interferon-Stimulated Genes. *mSphere*. 5: artikel e00202-20. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00202-20>.
- Wu, Z., Neufeld, H., Torlakovic, E., Xiao, W. (2018). Uev1A-Ubc13 Promotes Colorectal Cancer Metastasis through Regulating CXCL1 Expression via NF-κB Activation. *Oncotarget*. 9: 15952–15967. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24640>.
- Xiao, G., Harhaj, E. W., Sun, S.-C. (2001). NF-κB-Inducing Kinase Regulates the Processing of NF-κB2 p100. *Molecular Cell*. 7: 401–409. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00187-3](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00187-3).
- Xiao, W., Adhikari, S., Dahal, U., ... Yang, Y.-G. (2016). Nuclear m(6)A Reader YTHDC1 Regulates mRNA Splicing. *Molecular Cell*. 61: 507–519. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.01.012>.
- Yamazaki, T., Yang, X. O., Chung, Y., ... Dong, C. (2008). CCR6 Regulates the Migration of Inflammatory and Regulatory T Cells. *The Journal of Immunology*. 181: 8391–8401. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.12.8391>.
- Yao, Z., Fanslow, W. C., Seldin, M. F., Rousseau, A. M., Painter, S. L., Comeau, M. R., Cohen, J. I., Spriggs, M. K. (1995). Herpesvirus Saimiri Encodes a New Cytokine, IL-17,

- Which Binds to a Novel Cytokine Receptor. *Immunity*. 3: 811–821. [https://doi.org/10.1016/1074-7613\(95\)90070-5](https://doi.org/10.1016/1074-7613(95)90070-5).
- Yeo, H., Lee, Y. H., Koh, D., Lim, Y., Shin, S. Y. (2020). Chrysin Inhibits NF- $\kappa$ B-Dependent CCL5 Transcription by Targeting I $\kappa$ B Kinase in the Atopic Dermatitis-Like Inflammatory Microenvironment. *International Journal of Molecular Sciences*. 21: artikkel 7348. <https://doi.org/10.3390/ijms21197348>.
- Yoshimura, A., Ohkubo, T., Kiguchi, T., Jenkins, N. A., Gilbert, D. J., Copeland, N. G., Hara, T., Miyajima, A. (1995). A novel cytokine-inducible gene CIS encodes an SH2-containing protein that binds to tyrosine-phosphorylated interleukin 3 and erythropoietin receptors. *The EMBO Journal*. 14: 2816–2826.
- Yu, D., Dai, N., Wolf, E. J., Corrêa, I. R., Zhou, J., Wu, T., Blumenthal, R. M., Zhang, X., Cheng, X. (2022). Enzymatic characterization of mRNA cap adenosine-N6 methyltransferase PCIF1 activity on uncapped RNAs. *The Journal of Biological Chemistry*. 298: artikkel 101751. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.101751>.
- Yu, D., Kaur, G., Blumenthal, R. M., Zhang, X., Cheng, X. (2021). Enzymatic characterization of three human RNA adenosine methyltransferases reveals diverse substrate affinities and reaction optima. *The Journal of Biological Chemistry*. 296: artikkel 100270. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100270>.
- Yue, Y., Liu, J., He, C. (2015). RNA N6-Methyladenosine Methylation in Post-Transcriptional Gene Expression Regulation. *Genes & Development*. 29: 1343–1355. <https://doi.org/10.1101/gad.262766.115>.
- Yue, Y., Liu, J., Cui, X., ... Liu, J. (2018). VIRMA Mediates Preferential m6A mRNA Methylation in 3'UTR and near Stop Codon and Associates with Alternative Polyadenylation. *Cell Discovery*. 4: 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41421-018-0019-0>.

## VEEBISAIDID

Modomics: *Modified residues*. (i.a). Kasutatud 07.05.2024, <https://genesilico.pl/modomics/modifications>

BioRender. Kasutatud 21.05.2024, <https://www.biorender.com/>

MyAssays. Kasutatud 21.05.2024, <https://www.myassays.com/>

## Lisad

**LISA 1.** Tabel bakalureusetöö käigus kasutatud praimerite loetelust ning nende pärisuunalised ja vastassuunalised järjestused (TAG Copenhagen).

