

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

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

Anet Kivihall

**miR-146a/b roll rakulise viirusvastuse moduleerimisel inimese primaarsetes
bronhiepiteeli rakkudes rinoviirusinfektsiooni korral**

Magistritöö (30 EAP)

Juhendajad PhD Ana Rebane
PhD Viljar Jaks

TARTU 2017

miR-146a/b roll rakulise viirusvastuse moduleerimisel inimese primaarsetes bronhiepiteeli rakkudes rinoviirusinfektsiooni korral

Astma on hingamisteede krooniline põletikuline haigus ning selle ägenemine on tihti seotud rinoviirusinfektsioonidega. Rinoviirused on RNA viirused, mis nakatavad nii inimese ülemisi kui alumisi hingamisteid ning tekitavad külmetushaiguseid. Primaarsete bronhiaalsete epiteelrakkude puhul aktiveerivad rinoviirused nii NF- κ B kui interferoonide vahendatud signaalrajad ning põhjustavad põletiku teket.

mikroRNA-d (miRNA-d) on posttranskriptsioonilised geeniekspressiooni regulaatorid, mis on võimelised mõjutama paljusid bioloogilisi protsesse, kaasa arvatud põletikku. Näiteks on teada, et miR-146a ja miR-146b (miR-146a/b) leevendavad põletikku inhibeerides mitmete NF- κ B signaaliraja geenide avaldumist. miRNA-de rolli allergilistes haigustes on vähe uuritud ning seetõttu valisime antud magistritöö eesmärgiks uurida miR-146a/b ekspressiooni ning funktsioone inimese primaarsetes bronhiepiteeli rakkudes rinoviiruse infektsiooni ajal.

Märksõnad: Astma, rinoviirus, mikroRNA, inflammatsioon

CERCS: B500 Immunoloogia, seroloogia, transplantoloogia

B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

The role of miR-146a/b in the regulation of immune responses to Human Rhinoviruses in primary bronchial epithelial cells

Asthma is a chronic inflammatory disease of the airways and the exacerbations are often associated with human Rhinovirus infections. Rhinoviruses are RNA viruses, that infect both upper and lower airways and cause common colds. In primary bronchial epithelial cells rhinoviruses activate both the NF- κ B and interferon response and trigger strong and long-lasting inflammation.

microRNAs (miRNAs) are post-transcriptional gene expression regulators that are involved in the regulation of many biological processes, including inflammation. For example, it is known that miR-146a and miR-146b (miR-146a/b) are capable of suppression of multiple genes from the NF- κ B pathway and thereby has an anti-inflammatory function in multiple cell types. When it comes to allergic diseases, little is known about the role of miRNAs, and therefore, the aim of this study was to investigate the expression and functions of miR-146a/b during rhinovirus infections in primary human bronchial epithelial cells.

Keywords: Asthma, rhinovirus, microRNA, inflammation

CERCS: B500 Immunology, serology, transplantation

B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

SISUKORD

SISUKORD	3
KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	7
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	8
1.1. Astma.....	8
1.1.1. Astma molekulaarsed põhjused.....	8
1.1.2. Bronhiepiteel ja selle muutused astma korral.....	9
1.1.3. Astma ravi	10
1.2. Rinoviirus ja astma	12
1.2.1. Rinoviiruste klassifikatsioon	13
1.2.2. Rinoviiruse infektsioon	14
1.2.3. Rinoviiruse infektsiooni molekulaarsed mehhanismid	14
1.2.4. Rinoviiruse ravi astmahaigetel	15
1.3. mikroRNA-d ja nende biogenees	16
1.3.1. miR-146 perekond.....	18
1.3.2. miRNA teraapia.....	21
1.4. Rakku sisenevad peptiidid.....	22
2. EKSPERIMENTAALOSA	23
2.1. Töö eesmärgid	23
2.2. Materjal ja meetodika.....	23
2.2.1. Eksperimentides kasutatud rakud.....	23
2.2.2. Rinoviiruste tüved ja nende paljundamine	24
2.2.3. Rakkude stimuleerimine tsütokiinidega	25
2.2.4. Rakkude stimuleerimine rinoviirusega.....	26
2.2.5. Rakkude transfekteeerimine	26
2.2.6. RNA eraldamine.....	26
2.2.7. RT-qPCR mRNA ekspressiooni uurimiseks	27
2.2.8. RT-qPCR miRNA ekspressiooni uurimiseks	29
2.2.9. Läbivoolutsütomeetria.....	30
2.2.10. Statistiline analüüs.....	30

2.3.	Tulemused	31
2.3.1.	Proinflammatoorsed tsütokiinid mõjutavad miR-146a ja miR-146b ekspressiooni bronhiepiteeli rakkudes	31
2.3.2.	Tsütokiinid stimuleerivad miR-146a sihtmärkgeene ning RV poolt stimuleeritud geenide ekspressiooni bronhiepiteeli rakkudes	32
2.3.3.	Rinoviirus indutseerib mikroRNA-de ekspressiooni HBEC rakkudes	34
2.3.4.	RV mõjutab miR-146a/b märklaudgeenide ning NF- κ B ja JAK-STAT signaaliraja poolt aktiveeritavate geenide avaldumist.....	35
2.3.5.	PepFect14 on efektiivne meetod miRNA miimide transpordiks HBEC rakkudesse	37
2.3.6.	miR-146a reguleerib rinoviiruse indutseeritud geeniekspressiooni	38
2.4.	Arutelu ja järeldused	42
KOKKUVÕTE		45
SUMMARY		46
TÄNUAVALDUSED.....		48
KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU		49
KASUTATUD VEEBIAADRESSID		60
LIHTLITSENTS.....		61

KASUTATUD LÜHENDID

AGO	Argonaut valk (<i>Argonaute</i>)
BEGM	bronhiaalse epiteelraku kasvusööde (<i>bronchial epithelial cell growth medium</i>)
BPE	veise ajuripatsi ekstrakt (<i>bovine pituitary extract</i>)
CARD10	kaspaasi värbamise domeeni sisaldav valk 10 (<i>Caspase recruitment domain-containing protein 10</i>)
CCL5	kemokiin C-C motiiviga ligand (<i>C-C motif chemokine ligand 5</i>)
cDNA	komplementaarne DNA (<i>complementary DNA</i>)
CXCL	kemokiin C-X-C motiiviga ligand (<i>C-X-C motif chemokine ligand</i>)
DGCR8	DiGeorge sündroomi kriitilise regiooni geen 8; Pasha (<i>DiGeorge syndrome critical region gene 8</i>)
EF1A	elongatsioonifaktor-1 alfa (<i>eukaryotic translation elongation factor 1 alpha</i>)
eGFP	võimendatult roheliselt fluorestseeruv valk (<i>enhanced green fluorescent protein</i>)
eGFP-A16	eGFP-d ekspresseeriv rinoviirus A16
FcεRI	kõrge afiinsusega IgE retseptor (<i>high-affinity IgE receptor</i>)
FGF2	fibroblasti kasvufaktor 2 (<i>fibroblast growth factor 2</i>)
GA	gentamütsiin ja amfoteritsiin-B (<i>gentamicin and amphotericin-B</i>)
GW182	182kDa glütsiin-trüptofaan valk (<i>glycine-tryptophan protein of 182kDa</i>)
HBEC	inimese bronhiepiteeli rakk (<i>human bronchial epithelial cell</i>)
HBEGF	hepariini siduv epidermaalne kasvufaktor (<i>heparin-binding EGF-like growth factor</i>)
HC	hüdrokortisoon (<i>hydrocortisone</i>)
hEGF	inimese epidermaalne kasvufaktor (<i>human epidermal growth factor</i>)
RV	rinoviirus (<i>Rhinovirus</i>)
ICAM1	rakusisene adhesioonimolekul 1 (<i>intercellular adhesion molecule 1</i>)
IFN-γ	interferoon gamma (<i>interferon gamma</i>)
IgE	immunoglobuliin E (<i>immunoglobulin E</i>)
IκB	κB inhibiitor (<i>inhibitor of kappa B</i>)
IL	interleukiin (<i>interleukin</i>)
IRAK1	IL-1 retseptor vahendatud kinaas 1 (<i>interleukin-1 receptor associated kinase 1</i>)
JAK	Janus kinaas (<i>Janus kinase</i>)
LDL	madala tihedusega lipoproteiin (<i>low-density lipoprotein</i>)

LPA	lipoproteiin A
LPS	lipopolüsahhariid
MDA5	melanoomi diferentseerumisega assotsieerunud geen 5 (<i>melanoma differentiation-associated gene 5</i>)
miRNA	mikroRNA
MOI	nakatuskordsus (<i>multiplicity of infection</i>)
MUC5B	mutsiin 5B (<i>mucin 5B</i>)
MyD88	müeloidne diferentseerumiskfaktor 88 (<i>myeloid differentiation factor 88</i>)
NF-κB	tuumafaktor κB (<i>nuclear factor kappa B</i>)
nt	nukleotiid
PBS	fosfaadiga puhverdatud soolalahus (<i>phosphate buffered saline</i>)
pre-miRNA	prekursor mikro-RNA
pri-miRNA	primaarne mikro-RNA
Ran-GTP	guanosiintrifosfaati siduv RAS seoseline tuumavalk
RISC	RNA indutseeritud vaigistamiskompleks (<i>RNA-induced silencing complex</i>)
RT	pöördtranskriptaas (<i>reverse transcriptase</i>)
SEM	standardviga (<i>standard error of the mean</i>)
STAT	signaali transduktsiooni ja transkriptsiooni aktivaator (<i>signal transducer and activator of transcription</i>)
T _H 1	tüüp 1 helper-T-rakk (<i>T helper cell type-1</i>)
T _H 2	tüüp 2 helper-T-rakk (<i>T helper cell type-2</i>)
T _H 9	tüüp 9 helper-T-rakk (<i>T helper cell type-9</i>)
T _H 17	tüüp 17 helper-T-rakk (<i>T helper cell type-17</i>)
TLR	tollilaadne retseptor (<i>toll-like receptor</i>)
TNF-α	tuumor-nekroosi faktor alfa (<i>tumor necrosis factor alpha</i>)
TRAF6	TNF retseptori vahendatud faktor 6 (<i>TNF receptor-associated factor 6</i>)
Treg	regulatoorsed T-rakud (<i>regulatory T cells</i>)
UTR	transleerimata regioon (<i>untranslated region</i>)
VPg	genoomiga seotud viiruse valk (<i>viral protein genome-linked</i>)

SISSEJUHATUS

Astma on laialt levinud hingamisteede krooniline põletikuline haigus, mille teket seostatakse T-lümfotsüütide vahendatud ülemäärase immuunsüsteemi aktiveerimisega vastusena väliskeskkonna teguritele, sealhulgas allergeenidele. Astmat iseloomustavad vilisev hingamine, köhimine ja hingeldamine ning haiguse ägenemine arvatakse olevat sageli seotud rinoviirusinfektsioonidega (Locksley 2010). Rinoviirused on RNA viirused, mis nakatavad inimese hingamisteid ning põhjustavad külmetushaiguste teket (Jackson, Gern ja Lemanske Jr 2016). On teada, et astma haigetel nakatab rinoviirus bronhiepiteeli rakke (HBEC), kuid miks tekib astma ägenemine ja kuidas saaks seda ära hoida, on seni ebaselge.

mikroRNA-d (miRNA-d) on 21-23 nt pikkused üheaheelised mittekodeerivad RNA-d. miRNA-d on võimelised komplementaarse järjestuse abil seonduma erinevate sihtmärkgeenide mRNA-ga ja vaigistama nende ekspressiooni. Sellise transkriptsioonijärgse geeniekspressiooni reguleerimise kaudu mõjutavad mikroRNA-d ka organismi immuunsüsteemi ja põletikku kudedes (Rebane 2015). Varasemalt on näidatud, et miR-146 perekonda kuuluvad miR-146a ja miR-146b (miR-146a/b) on võimelised reguleerima NF- κ B signaalirada, mida aktiveerivad nii põletikud, infektsioonid kui allergiad (Taganov, et al. 2006) (Crone, et al. 2012).

Antud magistr töö eesmärgiks on uurida immuunregulatoorsete mikroRNA-de miR-146a ja miR-146b ekspressiooni ning funktsioone primaarsetes inimese bronhiepiteeli rakkudes, et välja selgitada, kas miR-146a/b reguleerivad viirusvastust ja sellega seotud põletikulisi protsesse rinoviirusnakkuse korral nendes rakkudes.

Käesolev magistr töö on kirjutatud Tartu Ülikooli geenitehnoloogia õppekava raames. Kõik töös läbiviidud eksperimentaalsed katsed teostati Tartu Ülikooli meditsiiniteaduste valdkonnas, biomeditsiini osakonnas, bio- ja siirdemeditsiini instituudis, RNA bioloogia uurimisgrupis.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Astma

Astmat ja teisi allergilisi haigusi peetakse tänapäeval kõige levinumateks kroonilisteks haigusteks – Maailma Terviseorganisatsiooni andmetel mõjutab astma lausa ~300 miljonit inimest maailmas (Okoye, et al. 2014) (Lambrecht ja Hammad 2015). Haigus tekib tavaliselt varases eas ning iseloomulikeks sümptomiteks on vilisev hingamine, köhimine ja hingeldamine. Need kõik tunnused on tingitud bronhide silelihaste spasmist ehk kokkutõmbumisest ja limaskestasturset ja limaerituse suurenemisest (Lemanske Jr ja Busse 2010) (Locksley 2010).

Peamisteks haiguse põhjustajateks peetakse erinevaid ekso- ja endogeenseid stiimuleid, aga ka bakteriaalseid või viraalseid infektsioone, mille tagajärjel muutuvad organismi hingamisteed ülitundlikuks. Allergeenidena võivad mõjuda näiteks puude ja kõrreliste õietolm, hallitusseened, aga ka kodudes levinud tolmulestad (Locksley 2010). Allergiliste reaktsioonide esinemine ei tähenda aga koheselt haiguse olemasolu, vaid astma teke sõltub ka keskkonnast ja geneetilistest faktoritest ning enne kõike just nende omavahelisest mõjust. Lisaks võivad määravateks teguriteks olla ka konkreetse indiviidi immuunsüsteemi ja hingamisteede omapärad (Locksley 2010) (Jackson, Gern ja Lemanske Jr 2016).

1.1.1. Astma molekulaarsed põhjused

Üldjuhul on astma ja teised atoopilised seisundid seotud CD4+ molekuli ekspresseerivate T-lümfotsüütide, täpsemalt tüüp 2 helper-T-rakkude (T_H2) vahendatud ülemäärase immuunvastusega. Allergeenid satuvad hingamisteede kaudu organismi ja kontakt kopsuepiteeli limaskestaga vallandab erinevate immuunvastuste kaskaadi, mille tulemuseks on spetsiifiliste IgE antikehade tootmine ja põletiku teke. See on organismile omane viis patogeenide ja kahjustatud rakkude vastu võitlemiseks, kuid allergiliste haiguste puhul tekib immuunvastus keskkonnas esinevate ainete suhtes, mis tavaliselt on organismile täiesti ohutud (Lemanske Jr ja Busse 2010) (Rebane ja Akdis 2013) (Okoye, et al. 2014) (Causton, et al. 2015).

Esimese etapina seotakse allergeenid kudedes dendriitrakkude pinnal paiknevate tollilaadsete retseptoritega (TLR) või mõnda teist tüüpi retseptoritega, mistõttu dendriitrakud aktiveeritakse ja nad liiguvad lümfisõlmedesse, kus nad esitlevad allergeenid protsessitud kujul T-lümfotsüütidele. Aktiveeritud helper-T-rakud toodavad interleukiini IL-2, mis tagab nende diferentseerumise. Rakkude jagunemine T_H1 või T_H2 rakkudeks sõltub sellest, mis

tsütokiinid antud hetkel keskkonnas ülekaalus on. Allergeenide toimele järgneb enamasti allergeenispetsiifiliste T_H2 rakkude aktiveerimine ja nende poolt interleukiinide IL-4, IL-13 ning IL-5 süntees. IL-4 ja IL-13 on vajalikud IgE tüüpi antikehade sünteesiks ning IL-5 toimel toimub luuüdis eosinofiilide diferentseerumine ja küpsemine. Antud interleukiin kontrollib ka eosinofiilide aktiveerimist, luuüdist vabanemist ja ellujäämist (Hogan, et al. 2008) (Medzhitov 2010) (Pelaia, et al. 2015).

Lisaks T_H2 rakkudele võivad osaleda allergia korral aktiveeritud immuunvastuses ka teised T-raku populatsioonid, näiteks T_H9 rakud, mis tänu IL-9 ekspresseerimisele aktiveerivad nuumrakud ning fagotsütoosivõimelised neutrofiilid, mis suunatakse kemotaksise abil põletikukoldesse. Nuumrakkude ja neutrofiilide peamiseks ülesandeks on patogeenide õgimine ja põletikku reguleerivate ainete vabastamine (Huse, et al. 2006) (Basinski, et al. 2009) (Pelaia, et al. 2015).

Kui hingamisteede infektsioon on tekitatud viiruse poolt, aktiveeritakse organismis interleukiin IL-12 ekspressioon, mis tagab eelkõige T_H1 rakkude aktiveerumise ja erinevate interferoonide, sealhulgas IFN- γ produktsiooni, mis omakorda aktiveerib makrofaagid, tsütotoksilised T rakud ja indutseerib epiteeli rakkudes apoptoosi (Huse, et al. 2006) (Basinski, et al. 2009) (Pelaia, et al. 2015).

Astma patogeneesis mängib väga olulist rolli tuumafaktor κB (NF- κB) signaalirada. Selle raja aktiveerivad nii põletikud, infektsioonid kui ka allergiad, sest see on määrava tähtsusega tsütokiinide ja mutsiinide ekspresseerimisel (Wong, et al. 2006) (Janssen-Heininger, et al. 2009) (Fujisawa, et al. 2009) (Causton, et al. 2015), epiteeli funktsioneerimiseks kaitsebarjäärina (Lambrecht ja Hammad 2013) ning on seotud ka hingamisteede remodelleerimisega (Cras, et al. 2011). Näiteks põhjustab bakteriaalne infektsioon κB inhibiitori (I κB) fosforüleerimise ja selle tagajärel vabaneb transkriptsioonifaktor NF- κB , mis liigub rakutuuma ning indutseerib seal oma sihtmärkgeenide transkribeerimist. Nii tagatakse põletikuliste tsütokiinide (nagu IL-1 β ja TNF- α) tootmine, mis on vajalik patogeenide vastu võitlemiseks ja immuunvastuse tekkeks (Baldwin Jr 2001) (Taganov, et al. 2006) (Perry, et al. 2008) (Levy 2009) (Akdis, et al. 2011) (Rebane ja Akdis 2013).

1.1.2. Bronhiepiteel ja selle muutused astma korral

Inimese hingamiseldkond puutub pidevalt kokku erinevate patogeenide, toksiliste kemikaalide ja muude osakestega ning seetõttu vajab organism kaitsebarjääri (Fahy ja Dickey 2010). See on ka üks põhjus, miks tervete hingamisteede epiteeli kuuluvad ripsrakud, karikrakud ning sekretoorsed Clara rakud on tiheliiduste abil omavahel seotud. Sellisel viisil

tekib tihe polaarsetest rakkudest moodustunud kiht, millest kahjulikud sissehingatavad aerosoolid pole võimelised läbi tungima (Hardyman, et al. 2013). Lisaks katab epiteeli ka limakiht, mille abil püütakse kinni sissehingatavad toksiinid ja muud kahjulikud ained, mis seejärel ripsrakkude liikumise ja kõhimise teel transporditakse hingamisteedest välja (Fahy ja Dickey 2010).

Astma puhul on näidatud, et hingamisteedes paikneva epiteeli kaitsefunktsioon on puudulik ning selle üheks põhjuseks on tiheliiduste nõrgenemine (Xiao, et al. 2011). Kui terve inimese bronhiepiteel saab kahjustada, alustatakse koheselt selle parandamist. Selleks ekspresseeritakse epidermaalseid kasvufaktoreid (EGF), et indutseerida rakkude migreerumist, prolifererumist ja diferentseerumist (Ganesan ja Sajjan 2013). Samas ulatuslike või krooniliste vigastuste puhul sellist kiiret reageerimist ei toimu (Crystal, et al. 2009). Näiteks viirusinfektsioonide puhul on näidatud, et rakkudevahelised tiheliidused katkevad, kuid organism püüab esmalt interferoonide ja TNF- α ekspresseerimise abil infektsiooni vastu võidelda ning tekkiv immuunvastus hoopis pikendab puuduliku kaitsebarjääriga seisundit (Coyne, et al. 2002) (Hardyman, et al. 2013).

Teine astmale omane tunnus on liigse ning muutunud koostisega lima tootmine, mis blokeerib hingamisteid (Fahy ja Dickey 2010). Nimelt suurenevad submukoossed limanäärmed ning seetõttu sekreteerivad need ka ülemäärases koguses mutsiini, mis moodustab tiheda viskoosse astmale iseloomuliku lima. Lisaks on näidatud, et nii EGF retseptori aktiveerimine kui ka IL-4, IL-9, IL-13 indutseerivad mutsiinide ekspresseerumist (Choy, et al. 2011) (Kim, Lewis ja Nadel 2011). Nende interleukiinide tõttu toimub ka lima sekreteerivate karikrakkude diferentseerumine ja muutused silelihastes, mis veelgi suurendavad hingamisteede tundlikkust allergeenidele (Locksley 2010).

Pideval allergeenidega kokkupuutel esineb organismis püsivalt palju eosinofiile ja basofiile. Ka nuumrakkude hulk on suurenenud ja karikrakkude diferentseerumise, limaproduktiooni kasvamise ning silelihaste massi suurenemise tagajärjeks ongi hingamisteede seinapaksenemine, ülitundlikkus ja krooniline põletik (Lemanske Jr ja Busse 2010) (Locksley 2010).

1.1.3. Astma ravi

Kuna astma on seotud bronhide kokkutõmbumise ning limaerituse suurenemisega, mis võib viia hingamisraskuste esinemiseni ja üksikutel juhtudel ka surmani, on ravi esmaseks eesmärgiks saada haigus kontrolli alla ning vältida sümptomite ägenemist (Lougheed, et al. 2010). Selliseks astma haigustunnuste leevendamiseks on esmajärjekorras kasutusel lokaalselt

või raskematel juhtudel süsteemselt manustatavad põltikuvastased ravimid nagu glükokortikosteroidid ning lühiajalise toimega bronhe lõõgastavad beeta-2-agonistid. Kuna glükokortikosteroidid on üldised immuunsüsteemi pärssivad ravimid, esineb nende kasutamisel risk kõrvaltoimete tekkeks. Samuti on mitmed uuringud näidanud, et beeta-2-agonistide kasutamine eraldiseisva ravimina (mitte kombinatsioonis glükokortikosteroididega) võib põhjustada hoopis haigussümptomite ägenemist (Shahidi ja FitzGerald 2010) (Barnes 2012) (Beasley, et al. 2014).

Allergeenide vastu antikehade abil võitlemise käigus suureneb paljudel patsientidel veres ka IgE hulk. Immunoglobuliin E põhjustab aga omakorda nuumrakkude poolt põletiku mediaatorite (nagu histamiin ja leukotriinid) vabastamise ja nendega kaasnevate astmale iseloomulike sümptomite tekke (Lemanske Jr ja Busse 2010) (Locksley 2010). Nende haigustunnuste leevendamiseks on hetkel kasutusel antihistamiinid ja leukotriini retseptori antagonistid, kuid nende toime on vaid lühiajaline ning seetõttu vajatakse uusi ravivõimalusi põletiku allasurumiseks (Assayag, Beaulieu ja Cormier 2014).

Üheks paljulubavaks ravimiks on Omalizumab. See on monoklonaalne antikeha, mille abil vähendatakse vaba IgE hulka veres. Kuna antikeha seondub seerumis ringleva IgE-ga selle Fc regiooni kasutades, siis pole immunoglobuliin E enam võimeline oma kõrge afiinsusega IgE retseptorile (FcεRI) seonduma (Lai, et al. 2015). Samuti on näidatud, et Omalizumabi abil väheneb FcεRI retseptori ekspressioon basofiilide, dendriitrakkude ja monotsüütide pinnal ehk seeläbi õnnestub ka põletiku mediaatorite vabanemist limiteerida (Lin, et al. 2004) (Humbert, et al. 2014). Hetkel on antud ravim kasutusel vaid nende patsientide puhul, kelle haigus ei allu glükokortikosteroidide teraapiale (Kim ja Mazza 2011).

Ka TNF-α ekspressiooni allasurumine võib olla üks võimalus ravida astmat ja muid hingamisteede haiguseid. On teada, et seda proinflammatoorset tsütokiini esineb eriti rohkelt just raskeloomuliste haiguste puhul. Kliinilised uuringud on tõestanud, et TNF-α inhibeerimine vastava antikeha toimega, vähendab hingamisteede ülitundlikkust, astma ägenemist ning seda seostatakse peamiselt epiteeli taastunud kaitsebarjääri ning kopsude parema funktsioneerimisega (Berry, et al. 2006) (Hardyman, et al. 2013).

Lisaks püütakse allergiate vastu võidelda allergeeni spetsiifilise immunoteraapiaga. See põhineb korduval, suureneva kontsentratsiooniga allergeeni manustamisel. Selline meetod peaks tagama organismis immuunreaktsioone alla suruvate rakkude piisava hulga, et suruda alla ülitundlikkus antud antigeeni suhtes ja seega saavutatakse pikaajalise toimega raviefekt (Frew 2010).

Kuna astma on heterogeenne haigus, siis on väga raske hinnata, millised ravimid konkreetsetele patsientidele sobivad. Praegu vaid astma raskete vormide puhul kasutatavad bioloogilised ravimid on kallid ja ei pruugi oodatud tulemust anda ning seetõttu püütaksegi pidevalt leida uusi võimalusi teraapiaks.

1.2. Rinoviirus ja astma

Arvatakse, et astma kujunemine on suuresti seotud ka varases eas esinevate hingamisteede infektsioonidega ning suurim risk haiguse tekkeks on just nendel lastel, kes on kokku puutunud nii viiruste kui allergeenidega (Oddy, et al. 2002) (Kusel, et al. 2007) (Sly, et al. 2008). Nende kahe stressiteguri omavaheliste interaktsioonide kohta on esitatud mitmeid erinevaid teooriaid – arvatakse, et viirusinfektsioon kahjustab kopsuepiteeli ja seetõttu on hingamisteede kaitsebarjäär puudulik ning allergeenid saavad edukamalt absorbeeruda (Sakamoto, Ida ja Takishima 1984) (Fallon, et al. 2009). Samas esineb ka vastupidiseid hüpoteese, mille kohaselt just allergeenid ja muud sissehingatavad saasteained rikuvad hingamisteede epiteeli ning organism muutub viirustele vastuvõtlikumaks (Lopez-Souza, et al. 2004) (Jakiela, Brockman-Schneider, et al. 2008). Mõlema variandi puhul on lõpptulemuseks tugeva immuunvastuse teke ja põletiku süvenemine.