Geen	Pärisuunaline järjestus	Vastassuunaline järjestus
<b>CCL20</b>	5'-CGGCGAATCAGAAGCAAGCAA-3'	5'-GCATTGATGTCACAGCCTTCAT-3'
<b>CCL27</b>	5'-GCATTCTACTGCCACCCAG-3'	5'-TTGAGCCAGGTGAAGCACGA-3'
<b>CCL5</b>	5'-AGTCGTCTTTGTACCCGAAA-3'	5'-TCTCCATCCTAGCTCATCTCCAA-3'
<b>CMTR1</b>	5'-GGGCCTTGGAATGACTTTGA-3'	5'-GCGGGTGATATCTTCATCTC-3'
<b>CXCL1</b>	5'-TTGCCTCAATCCTGCATCCC-3'	5'-GGTCAGTTGGATTTGTCACTGT-3'
<b>CXCL10</b>	5'-AAGCAGTTAGCAAGGAAAGGTCTA-3'	5'-GCCTCTGTGTGGTCCATCC-3'
<b>eEF1A</b>	5'-CCACCTTTGGGTGCTTTGCTGT-3'	5'-TGCCAGCTCCAGCAGCCTTCTT-3'
<b>FTO</b>	5'-CTGACCCCCAAAGATGATGA-3'	5'-CATGCTTGTGCAGTGTGAGA-3'
<b>IFITM1</b>	5'-CAACACCCTCTTCTTGAAGTGG-3'	5'-GCCGAATACCAGTAACAGGATG-3'
<b>IL-1b</b>	5'-AGAAGTACCTGAGCTCGCCA-3'	5'-TGGAAGGAGGACTTCATCTGT-3'
<b>IL-6</b>	5'-AGTCCTGATCCAGTTCCTGC-3'	5'-CTGGCATTGTGGTTGGGTC-3'
<b>IL-8</b>	5'-GCAGCTCTGTGTGAAGGTGCAGTT-3'	5'-TTCTGTGTTGGCGCAGTGTGGTC-3'
<b>IRF1</b>	5'-CAACTTCCAGGTGTCACCCA-3'	5'-CGACTGCTCCAAGAGCTTCA-3'
<b>IRF9</b>	5'-ACAGTGAAGATGGAGCAGGC-3'	5'-AGGTGAGGTGGAAGATGGGT-3'
<b>JAK2</b>	5'-GGAGTATGTGTCTGTGGAGACG-3'	5'-CCATGCCAACTGTTTAGCAA-3'
<b>PCIF1</b>	5'-TCAAGCTTGGTGGAAACTCC-3'	5'-CTGTGGGTGTCAGTGGGATT-3'
<b>SOCS1</b>	5'-CCCTGGTTGTTGTAGCAGCTT-3'	5'-CAACCCCTGGTTTGTGCAA-3'
<b>SOCS2</b>	5'-GCTCGGTCAGACAGGATGGTA-3'	5'-CAAGAAAGTTCCTTCTGGTGCC-3'
<b>SOCS3</b>	5'-CCTCAGCATCTCTGTGGAAGA-3'	5'-GCATCGTACTGGTCCAGGAACT-3'
<b>STAT1</b>	5'-TCAAAATTCCTGGAGCAGGT-3'	5'-GAGGTCATGAAAACGGATGG-3'
<b>STAT3</b>	5'-GATGCTGGAGGAGAGAATCG-3'	5'-GCCGGTCTTGATGACGAG-3'
<b>STAT6</b>	5'-AGTCCTGAGAACCCTCGTCA-3'	5'-AGCCTGGAACCTGGTCTGAG-3'
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	5'-GCTGCACTTGGAGTGATCG-3'	5'-TCACTCGGGTTCGAGAAGA-3'
<b>TYK2</b>	5'-ATCAGACAGCACAGGGGATG-3'	5'-TGCCACGTCATTCACAAACT-3'

# Lihtlitsents

Mina, Martin Kirpu,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „RNA modifikatsiooni m<sup>6</sup>A roll inimese keratinotsüütide rakulise vastuse reguleerimisel“,

mille juhendajad on Pavel Kudrin ja Margus Leppik,

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.

Martin Kirpu

27.05.2024