Üheks selliseks astmaga seostatud viiruseks peetakse rinoviirust (RV) (Jackson, Gern ja Lemanske Jr 2016). See viirus nakatab eelkõige inimeste ülemisi hingamisteid ning tavaliselt väljendub RV infektsioon nn külmetushaigusena, millele iseloomulikeks sümptomiteks võivad olla nohu, kurguvalu, ninakinnisus, köha, aevastamine ja ka peavalu (Kelly ja Busse 2008). Kui rinoviirused nakatavad bronhiepiteeli rakke, lõppeb viiruse genoomi replitseerumine lüütilise faasiga, millega kaasneb rakkude lüüsumine ning seeläbi epiteeli kaitsebarjääri nõrgestamine (Sajjan, et al. 2008). Lisaks epiteeli kahjustamisele põhjustavad viirused immuunvastuse teket, mis väljendub erinevate kemokiinide ja tsütokiinide ekspresseerumises. Sellega omakorda kaasneb immuunrakkude värbamine, dendriitrakkude aktiivsuse stimuleerimine ja seetõttu on võimalik, et rinoviirus võimendab juba olemasoleva allergeeni patogeenset mõju (Sly, et al. 2008) (Proud, Turner, et al. 2008) (Lewis, et al. 2012). Samuti arvatakse, et rinoviirus soodustab lima sekreteerimist ning koe tursumist, mis väljendub hingamisteede osalise sulgumisena ja astma sümptomite tekkena (J. E. Gern 2015).

Seoseid rinoviiruse ja astma tekke vahel toetab ka Soomes läbi viidud uurimus, mille käigus tuvastati, et umbes 5.kuu vanuste viliseva hingamisega imikute seas esines väga palju rinoviirusesse nakatumisi. Hiljem leiti, et 60% nendest infektsiooniga lastest tekkis astma juba esimese 2 eluaasta jooksul (Kotaniemi-Syrjänen, et al. 2003). Sarnased uuringud viidi

läbi ka Ameerika Ühendriikides ja Austraalias (Heymann, et al. 2004) (Lemanske, et al. 2005) (Kusel, et al. 2007). Saadud tulemuste tõttu peetakse RV infektsiooni üheks määravaks teguriks astma kujunemisel varases lapsepõlves ja selle süvenemisel hilisemas elueas (Nicholson, Kent ja Ireland 1993) (Lemanske Jr ja Busse 2010) (Jartti ja Gern 2011) (Patel, et al. 2013) (Jartti, et al. 2014).

1.2.1. Rinoviiruste klassifikatsioon

Rinoviirused kuuluvad *Picornaviridae* sugukonda ning *Enterovirus* perekonda. Nende genoom koosneb positiivsest üheaheelalisest RNA-st, mis on ligikaudu 7.2 – 7.5 kb pikk ning pakitud 30 nm ikosaedrilisse kapsiidi (Wang, Nagarkar, et al. 2009) (King, Adams ja Carstens 2011) (Royston ja Tapparel 2016). Genoomi ümbritseva kapsiidi moodustavad neli erinevat valku (VP1-VP4), mida esineb mitmete koopiatena. VP1 valk paikneb kapsiidi välisküljel ning on inimese immuunvastuse peamiseks sihtmärgiks, kuigi ka VP2 ja VP3 valgud mõjuvad organismis antigeenidena. Vastupidiselt teistele valkudele paikneb VP4 kapsiidi sisemuses ning on seotud viiruse genoomiga (McLean, et al. 2012). Lisaks on genoomse RNA ahela 5' otsas kovalentselt seotud VPg valk, mille funktsiooniks on replikatsiooni ajal praimerina käitumine, ning RNA 3' otsas asub polüadenüleeritud saba (Yin-Murphy ja Almond 1996) (Turner ja Lee 2009) (Royston ja Tapparel 2016).

Vastavalt järjestuste homoloogiale jaotatakse rinoviiruseid kolmeks liigiks – A, B ja C ning need sisaldavad omakorda üle 100 erineva tüve (Jackson, Gern ja Lemanske Jr 2016). Neid viiruseid klassifitseeritakse lisaks järjestustele ka retseptorite järgi, mille abil nad hingamisteede epiteeliga seonduvad. Enamus viirustüvesid kasutavad rakkudega seondumiseks rakusisest adhesioonimolekuli 1 (ICAM1) ning neid nimetatakse suure grupi (*major group*) rinoviirusteks. Vaid kümme tüve seonduvad madala tihedusega lipoproteiini (LDL) retseptoriga ning on seetõttu väikese grupi (*minor group*) viirused (Laine, et al. 2006) (Wark, et al. 2009).

Antud magistritöö eksperimentides uuriti rinoviiruseid A16 ja 1B, millest esimene kuulub suure grupi RV hulka ning 1B tüvi on väikese grupi liige. Lisaks kasutati katsete tegemiseks võimendatult rohelist fluorestseeruvat valku (eGFP-d) ekspresseerivat rinoviirust A16 (eGFP-A16). eGFP signaal võimaldab tuvastada rakkudesse sisenenud viirust ja selle replitseerumist ning võrreldes tavalise GFP reporteriga, on eGFP signaal ligikaudu 35 korda heledam (Zhang, Gurtu ja Kain 1996).

1.2.2. Rinoviiruse infektsioon

Nakatumine rinoviirusesse toimub tavaliselt sissehingamise teel, kuid haigestuda on võimalik ka läbi kontakti nakkuskandjaga. Infektsiooni tõttu kahjustub nii ülemiste kui alumiste hingamisteede epiteel, see tursub ning koos suurenenud limaproduktiooniga võivad tagajärgedeks olla osaliselt sulgunud hingamisteed ja vilisev hingamine. Lisaks indutseeritakse viirusinfektsiooni korral epiteeli rakkudes kemokiinide ekspressioon, mis viib alumistes hingamisteedes nii neutrofiilse kui eosinofiilse inflammatsiooni tekkeni (Gern, et al. 2003) (Korpi-Steiner, et al. 2006) (Message, et al. 2008) (Proud, Turner, et al. 2008) (Wang, Nagarkar, et al. 2009) (Bochkov, et al. 2010).

Arvatakse, et RV infektsiooni efektiivsus sõltub organismis toodetavatest interferoonidest (Message, et al. 2008) (Baraldo, et al. 2012). Osad uurimused on näidanud, et astmaatikutep kopsuepiteeli rakkudes on interferooni ekspressioon puudulik. Selle tulemusena väheneb epiteelrakkude apoptoos ning viirus saab paljudesse rakkudesse siseneda ja seal edukalt replitseeruda (Contoli, et al. 2006) (Kelly ja Busse 2008) (Wark, et al. 2009). Samas leidub ka täpselt vastupidiseid tulemusi, kus astmaatikutep ja tervete patsientide geeniekspressioon ei erine teineteisest (Lopez-Souza, et al. 2009). Vastuoluliste tulemustep tõttu pole üheselt mõistetavaid järeldusi võimalik teha, kuid üldlevinud arvamuse kohaselt on noores eas rinoviirusesse nakatumise tagajärjed raskeloomulisemad ja seda just sellepärast, et immuunsüsteem pole veel täielikult välja arenenud ning interferoonide ekspressioon on nõrk (Parry, et al. 2000) (Gern, Brooks, et al. 2006) (Kelly ja Busse 2008).

Lisaks mõjutavad rinoviirusesse nakatumist ka stress (Cohen, et al. 2012), suitsetamine (Berman, et al. 2016) ja dieet. Näiteks on tõestatud, et vitamiin D puudusel on hingamisteedep haigused ja astma teke soodustatud (Bener, et al. 2014) (Korn, et al. 2013) (Groot, et al. 2015).

1.2.3. Rinoviiruse infektsiooni molekulaarsed mehhanismid

Rinoviiruse infektsiooni esimeseks etapiks on hingamisteedep epiteelrakkudega interakteerumine ja nendesse sisenemine. Enamus RV tüvesid kasutavad selleks rakusisest adhesioonimolekuli 1 ning kuna viirus indutseerib infitseerunud rakkudes veelgi suurema ICAM1 retseptori ekspresseerumise, suureneb rakkude nakatumine (Kelly ja Busse 2008).

Pärast epiteeli rakkudesse sisenemist vabaneb üheaahelaline viraalne RNA tsütosooli ning algab RNA replikatsioon, mille käigus moodustub lühiajaliselt ka dsRNA. Raku plasmamembraanil või endosoomide membraanil paikneb tollilaadne retseptor TLR3, mis

tunneb ära dsRNA ning tsütöplasmas asuv melanoomi diferentseerumisega assotsieerunud geen 5 (MDA5) valk tuvastab positiivse ahelaga viiruse. Nende kahe valgü vahendusel indutseeritakse bronhiepiteeli rakkudes viirusvastus ning seejärel alarmeeritakse immuunsüsteemi (Wang, Miller, et al. 2011).

Viirusvastuse tulemusena alustatakse bronhiepiteeli rakkudes interferoonide tootmist (k.a IRF1) ning NF- κ B raja aktiveerumise teel tagatakse proinflammatoorsete tsütokiinide ja kemokiinide (näiteks CXCL1, CXCL5) ekspresseerumine (Bochkov, et al. 2010) (Zaheer ja Proud 2010) (Jakiela, Gielicz, et al. 2014). Lisaks stimuleeritakse IL-1, IL-8, CCL5 ja eotaksiinid (nagu CCL11, CCL24), mille abil värvatakse nii eosinofiile kui neutrofiile (Papadopoulos, et al. 2001) (Wark, et al. 2009) (Triantafilou, et al. 2011) (Felton, et al. 2014). Eosinofiilid on vajalikud ribonukleasid ja erinevate antiviraalsete omadustega valkude tootmiseks ning antigeenide esitlemiseks (Acharya ja Ackerman 2014). IL-8 toimet aktiveeritakse neutrofiilid, mille ülesandeks on samuti patogeeni leviku piiramine. Nii eosinofiilide kui ka neutrofiilide aktiveerimisega ja kogunemisega hingamisteedesse kaasneb ka hingamisteede tursumine ning limaerituse suurenemine (Kelly ja Busse 2008) (Tang, et al. 2016).

1.2.4. Rinoviiruse ravi astmahaigetel

Kuna rinoviirused põhjustavad astma ägenemist, siis on pikaajalise infektsiooni raviks püütud kasutada kõige enam just glükokortikosteroide, mis vähendavad NF- κ B ja mitmete teiste signaaliradade aktiivsust ja inflammatoorsete valkude sünteesi ning seeläbi väheneb põletik. Miinuseks on aga ravimi võimalikud kõrvaltoimed, milleks võivad olla kõrge vererõhk, hüperglükeemia, osteoporoos ja lastel ka kasvupeetus. Lisaks võib ravim mõjutada ka psüühikat või kesknärvisüsteemi, mille tulemusena võib väheneda keskendumisvõime ja esineb unetust ning ärevust (Ciriaco, et al. 2013).

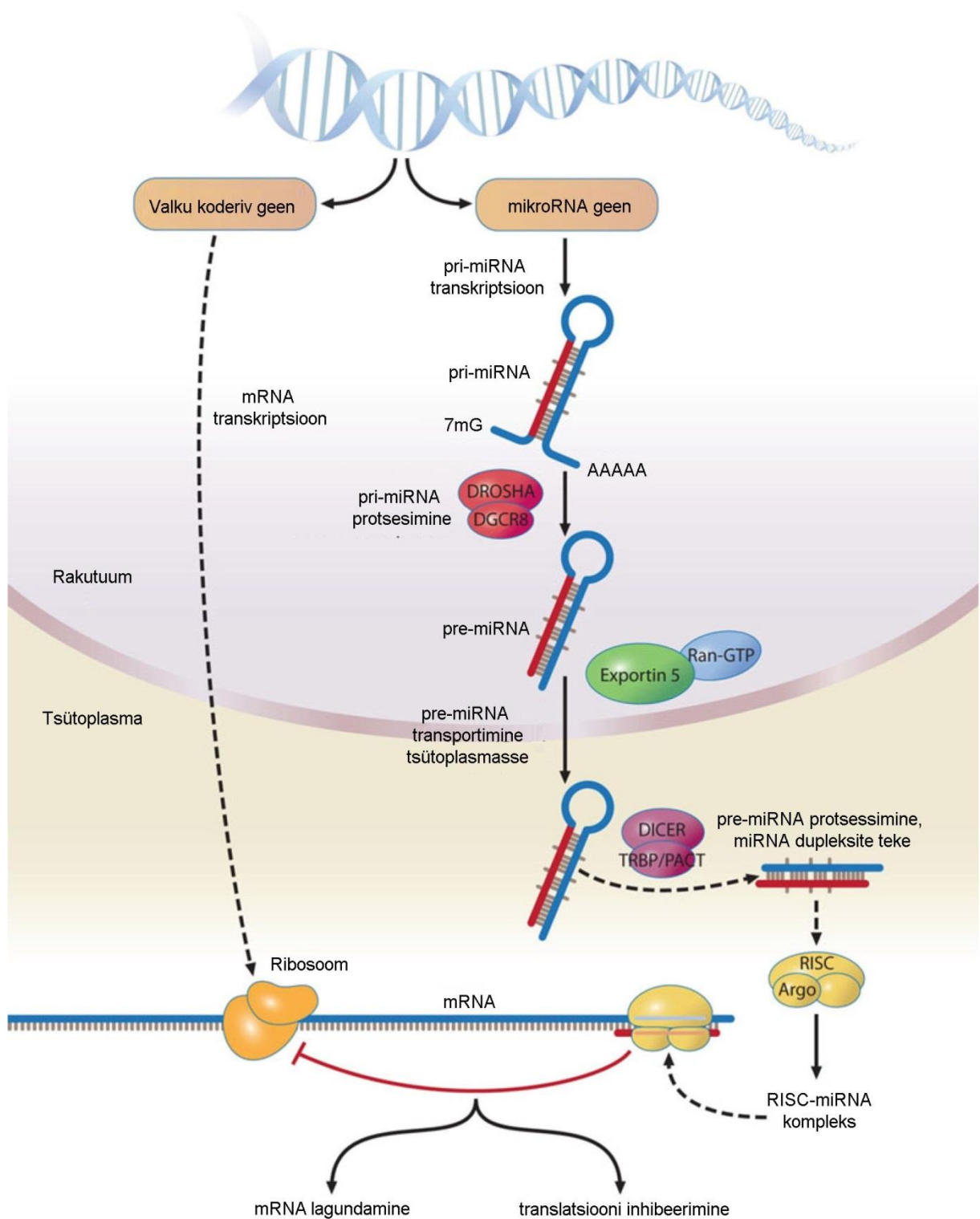
Teine võimalus rinoviiruse vastu võitlemiseks oleks vaksineerimine. Probleemiks on aga rinoviiruse serotüüpide esinemine, mida on lausa üle saja ehk isegi kui õnnestuks viiruse ühe tüve vastu vaktsiin luua, puuduks endiselt kaitse kõikide teiste eest. Samas on näidatud, et rinoviiruse kapsiidivalgu VP4 vastu suunatud antikehad on võimelised paljusid erinevaid serotüüpe neutraliseerima (Kelly ja Busse 2008) (Katpally, et al. 2009).

1.3. mikroRNA-d ja nende biogenees

Paljude geenide ekspressiooni reguleeritakse epigeneetiliselt – üheks selliseks viisiks loetakse ka mikroRNA-de (miRNA) poolt vahendatud transkriptsioonijärgset regulatsiooni (Kabesch 2016). miRNA-d on lühikesed (21-23 nt pikkused) üheaahelalised mittekodeerivad RNA-d, mis seonduvad 6-8 nukleotiidi pikkuse komplementaarse järjestuse abil erinevate sihtmärk mRNA-de 3' mittetransleeritava regiooniga (3' UTR) ja vaigistavad vastava märklaud-mRNA ekspressiooni (Rebane ja Akdis 2013) (Kho, et al. 2016). Kuna miRNA ja tema sihtmärk-mRNA vahel ei pea komplementaarsus olema täielik, siis on üks miRNA võimeline sadade või lausa tuhandete erinevate mRNA-de hulka reguleerima. Samuti võib ühe mRNA tase olla kontrollitud paljude erinevate miRNA-de poolt (Lin ja Gregory 2015). Sellise geeniekspressiooni reguleerimise kaudu mõjutavad miRNA-d paljusid erinevaid bioloogilisi protsesse – rakkude diferentseerumist, kasvamist, arengut, nende metabolismi, signaliseerimist, apoptoosi ja ka põletikulisi protsesse (Plank, et al. 2013).

miRNA-sid kodeerivad järjestused võivad paikneda genoomis klastritena valke kodeerivate geenide geenidevahelises alas, üksikult valke mittekodeerivate geenide eksonites või valke kodeerivate geenide sees intronites. Nende sünteesimine (Joonis 1) algab rakutuumas, kus RNA polümeraas II abil luuakse miRNA järjestusi sisaldavad pikad primaarsed transkriptid, mida nimetatakse pri-miRNA-deks. Pri-miRNA transkriptidele lisatakse 5' otsa metüülguanosiini müts ja 3' ots polüadenüleeritakse (Plank, et al. 2013). Need omakorda lõigatakse tüüp III RNAas Drosha ja kaheaahelalist RNA-d siduva Pasha (nimetatakse ka DiGeorge sündroomi kriitilise regiooni geen 8-ks) kompleksi abil lühemateks ning saadakse prekursor mikro-RNA-d (pre-miRNA-d), millel on juuksenõelstruktuur (Rebane ja Akdis 2013). Prekursor miRNA-d koosnevad umbes 70 nukleotiidist ja neile on iseloomulikuks terminaalne lingu struktuur ning 3' otsas kahe nukleotiidi pikkused üleulatuvad otsad (Plank, et al. 2013) (Lin ja Gregory 2015).

Pre-miRNA-d tuleb edasiseks protsessimiseks transportida tsütoplasmasse. Selleks peab Exportin-5 tundma ära pre-miRNA terminaalsete lingu ning koostöös guanosiintrifosfaati siduva RAS seoselise tuumavalguga (Ran-GTP) viiakse need rakutuumast välja (Plank, et al. 2013). Järgneva protsessimise tsütoplasmas viib läbi Dicer1, mis on samuti tüüp III RNAas ning asümmeetrilise lõikamise järel tekivad lühikesed ~22 nukleotiidi pikkused miRNA dupleksid, millel on 3' üleulatuvad otsad (Pfaff, et al. 2013) (Lin ja Gregory 2015).



Joonis 1. miRNA-de biogenees ja funktsioon. miRNA-de sünteesiks transkribeeritakse kõigepealt rakutuumas RNA polümeraas II poolt pri-mikroRNA-d. Pri-miRNA protsessitakse Drosha ja DGCR8 abil ning saadud pre-mikroRNA transportitakse Exportin 5 ja Ran-GTP vahendusel tsütoplasmasse. Järgneb Diceri poolt protsessimine, tekivad miRNA dupleksid. miRNA duplexi üks ahel kaasatakse RISC kompleksi ja järgneb sihtmärk-mRNA-ga seandumine, geeniekspressiooni reguleerimine. Adapteeritud (Sand 2014).

Üks miRNA ahel kaasatakse RISC kompleksi (RNA indutseeritud vaigistamiskompleks), mis koosneb Argonaut (Ago) ja 182 kDa glütsiin-trüptofaan (GW182) valgust. Teine miRNA duplexi ahel tavaliselt degradeeritakse või seotakse teise RISC kompleksi poolt. Mõlemal juhul seondub RISC kompleksi koosseisu kuuluv miRNA tänu kuue kuni kaheksa nukleotiidsele järjestuse komplementaarsusele, oma sihtmärk mRNA-ga ning reguleerib selle ekspressiooni. miRNA võib represseerida mRNA translatsiooni initsiatsiooni, takistada selle elongatsiooni või destabiliseerib oma sihtmärk mRNA ja suunab selle lagundamisele (Joonis 1) (Rebane ja Akdis 2013) (Li ja Rana 2014)

1.3.1. miR-146 perekond

On näidatud, et mikroRNA-d on võimelised tänu geeniekspressiooni reguleerimisele mõjutama organismi immunvastust ja kudede põletikku (ka allergiliste haiguste puhul). Kõige enam on seni uuritud miR-146a, miR-21 ja miR-155 seoseid immuunsüsteemiga (Rebane 2015).

Inimese genoomis esineb kaks geeni, mis vastutavad miR-146 perekonna miRNA-de kodeerimise eest. Esimene neist geenidest paikneb viiendal kromosoomil ning sellelt toimub miR-146a süntees. Teist miR-146 perekonda kuuluvat mikroRNA-d (miR-146b) transkribeeritakse aga kümnendalt kromosoomilt (Taganov, et al. 2006). Need kaks mikroRNA-d on peaaegu identsed – nende seemnejärjestused (Joonis 2), millel on määrav tähtsus sihtmärkgeenide tuvastamisel, on ühesugused ehk teoreetiliselt peaksid mõlemad miRNA-d olema võimelised samu mRNA-sid ära tundma ja nende ekspressiooni reguleerima (Lu ja Rothenberg 2013). miR-146a ja miR-146b 3' regioonid esineb kahe nukleotiidiline erinevus, mis vähesel määral võib siiski märklaudadele seondumist mõjutada (Rusca ja Monticelli 2011).

miR-146a 5'-UGAGAACUGAAUCCAUGGGUU-3'

miR-146b 5'-UGAGAACUGAAUCCAUAGGCU-3'

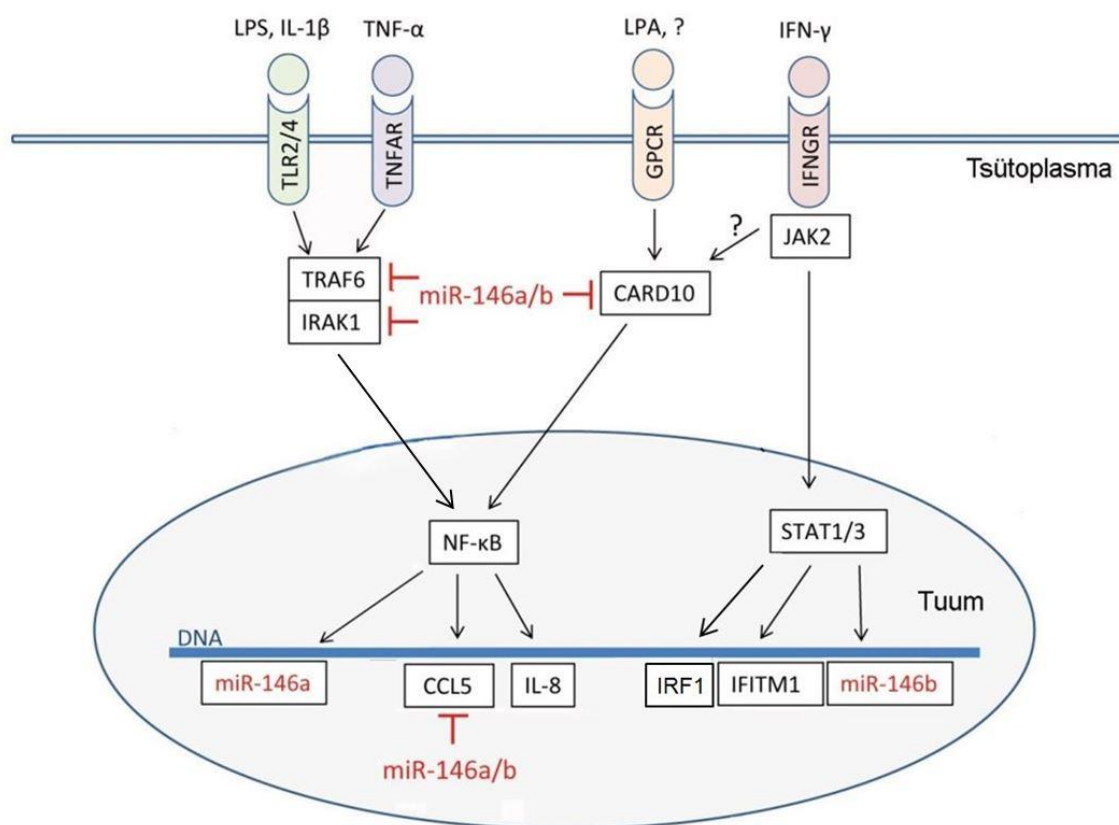
Joonis 2. miR-146a ja miR-146b primaarsed järjestused^{1,2}. Sinisega on tähistatud mikroRNA-de seemnejärjestused ning oranžiga miR-146a/b kahe nukleotiidne erinevus.

Paljud uuringud on näidanud, et miR-146a ekspresseerumist indutseeritakse läbi NF-κB raja nii immuunrakkudes kui ka epiteelirakkudes, sealhulgas ka alveolaarse epiteeli vähi rakuliinis (A549), bronhiepiteelist valmistatud rakuliinis BEAS-2B ja hingamisteede silelihaste

¹ http://mirbase.org/cgi-bin/mature.pl?mature_acc=MIMAT0000449

² http://www.mirbase.org/cgi-bin/mature.pl?mature_acc=MIMAT0002809

rakkudes (Perry, et al. 2008) (Williams, et al. 2008). Kuna mikroRNA-146a sihtmärkide hulka kuuluvad tuumafaktor κ B signaaliraja liikmed IL-1 retseptor vahendatud kinaas 1 (IRAK1), TNF retseptori vahendatud faktor 6 (TRAF6) ja kaspasi värbamise domeeni sisaldav valk 10 (CARD10), siis on antud miRNA võimeline NF- κ B raja aktiivsust negatiivse tagasiside kaudu reguleerima (Joonis 3) (Crone, et al. 2012) (Rebane, Runnel, et al. 2014). See tähendab, et NF- κ B signaaliraja aktiveerudes toimub miR-146a ekspressiooni tõus, mistõttu IRAK1, TRAF6, aga ka lipoproteiin A (LPA) poolt aktiveeritava CARD10 tasemed vähenevad ja seetõttu väheneb ka NF- κ B raja aktiivsus ning inhibeeritakse inflammatoorsete tsütokiinide ja kemokiinide (nagu näiteks IL-8 ja CCL5) sünteesi. Kuna proinflammatoorsete tsütokiinide ja kemokiinide ekspressioon väheneb, ei toimu neutrofiilide, T-rakkude (Treg), dendriitrakkude, eosinofiilide, nuumrakkude ja basofiilide kogunemist inflammatsiooni keskmesse ja põletik kahaneb (Baldwin Jr 2001) (Taganov, et al. 2006) (Perry, et al. 2008) (Levy 2009) (Akdis, et al. 2011) (Rebane ja Akdis 2013) (Park, et al. 2015) (Rebane 2015). Järelikult on miR-146a võimeline tsütokiinide ja kemokiinide tasemetega vähendamise kaudu inhibeerima põletikulisi protsesse (Wang, et al. 2011).



Joonis 3. miR-146a/b ekspressioon ja funktsioon rakus. NF- κ B või JAK-STAT signaaliraja aktiveerimine stimuleerib vastavalt miR-146a ja miR-146b ekspresseerumist. miR-146a/b omakorda inhibeerivad tsütoplasmas TRAF6, IRAK1 ja CARD10 ekspressiooni ja seeläbi reguleerivad NF- κ B signaaliraja aktiivsust. Modifitseeritud (Rebane 2015). LPS - lipopolüsahhariid.

miR-146b funktsioonide ja toimimismehhanismide kohta teatakse vähem. Arvestades miR-146b järjestuse suurt sarnasust miR-146a-le, võib arvata, et ka miR-146b on võimeline mõjutama organismi immuunvastust. Park ja teised näitasid 2015.aastal, et miR-146b üleekspressiooni korral väheneb TRAF6 ja IRAK1 ekspressioon – järelkult reguleerib ka see miR-146 perekonna liige NF- κ B raja aktiivsust (Park, et al. 2015). Hiljuti tehtud katsed RNA bioloogia laboris on samuti näidanud, et transfekteeritud miR-146a ja miR-146b miimid inhibeerivad IRAK1, CARD10, CCL5 ja IL-8 mRNA ekspressiooni inimese primaarsetes keratinotsüütides (Hermann, et al. 2016). Samas erinevalt miR-146a-st, mille ekspressioon on aktiveeritav NF- κ B poolt, indutseeritakse miR-146b ekspressiooni JAK-STAT raja kaudu (Lu ja Rothenberg 2013). Näiteks patogeenide vastu võitlemisel indutseeritakse tihti IL-6 ekspressioon ning selle tsütokiini seondumisel oma retseptorile, toimub Janus kinaaside (JAK) aktiveerimine ja transkriptsiooni aktivaator 3 (STAT3) liikumine rakutuuma ning seejärel miR-146b ja teiste sihtmärkgeenide transkribeerimine (Joonis 3). IL-6-le sarnaselt toimib ka IFN- γ , mis seondub retseptoriga IFNGR ja põhjustab JAK-i abil STAT1 fosforüleerimise, mis translokeerub tuuma ning võib seal samuti indutseerida miR-146b ekspresseerumist (Xiang, et al. 2014) (Park, et al. 2015).

Monotsüütide puhul on leitud, et mikroRNA-146b ekspresseerumist indutseerivad lipopolüsahhariidid, mis on gram-negatiivsete bakterite välismembraani üheks komponendiks (Curtale, Mirolo, et al. 2013). LPS seondub TLR4 retseptoriga ning müeloidse diferentseerumiskfaktor 88 (MyD88) vahendusel aktiveeritakse ning fosforüleeritakse IRAK, mis omakorda aktiveerib TRAF6, NF- κ B ja indutseerib pro-inflammatoorsete tsütokiinide ekspresseerumist (Pålsson-McDermott ja O'Neill 2004) (Park ja Lee 2013). Samaaegselt aktiveeritakse monotsüütides ka IL-10 ekspressioon, mis oma retseptoriga seondudes aktiveerib JAK1 kinaasi ja STAT3. Vastupidiselt IL-6 mõjule, seostatakse IL-10 tugeva anti-inflammatoorse vastusega ning üheks toimemehhanismiks võibki olla see, et IL-10 stimuleerib miRNA-146b ekspresseerumist ning seeläbi väheneb proinflammatoorsete tsütokiinide IL-6, TNF- α ja IL-8 tootmine (Curtale, Mirolo, et al. 2013) (Braun, Fribourg ja Sealfon 2013) (Hutchins, Diez ja Miranda-Saavedra 2013).

Kuna miR-146a^{-/-} hiirtel tekib elu jooksul autoimmuunsus, millega kaasneb STAT1 kõrgeenenud aktiivsus regulatoorsetes T rakkudes ja seetõttu väheneb regulatoorsete T-rakkude võime inhibeerida ka T_H1 tüüpi immuunvastuseid, siis arvatakse, et nii miR-146a kui miR-146b soodustavad organismis tüüp 2 helper T-rakkude diferentseerumist ja nendele omaste tsütokiinide ekspresseerumist (Lu, et al. 2010). Lisaks on näidatud, et miR-146a

puudulikel hiire T-rakkudel on võimendunud nii T_H1 kui ka T_H17 tüüpi immuunvastused (Okoye, et al. 2014).

1.3.2. miRNA teraapia

Paljudele haigustele on omane teatud spetsiifiline mikroRNA-de ekspressioonimuster – osad miRNA-d on üleekspressioneeritud ning teised samaaegselt vähenenud ekspressiooniga (Christopher, et al. 2016). Kuigi sageli on need muutused haigusliku olukorra tagajärg, on paljudel juhtudel siiski teada ka põhjuslikud seosed, mis näitavad mitmete mikroRNA-de olulist rolli haiguste tekkes ning kulgemises. Teades haigusele iseloomulike mikroRNA-de ekspressiooni ja nende poolt reguleeritud sihtmärkgeene, tekib võimalus uueks potentsiaalseks teraapiaks (Li ja Rana 2014).

miRNA-de kasutamise teevad eriti atraktiivseks neile iseloomulikud tunnused: tegemist on väikeste RNA-dega, mille primaarsed järjestused on hetkel juba teada. Lisaks on miRNA-de järjestused tihti konserveerunud ehk neid oleks potentsiaalselt võimalik erinevates liikides kasutada (Rooij, Purcell ja Levin 2012) (Christopher, et al. 2016). mikroRNA-de suureks eeliseks on ka nende päritolu – kuna miRNA-d ja nende funktsioonid on rakkudes looduslikul viisil tekkinud, siis suure tõenäosusega mikroRNA-del baseeruv teraapia ei tekita rakkudes või organismis soovimatuid kõrvalmõjusid (Rebane ja Akdis 2013).

Teraapia läbiviimiseks on samuti mitu erinevat võimalust – mikroRNA-sid saab nii inhibeerida kui üleekspressioneerida (Li ja Rana 2014). Siiski pole mikroRNA-d ravivõimalusena veel laialdaselt kasutust leidnud ning selle peamiseks põhjuseks on väheefektiivne miRNA miimide- ja inhibiitorite transport haigusest kahjustatud kudedesse ja rakkudesse (Sethupathy 2016). Lisaks on teraapia toimimiseks vajalik tagada mikroRNA-de vabanemine endosoomidest, vältida lüsoosomaalset lagundamist ning kindlustada sihtmärgini jõudmine (Ben-Shushan, et al. 2014). Kuna epiteel ja endoteel on moodustunud tihedalt paiknevatest polaarsetest rakkudest, mis on omavahel tiheliidustega ühendatud, on moodustuv barjäär niivõrd tugev, et sellest on võimelised läbi tungima ainult vesi ja üksikud toitained. Haigusest kahjustunud kude on tõenäoliselt siiski kergemini juurde pääsetav ning sellepärast püütaksegi pidevalt leida uusi mehhanisme miRNA transpordiks (Kristensen, Birch ja Nielsen 2016).

1.4. Rakku sisenevad peptiidid

Viimase aastakümne jooksul on üha enam tähelepanu pälvinud lühikesed, 5-30 aminohappest koosnevad peptiidid, mis on võimelised läbi rakumembraani tungima. Sellest omadusest lähtuvalt on hakatud neid rakku sisenevateks peptiidideks (RSP) kutsuma (Farkhani, et al. 2014). Nendele peptiididele on võimalik lisada ka kargo, milleks võivad olla nii proteiinid, oligonukleotiidid, siRNA-d, miRNA miimid kui ka teised peptiidid (Mäe ja Langel 2006) (Urgard, et al. 2016), mistõttu on RSP-d heaks alternatiiviks viraalsete vektorite ja nanopartiklite kasutamisele, mis on küll efektiivsed meetodid, kuid võivad omada organismile ohtlikke tagajärgi (Regberg, Vasconcelos, et al. 2016).

Lastmolekulid lisatakse rakku sisenevatele peptiididele kahel viisil: kovalentselt või mittekovalentselt. Elektrostaatiliste ja hüdrofiilsete või hüdrofoobsete interaktsioonide abil toimub mittekovalentne lastmolekuli sidumine ning seda kasutatakse palju just siRNA-de ning miRNA miimide puhul (Regberg, Vasconcelos, et al. 2016). Pärast lastmolekuliga seondumist, kasutavad RSP-d rakkudesse penetreerumiseks peamiselt endotsütoosi, kuid on täheldatud ka otsest translokeerumist läbi rakumembraani (Farkhani, et al. 2014) (Kristensen, Birch ja Nielsen 2016).

Rakku sisenevaid peptiide on mitmeid ning klassifitseerimine toimub nende päritolu, struktuuri või lastmolekuliga seondumise alusel. PepFect14 (PF14) on RSP, mis on loodud Transportan10 peptiidi baasil, kuid sisaldab modifikatsioone – isoleutsiinid asendati leutsiinidega ning lüsiinid ornitiinidega, et suurendada peptiidi stabiilsust (Ezzat, et al. 2011). Samuti on lisatud PF14 järjestusse stearüülrühm, mis suurendab rakkudesse sisenemise efektiivsust ja kargo vabanemist endosoomidest (Joonis 4) (Futaki, et al. 2001) (Regberg, Srimanee ja Erlandsson, et al. 2014) (Lehto, et al. 2017).

Stearüül-AGYLLGKLLLOOLAAAALLOLL-NH₂

Joonis 4. Rakku sisenev peptiid PepFect14 (Regberg, Srimanee ja Langel 2012).

Kuna PepFect14 moodustab spontaanselt nanopartikleid oligonukleotiidiga, saab PepFect14 kasutada ka miRNA miimide efektiivseks transportimiseks rakkudesse (Regberg, Srimanee ja Erlandsson, et al. 2014) (Urgard, et al. 2016).

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli välja selgitada, kas immunsüsteemi jaoks olulised miRNA-d miR-146a, miR-146b reguleerivad viirusvastust ja sellega seotud põletikulisi protsesse rinoviirusnakkuse korral bronhiepiteeli rakkudes.

Magistritöö täpsemateks eesmärkideks oli:

- 1) Uurida, kuidas mõjutavad tsütokiinid (TNF- α , IFN- γ , IL-17A, IL-22) miR-146a/b ja nende sihtmärkgeenide (CCL5, IRAK1, CARD10) ning NF- κ B ja JAK-STAT raja poolt aktiveeritavate geenide (IL-8, ICAM1, CXCL1 ja IRF1, CXCL5, IFITM1) ekspressiooni inimese bronhiaalsetes epiteeli rakkudes.
- 2) Hinnata rinoviirusega (RV A16, RV 1B) nakatumise mõju miR-146a/b ja nende sihtmärkgeenide (CCL5, IRAK1, CARD10) ning NF- κ B ja JAK-STAT raja poolt aktiveeritavate geenide (IL-8, ICAM1, CXCL1 ja IRF1, CXCL5, IFITM1) ekspressioonile inimese bronhiaalsetes epiteeli rakkudes.
- 3) Selgitada välja, kas miR-146a/b mõjutavad viirusvastust inimese bronhiepiteeli rakkudes rinoviirusinfektsiooni korral.
- 4) Teha kindlaks proinflammatoorsete tsütokiinide (TNF- α , IFN- γ , IL-17A, IL-22) ja rinoviiruste (A16, 1B) ja miR-146a/b mõju kopsuepiteeli remodelleerimisega seotud geenide (HBEGF, FGF2, MUC5B) ekspressioonile.

2.2. Materjal ja meetodika

2.2.1. Eksperimentides kasutatud rakud

Katsetes kasutati primaarseid inimese bronhiaalseid epiteeli rakke, mis saadi kingitusena koostööpartnerilt (Dr. Bogdan Jakiela, Jageilloni Ülikool, Krakow, Poola). B113 rakud pärinesid tervelt 26-aastaselt meessoost doonorilt, kellel esines atoopia ning B86 doonoriks oli terve 30-aastane mees.

HBEC rakke kasvatati BEGMTM BulletkitTM (*Bronchial Epithelial Cell Growth Medium*, Lonza, Šveits) söötmes, millele oli lisatud veise ajuripatsi ekstrakt (BPE, *Bovine pituitary extract*) (1:5), insuliin (1:20), hüdrokortisoon (1:20), gentamütsiin ja amfoteritsiin-B (1:20), retinoolhape (1:20), transferriin (1:20), trijoodtrüoniin (1:20), epinefriin (1:20), inimese epidermaalne kasvufaktor (hEGF) (1:20). Söötmes kasutatud komponentide täpne

konsentratsioon on tootja poolt salastatud. Rakke kasvatati inkubaatoris, mille temperatuur oli 37°C, keskkond sisaldas 5% CO₂ ning oli veeauruga küllastunud. Rakkude ümber külvamiseks eemaldati 10 cm diameetrisel plaadil kasvavate rakkudele BEGM sööde ja pesti 5 ml fosfaadiga puhverdatud soolalahusega (PBS, Sigma-Aldrich, USA). Järgmisena lisati plaadile 2 ml 2x trüpsiini (*Trypsin-EDTA* in PBS, GE Healthcare, UK) ning rakke inkubeeriti 37°C juures 5 minutit. Ensüümi neutraliseerimiseks lisati tassile 4 ml trüpsiini neutraliseerijat (*Trypsin Neutralizer Solution*, Invitrogen, USA) ning rakud koguti 15 ml tuubi. Lisaks pesti plaati ka 5 ml PBS-ga, et koguda kõik rakud. Seejärel tsentrifugeeriti rakke temperatuuril 4°C 250 rcf juures (Eppendorf 5424 R, rootor FA-45-24-11, Saksamaa) 7 minutit ja supernatant eemaldati. Rakud suspendeeriti 10 ml BEGM söötmes ning jaotati vastavalt vajadusele. Katsed viidi läbi rakkudega, mille passažid olid vahemikus kolm kuni kuus.

HeLa rakke kasvatati L-glutamiini ja naatriumvesinik-karbonaadiga RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, USA) söötmes, mis sisaldas 10% veise loote seerumit (FBS – *fetal bovine serum*) (PAA, USA), penitsilliini (100 IU/ml) ja streptomütsiini (100 µg/ml) (Lonza, Šveits). Rakke kasvatati inkubaatoris temperatuuril 37°C ning keskkond sisaldas 5% CO₂, oli veeauruga küllastunud. Rakkude ümberkülvamiseks lisati plaadile või pudelisse 2x trüpsiini (*Trypsin-EDTA* in PBS, GE Healthcare, UK) ning rakke inkubeeriti 37°C juures 5 minutit. Seejärel lisati rakkudele PBS-i (Sigma-Aldrich, USA), rakud koguti 15 ml tuubi ning tsentrifugeeriti (Eppendorf 5424 R, rootor FA-45-24-11, Saksamaa) 250g juures 7 minutit. Supernatant eemaldati ning rakud suspendeeriti värskes RPMI söötmes ning külvati edasi vastavalt vajadusele.

2.2.2. Rinoviiruste tüved ja nende paljundamine

Katsetes kasutati rinoviiruseid A16, eGFP-A16 ja 1B. Viirused A16 ja 1B saadi kingitusena Sebastian Johnstonilt (National Heart and Lung Institute, Imperial College London, UK). Võimendatult GFP-d ekspresseeriv rinoviirus A16 (eGFP-A16) loodi antud magistritööle eelnevalt Alar Aabi poolt. Selleks kasutati Burrill et al., 2013 protokollil ning pA16-eGFP plasmidi, mis oli kingitus koostööpartneritelt Yuri A. Bochkov ja James E. Gern (Department of Medicine, University of Wisconsin, USA).

Rinoviiruste paljundamiseks lisati 150 cm² koekultuuri pudelites 20 ml RPMI söötmes kasvavatele 70% konfluentsetele HeLa rakkudele (täpsem kirjeldus punktis 2.2.1.) 200 µl viiruslahust. Viiruslahusega HeLa rakke loksutati madalal kiirusel, toatemperatuuril 1h, seejärel lisati rakkudele veel 20 ml RPMI söödet ning järgnes inkubeerimine 37°C juures, keskkond sisaldas 5% CO₂, oli veeauruga küllastunud. 72h pärast inkubeerimist külmutati

rakud koos viirusosakesi sisaldava söötmega -80°C -ni ja seejärel sulatati. Külmutamise ja sulatamise etappi korrati 3 korda. Viimase sulatamise järel koguti rakud koos söötmega 50 ml tuubi, tsentrifuugiti 1000g juures 15 minutit ning supernatant, mis sisaldas viirusosakesi, jaotati 1,5 ml tuubidesse ning säilitati -20°C juures. Negatiivse kontrolli ehk mocki jaoks kasvatati HeLa rakke nagu eelnevalt kirjeldatud, kuid viiruslahust lisamata ning saadud supernatant külmutati sarnaselt viiruslahusele -20°C -ni.

Kõikide rinoviiruste tiitri määramiseks kasutati lõpp-punkti meetodit. Selleks külvati HeLa rakud 96-kannuga plaadile (täpsem kirjeldus punktis 2.2.1.). Igas reas oli kaheksa rakkudega kannu, millest iga kann sisaldas 200 μl söödet $\sim 10\,000$ rakuga. Rakkude loendamiseks kasutati TC20™ automatiseeritud rakulugejat (Bio-RAD, USA). Seejärel tehti paljundamise käigus saadud viiruslahusest 5-kordne lahjendusrida. 96-kannuga plaadi esimesesse ritta lisati igasse rakkude ja söötmega kannu 50 μl lahjendamata viiruslahust. Teise ritta lisati igasse kannu 50 μl viiruslahust, mis oli viiekordselt lahjendatud ning nii korrati kuni seitsmenda reani, kuhu lisati 50 μl lahjendusrea viimast viiruslahust. Kaheksas rida valiti kontrolliks ning sinna lisati igasse rakkudega kannu 50 μl RPMI söödete. Seejärel kasvatati rakke inkubaatoris (täpsem kirjeldus punktis 2.2.1.). Viis päeva pärast rakkude nakatamist viiruslahustega, määrati viiruse tiiter. Selleks hinnati söötme värvust ning rakkude eluvõimet. See tähendab, et võrreldi iga rea viirusega nakatunud rakke kaheksanda kontrollrea rakkudega. Kui viirus oli väga efektiivse nakatumisvõimega, muutusid HeLa rakud ümaraks ning nende elutegevus peatus ja seetõttu jäi ka söötme värvus roosaks-punaseks. Kui viiruslahus oli piisavalt lahjendatud, ei toimunud rakkude massilist nakatumist ning kärbumist, seetõttu kasutasid HeLa rakud söödete oma elutegevuseks ning söötme värvus muutus kollakaks. Saadud tulemused sisestati Reed ja Muench'i kalkulaatorisse ning saadi viirustiiter TCID₅₀ ehk viiruse annus, mis tappis 50% kultiveeritud rakkudest. Eksperimentide tarbeks nakatuskordsuse (MOI) arvutamisel lähtuti eeldusest, et $1e^6$ rakkudele lisatud 0,1 ml viiruslahust, mille TCID₅₀ väärtus on $1e^7$, vastas MOI 1-le.

2.2.3. Rakkude stimuleerimine tsütokiinidega

HBEC rakkude stimuleerimiseks külvati need 12 kannuga plaatidele ($\sim 30\,000$ rakku ühe kannu kohta). Rakkude plaatimine toimus punktis 2.2.1. kirjeldatud viisil ning rakkude loendamiseks kasutati TC20™ automatiseeritud rakulugejat (Bio-RAD, USA). 24h peale rakkude plaatimist stimuleeriti rakke tsütokiinidega IFN- γ (lõppkontsentratsiooniga 20 ng/ml, eBiosciences, USA), TNF- α (20 ng/ml, Biolegend, USA), IL-17A (10 ng/ml, Peprotech, UK), IL-22 (20 ng/ml, Peprotech, UK). Lisaks kasutati rakkude stimuleerimiseks tsütokiinide

kombinatsioone: TNF- α koos IL-17A-ga ning IFN- γ koos IL-22-ga. 48h tunni möödudes eemaldati stimuleeritud rakkudelt sööde, lisati 800 μ l fenozoli (A&A Biotechnology, Poola) ning hoiti -20°C juures kuni totaalse RNA eraldamiseni.

2.2.4. Rakkude stimuleerimine rinoviirusega

HBEC rakud külvati 24h enne eksperimenti 12 kannusele plaadile, ühes kannus oli ~30 000 rakku (meetod kirjeldatud punktis 2.2.1.). Katse esimese etapina aspireeriti rakkudelt sööde ning asendati värskega. Seejärel lisati rakkudele rinoviirus (A16; 1B või eGFP-A16, kõikide eksperimentide puhul oli MOI 0.01) ning rakke hoiti 48h inkubaatoris 37°C juures. HBEC rakkude negatiivse kontrollina kasutati „mocki“ ehk HeLa rakkude kasvusõdet, milles puudusid viirusosakesed.

2.2.5. Rakkude transfekteeerimine

Rakkude transfekteeerimiseks külvati, sarnaselt eelmistele eksperimentidele, rakud katsele eelneval päeval 12-kannustele plaatidele, kuid rakkude tiheduseks oli 40 000 rakku kannu kohta (täpsem kirjeldus punktis 2.2.1.). Transfekteeerimiseks kasutati PepFect14 peptiidi (100 μ M PepMic, Hiina), mille abil viidi rakkudesse miR-146a miim (20 μ M, DharmaconTM, USA) või negatiivne kontroll-miR miim (20 μ M, DharmaconTM, USA). Selleks inkubeeriti 15 pmol miR-146a või kontroll-miR miimi peptiidiga (suhtes 2:1) 50 μ l vees 1h toatemperatuuril ning seejärel lisati rakkudele. Transfekteeeritud rakke inkubeeriti 24h 37°C juures, seejärel eemaldati sööde ning rakke pesti PBSga.

2.2.6. RNA eraldamine

Inimese primaarsetest bronhiaalsetest rakkudest RNA eraldamiseks kasutati Total RNA Mini komplekti (A&A Biotechnology, Poola). Lühidalt, rakkudelt eemaldati sööde ning lisati 800 μ l fenozoli (A&A Biotechnology, Poola). Saadud rakulüsaat koguti 1,5 ml tuubidesse ja inkubeeriti 50°C juures 5 minutit. Järgmisena lisati proovidele 200 μ l kloroformi (AppliChem, Saksamaa) ja segati (pöörates tuube mõned korrad üle korgi). Seejärel inkubeeriti proove 3 minutit toatemperatuuril ja tsentrifuugiti 10 minutit 12 000 rcf juures (Eppendorf 5424 R, FA-45-24-11 rootor, Saksamaa). Saadud vesifaas eraldati, sellele lisati 250 μ l isopropanooli, segati ja kanti kolonnidele. Edasi toimus RNA eraldamine tootjapoolse protokoll järgi (A&A Biotechnology, Poola). Saadud RNA elueeriti 100 μ l milliQ vees ning NanoDrop 2000c spektrofotomeetri (Thermo Scientific, USA) abil mõõdeti eraldatud RNA kontsentratsioon ja hinnati puhtust.

2.2.7. RT-qPCR mRNA ekspressiooni uurimiseks

mRNA ekspressiooni uurimiseks sünteesiti RNA-le komplementaarne DNA (cDNA) kasutades pöördtranskriptaasi (RT) reaktsiooni. Alguses segati jää peal 96-kannuga plaadil RNA, Oligo(dT)₁₈ praimer (TAG Copenhagen, Taani) ning nukleotiidide segu (Thermo Scientific, USA). Saadud segu inkubeeriti 5 minutit 65°C juures ning asetati tagasi jääle. Seejärel lisati ülejäänud reaktsioonisegu komponendid (Tabel 1): RT ensüüm, puhver ning RNAasi inhibiitor (Thermo Scientific, USA). cDNA sünteesiks kasutati Mastercycler[®] nexus (Eppendorf, Saksamaa) termotsüklerit, mille abil inkubeeriti proove 1 tund 42°C juures ning seejärel 10 minutit 75°C juures. Saadud cDNA-d lahjendati 500 µl lõppruumalani ning proove kasutati koheselt või säilitati -20°C juures.

Tabel 1. Reaktsioonisegu koostis ühe RNA proovi kohta

Komponent	Kogus (µl) 1 proovi kohta
RNA proov	11,5
100 µM Oligo(dT) ₁₈	1
10x dNTP segu	2
5x RT puhver	4
RT ensüüm	1
RNAasi inhibiitor	0,5

Komplementaarsele DNA sünteesile järgnes RT-qPCR. Selleks segati omavahel 5x HOT FIREPol[®] EvaGreen[®] qPCR segu (Solis Biodyne, Eesti), F ja R praimerid (Tabel 4) (TAG Copenhagen, Taani) ja mQ vesi. Reaktsioonisegu täpsed komponendid on toodud välja Tabel 2. Reaktsioonide läbiviimiseks kasutati 384-kannuga plaati, 12 µl reaktsioonisegu ja ViiA[™] 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA) masinat. Kasutatud programm on toodud välja Tabel 3. Iga proov esines plaadil kolme kordusena ning tulemuste normaliseerimiseks kasutati referentsgeenina elongatsioonifaktor-1 alfat (EF1A).

Tabel 2. Reaktsioonisegu koostis

Komponent	Kogus (µl) 1 proovi kohta
5x EvaGreen [®] qPCR segu	2,4
Vesi	2,6
4 µM praimer (F+R segu)	1
Lahjendatud cDNA	6

Tabel 3. RT-qPCR programm

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

Tabel 4. Kasutatud praimerid

Praimer		Järjestus
CCL5	F	5' AGTCGTCTTTGTCACCCGAAA 3'
	R	5' TCTCCATCCTAGCTCATCTCCAA 3'
IRAK1	F	5' CACCTTCAGCTTTGGGGTGGTAGTG 3'
	R	5' CCAGCCTCCTCAGCCTCCTCT 3'
CARD10	F	5' AGTGTGCCCGAGCGGAAAGCC 3'
	R	5' GATGGCCCGGATCCTGCTGC 3'
IL-8	F	5' GCAGCTCTGTGTGAAGGTGCAGTT 3'
	R	5' TTCTGTGTTGGCGCAGTGTGGTC 3'
IFITM1	F	5' CAACACCCTCTTCTTGAAGTGG 3'
	R	5' GCCGAATACCAGTAACAGGATG 3'
IRF1	F	5' CAACTTCCAGGTGTCACCCA 3'
	R	5' CGACTGCTCCAAGAGCTTCA 3'
ICAM1	F	5' TCAGTCAGTGTGACCGCAGA 3'
	R	5' GCGCCGGAAAGCTGTAGATG 3'
CXCL1	F	5' TTGCCTCAATCCTGCATCCC 3'
	R	5' GGTCAGTTGGATTTGTCAGTGT 3'
CXCL5	F	5' CAGACCACGCAAGGAGTTCA 3'
	R	5' TCTTCAGGGAGGCTACCACT 3'
HBEGF	F	5' TTGTGCTCAAGGAATCGGCT 3'
	R	5' CAACTGGGGACGAAGGAGTC 3'
FGF2	F	5' AAAAACGGGGGCTTCTTCCT 3'
	R	5' TGTAGCTTGATGTGAGGGTCG 3'

MUC5B	F	5' GAGCGTCCAAGTACTCAGCA 3'
	R	5' GTTAGGACAGTGCAAGGGCA 3'
EF1A	F	5' CCACCTTTGGGTCGCTTTGCTGT 3'
	R	5' TGCCAGCTCCAGCAGCCTTCTT 3'

2.2.8. RT-qPCR miRNA ekspressiooni uurimiseks

miRNA ekspressiooni uurimiseks sünteesiti kõigepealt kõikidele mikroRNA-dele komplementaarne DNA. Selleks kasutati miR-146a, miR-146b, miR-155 ja let-7a spetsiifilisi terminaalse ligu praimereid (5x TaqMan® MicroRNA Assay (Life Technologies, US) ja pöördtranskriptsiooni. Täpne reaktsioonisegu koostis on toodud välja Tabel 5. Reaktsioonisegud valmistati jää peal 96-kannuga plaadil ning cDNA sünteesiks kasutati Mastercycler® nexus (Eppendorf, Saksamaa) termotsüklerit, mille abil inkubeeriti proove järgmise programmi järgi: 30 minutit 16°C, 30 minutit 42°C, 10 minutit 85°C ning lõpuks hoiti proove 20°C juures.

Tabel 5. Reaktsioonisegu koostis

Komponent	Kogus (µl) 1 proovi kohta
100 mM dNTP segu	0,028
100 µM RT ensüüm	0,200
10x RT puhver	0,600
RNAasi inhibiitor	0,100
Vesi	2,070
5x RT praimer	1
RNA proov	2

Pärast komplementaarse DNA sünteesi viidi läbi RT-qPCR. Selleks valmistati reaktsioonisegu, mis sisaldas 5x HOT FIREPol® Probe qPCR Mix Plus (ROX) (Solis Biodyne, Eesti), vett ja 20x miR-146a, miR-146b, miR-155 või let-7a TaqMan® MicroRNA Assay (Life Technologies, US) proove (Tabel 6). Igale 96-kannusel plaadil paiknevale cDNA-le lisati 17 µl eelmainitud reaktsioonisegu ning saadud proovid jaotati kahe kordusena 384-kannusele plaadile (10 µl kannu kohta). RT-qPCR viidi läbi ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA) masinaga ning kasutatud programm on kujutatud Tabel 7. Saadud tulemused normaliseeriti let-7a järgi.

Tabel 6. Reaktsioonisegu koostis

Komponent	Kogus (µl) 1 proovi kohta
5x HOT FIREPol [®] qPCR segu	4,4
Vesi	11,6
20x TaqMan [®] MicroRNA Assay	1

Tabel 7. RT-qPCR programm

Reaktsiooni etapp	Temperatuur (°C)	Kestvus	Korduste arv
Ensüümi aktiveerimine	95	15 min	1
Denaturatsioon	95	15 sek	40
Produkti paljundamine	60	1 min	

2.2.9. Läbivoolutsütomeetria

Läbivoolutsütomeetria abil uuriti, kui efektiivselt võimendatult GFP-d ekspresseeriv rinoviiirus (eGFP-A16) HBEC rakke nakatab. 24h tundi peale miR-146a või kontroll-miR miimiga transfekteerimist (kirjeldatud punktis 2.2.5.) lisati rakkudele värske sööde ning nakatati eGFP-A16 viirusega (MOI 0.01). Rakud asetati tagasi inkubaatorisse (37°C juurde) ning hoiti seal veel järgnevad 48h. Seejärel eemaldati rakkudelt sööde, pesti PBS-ga, lisati rakkudele 250 µl 2x trüpsiini (*Trypsin-EDTA* in PBS, GE Healthcare, UK) ühe kannu kohta ning peale 4 minutilist 37°C juures inkubeerimist lisati kannudesse 500 µl trüpsiini neutraliseerijat (*Trypsin Neutralizer Solution*, Invitrogen, USA) ja 500 µl külma PBS-i. Edasi koguti rakud 2 ml tuubidesse ning tsentrifuugiti 4°C ja 250 rcf juures (Eppendorf 5424 R, rootor FA-45-24-11, Saksamaa) 5 minutit. Rakkude pesemiseks eemaldati supernatant ning lisati 1 ml PBS-i, suspendeeriti. Etappi korrati 3 korda ning peale viimast tsentrifuugimist suspendeeriti rakud 300 µl PBS-ga. Proovide analüüsimiseks kasutati BD LSRFortessa (BD Biosciences, USA) läbivoolutsütomeetrit ning iga proovi kohta salvestati 10 000 sündmust.

2.2.10. Statistiline analüüs

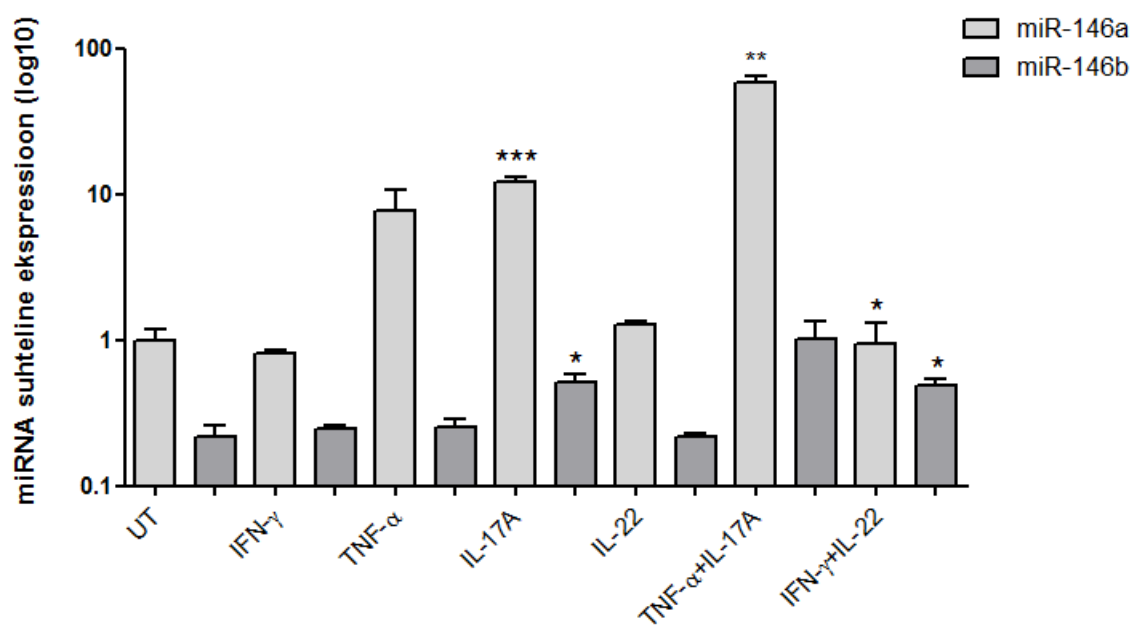
Tulemuste visualiseerimiseks ja analüüsimiseks kasutati GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc, USA) programmi. Erinevatel tingimustel saadud tulemusi võrreldi T-testi abil ning märkimisväärseks loeti erinevused, mille $P < 0.05$. Joonistel on P väärtused tähistatud järgmiselt: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$. Lisaks on joonistele lisatud tulemuste standardvead (SEM, *Standard Error of the Mean*) ning ühes katses tehtud kordused on tähistatud sümboliga N.

2.3. Tulemused

2.3.1. Proinflammatoorsed tsütokiinid mõjutavad miR-146a ja miR-146b ekspressiooni bronhiepiteeli rakkudes

Varasemad publikatsioonid on näidanud, et mitmed proinflammatoorsed tsütokiinid ning nende kombinatsioonid mõjutavad miR-146a ja miR-146b ekspressiooni inimese primaarsetes rakukultuurides ja erinevates rakuliinides (Perry, et al. 2008) (Rebane, Runnel, et al. 2014). Antud töös uuriti, kas tsütokiinid IFN- γ , TNF- α , IL-17A, IL-22 ning nende kombinatsioonid mõjutavad miR-146a ja miR-146b ekspressiooni terve doonori bronhiepiteeli rakkudes.

miR-146a ekspressiooni indutseeris enim TNF- α ja IL-17A kombinatsioon (kasvas 57,35 (\pm 8,65) korda), kuid positiivset toimet omas ka IL-17A üksi või kombinatsioon tsütokiinidest IFN- γ ja IL-22 (Joonis 5). miR-146b ekspressioonile oli suurim mõju kombineeritult IFN- γ ja IL-22 puhul, kus ekspressioon tõusis 3,59 (\pm 0,07) korda, kuid see jäi siiski ligikaudu 16 korda madalamaks kui miR-146a ekspressioon (Joonis 5).



Joonis 5. Tsütokiinide toime miR-146a/b ekspressioonile HBEC rakkudes. Rakke stimuleeriti 48h näidatud tsütokiinidega. RT-qPCR meetodi abil määrati miRNA ekspressioon ning tulemused normaliseeriti miRNA let-7a ekspressiooni ja töötlemata kontrolli miR-146a ekspressiooni suhtes (UT=1). Graafikutel on kujutatud tulemused neljast paralleelsest stimulatsioonist, nende keskmised väärtused ja standardviga. Tulemuste statistiliseks analüüsimiseks kasutati T-testi (*Unpaired T-test*), * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

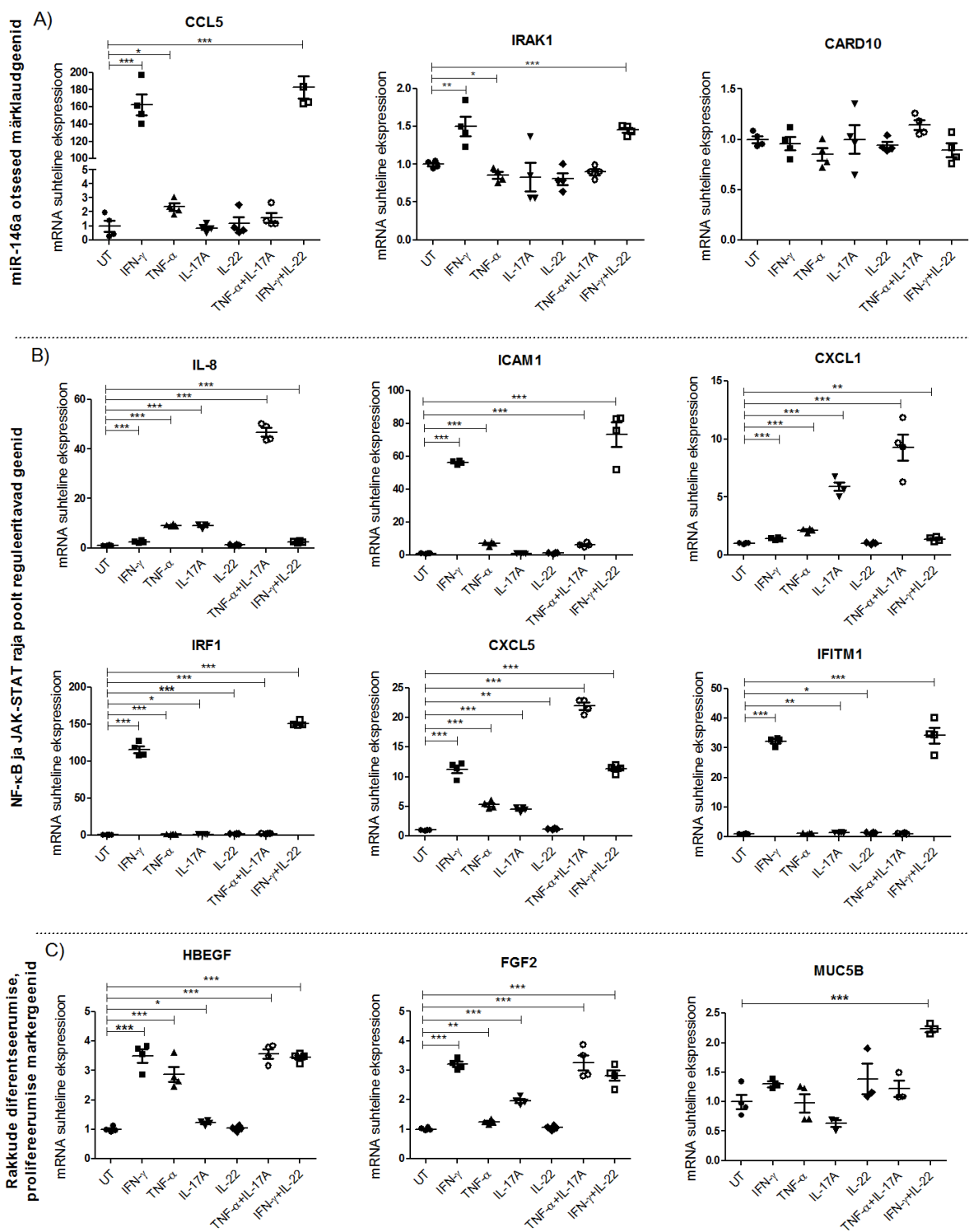
2.3.2. Tsütokiinid stimuleerivad miR-146a sihtmärkgeene ning RV poolt stimuleeritud geenide ekspressiooni bronhiepiteeli rakkudes

Eelmises katses nähti, et proinflammatoorsed tsütokiinid IFN- γ , TNF- α , IL-17A ja IL-22 mõjutasid enim miR-146a ekspressiooni (Joonis 5). Seetõttu uuriti järgmisena, kas samad tsütokiinid mõjutavad ka antud mikroRNA valitud sihtmärkgeenide avaldumist.

Joonis 6A on näha, et miR-146a otseste sihtmärkgeenide CCL5 ja IRAK1 ekspressioon kasvas enim vastusena IFN- γ või IFN- γ ja IL-22 kombineeritud stimulatsioonile. CCL5 ekspressioonitase suurenes vastavalt 162,7 (\pm 12,3) või 183,0 (\pm 13,0) korda ning IRAK1 mRNA tase 1,5 (\pm 0,1) korda. Ükski uuritav tsütokiin ei mõjutanud CARD10 ekspressiooni.

Edasi analüüsisime, kas ka geenide, mille ekspressiooni võiks mõjutada RV infektsioon, avaldumise tase on uuritavate tsütokiinide poolt mõjutatud. Vaatluse alla võtsime NF- κ B reguleeritud geenide IL-8, ICAM1, CXCL1 ning JAK-STAT signaaliraja poolt mõjutatud geenide IRF1, CXCL5 ja IFITM1 ekspressiooni (Jakiela, Gielicz, et al. 2014) (Rebane, Runnel, et al. 2014). IL-8 ekspressioon oli suurenenud kõikide kasutatud tsütokiinide puhul (v.a IL-22 stimulatsioon), kuid suurim mõju oli TNF- α ja IL-17A kombinatsiooni korral, kus ekspressioon suurenes 46,9 (\pm 1,7) korda. ICAM1, IRF1 ning IFITM1 avaldumisele oli suurim mõju IFN- γ ja IL-22 kombineeritud stimulatsioonil, kus ekspressioon kasvas vastavalt 72,4 (\pm 7,3), 149,8 (\pm 1,8) ja 33,1 (\pm 2,6) korda. CXCL1 ekspressiooni puhul oli märkimisväärsim mõju tsütokiinidel IL-17A ning TNF- α , kus geeni avaldumine suurenes 9,3 (\pm 1,1) korda. CXCL5 ekspressiooni stimuleerisid kõik kasutatud tsütokiinid, kuid kõrgeima ekspressiooni tõusu põhjustas TNF- α ja IL-17A kombinatsioon, kus erinevus võrreldes mittestimuleeritud rakkudega oli 20,9 (\pm 0,6) kordne (Joonis 6B).

Astma ja hingamisteede kroonilise põletiku üheks iseloomulikuks sümptomiks peetakse kopsuepiteeli histoloogilist muutumist (Jakiela, Gielicz, et al. 2014), mistõttu analüüsisime järgnevalt bronhiepiteeli rakkude diferentseerumist ning prolifereerumist mõjutavate geenide hepariini siduva epidermaalse kasvufaktori (HBEGF) ning fibroblasti kasvufaktori (FGF2) ekspressiooni (Joonis 6C). Lisaks on teada, et põletiku korral võib kopsuepiteeli kattev limakiht pakseneda (Fahy ja Dickey 2010). Seetõttu uuriti ka tsütokiinide mõju mutsiin 5B (MUC5B) ekspressioonile, mis on üheks limakihi peamiseks koostisosaks.



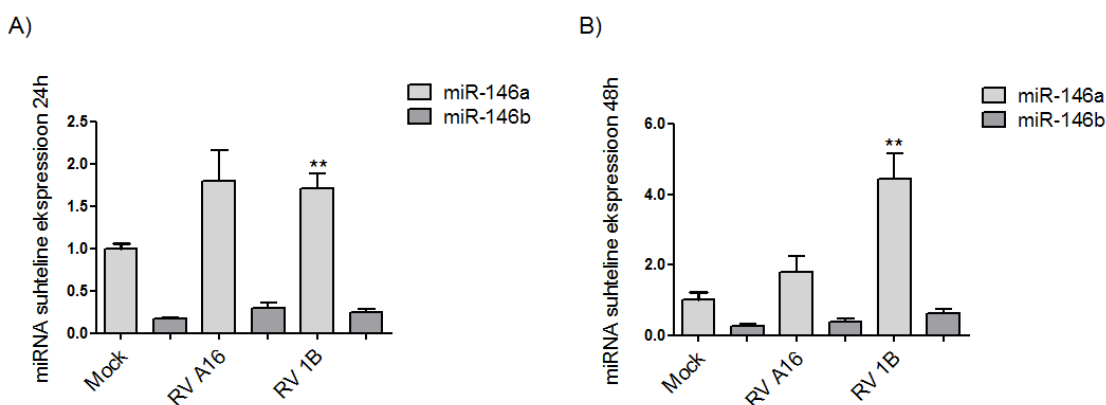
Joonis 6. Tsütokiinide mõju miR-146a otseste sihtmärkgeenide ja RV poolt mõjutatavate geenide ekspressioonile HBEC rakkudes. Rakke stimuleeriti 48h näidatud proinflammatoorsete tsütokiinidega. RT-qPCR meetodil määrati mRNA ekspressioon ning tulemused normaliseeriti koduhoidja geeni EF1A ekspressiooni ja töötlemata kontrolli (UT=1) suhtes. Graafikutel on kujutatud tulemused nende keskmiste väärtustega ja standardveaga. Statistiline analüüs viidi läbi T-testi abil, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$. N=4.

Tulemused joonisel 6C näitavad, et kõik uuritavad tsütokiinid (v.a IL-22) stimuleerisid nii HBEGF kui ka FGF2 avaldumist. Epidermaalse kasvufaktori puhul omasid suurimat toimet IFN- γ , TNF- α ning kombinatsioonid TNF- α , IL-17A või IFN- γ , IL-22, kus ekspressioon oli kõrgem keskmiselt 3,4 (\pm 0,2) korda. Samas, FGF2 ekspressiooni mõjutasid enim IFN- γ , IL-17A ja kombineeritud tsütokiinid ning ekspressioon kasvas keskmiselt 2,8 (\pm 0,2) korda. MUC5B geeni avaldumist indutseeriti märkimisväärselt vaid IFN- γ ja IL-22 koosmõjul, kus ekspressioon suurenes 2,2 (\pm 0,1) korda.

Kokkuvõttes näidati, et proinflammatoorsete tsütokiinide toimel suurenes bronhiepiteeli rakkudes nii miR-146a otseste sihtmärkgeenide ekspressioon kui ka NF- κ B ning JAK-STAT signaaliraja poolt mõjutatavate geenide ekspressioon. Samuti mõjutavad valitud proinflammatoorsed tsütokiinid bronhiepiteeli rakkude diferentseerumist ning proliferereerumist mõjutavate geenide taset.

2.3.3. Rinoviirus indutseerib mikroRNA-de ekspressiooni HBEC rakkudes

Arvatakse, et astma teke võib olla seotud hingamisteede infektsioonidega. Seetõttu uuriti järgnevalt, kas ja kuidas mõjutavad rinoviirused uurimiseks valitud mikroRNA-de ekspressiooni inimese bronhiepiteeli rakkudes. Selleks stimuleeriti rakke RV A16 või 1B-ga ning tuvastati, et miR-146a ekspressioon suurenes rinoviirus 1B toimel nii 24h (Joonis 7A) kui ka 48h ajapunktis (Joonis 7B) vastavalt 1,7 (\pm 0,2) ja 4,4 (\pm 0,7) korda.



Joonis 7. Rinoviirus A16 ja 1B mõju miR-146a ja miR-146b ekspressioonile inimese bronhiepiteeli rakkudes. Rakke nakatati näidatud rinoviirustega (RV) 24h või 48h. miRNA ekspressioon tuvastati kasutades RT-qPCR-i meetodit ning tulemused normaliseeriti miRNA let-7a ekspressiooni ja negatiivse kontrolli (mock=1) suhtes. Kujutatud on nelja paralleelse katse keskmised väärtused ja standardviga. Tulemuste statistiliseks analüüsiks kasutati T-testi, ** P < 0,01. N=4.

Ka RV A16 stimuleeris näiliselt miR-146a ekspressiooni (Joonis 7A), kuid erinevus polnud statistiliselt oluline. Lisaks leiti sarnaselt tsütokiinidega stimuleerimise katsele, et ka rinoviiruse infektsiooni korral oli miR-146a ekspressiooni tase tunduvalt kõrgem kui miR-146b ekspressioon.

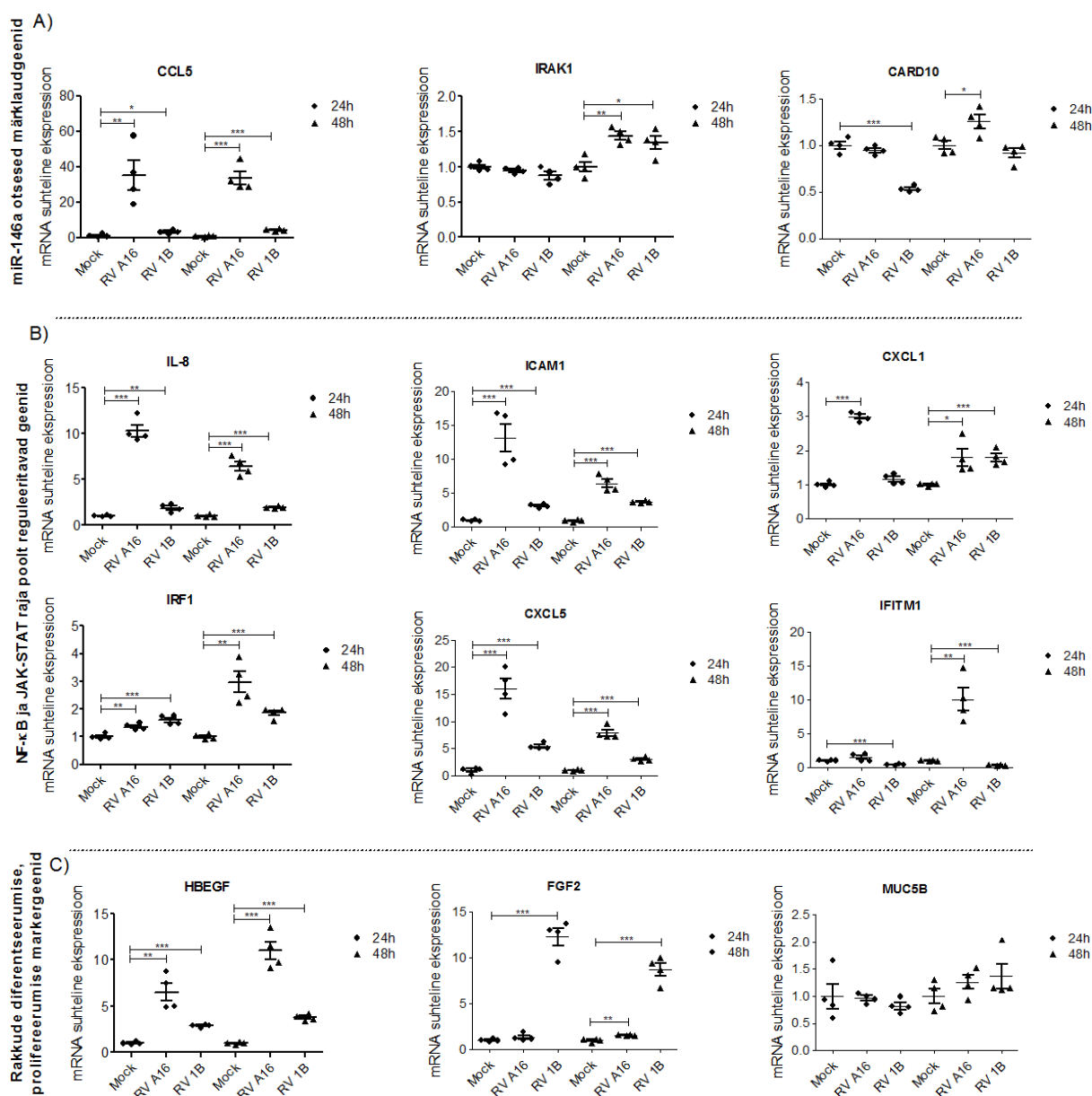
2.3.4. RV mõjutab miR-146a/b märklaudgeenide ning NF- κ B ja JAK-STAT signaaliraja poolt aktiveeritavate geenide avaldumist

Järgmisena analüüsiti, kuidas rinoviiruse tüved A16 ja 1B mõjutavad miR-146a märklaudgeenide ning NF- κ B või JAK-STAT signaaliraja poolt aktiveeritavate geenide avaldumist kasutatavas katsesüsteemis. Selleks stimuleeriti rakke 24h või 48h viirustega ning tuvastati uuritavate geenide ekspressioon RT-qPCR-i abil. Joonis 8A on kujutatud mikroRNA-146a otseste sihtmärkgeenide CCL5, IRAK1 ja CARD10 ekspressioon. Rinoviirus A16 toimel suurenes CCL5 ekspressioon võrreldes negatiivse kontrolliga keskmiselt 33,4 (\pm 6,1) korda. RV 1B stimuleeris samuti CCL5 ekspressiooni, mis kasvas 48h stimulatsiooni korral 3,3 (\pm 0,4) korda. Rinoviiruste mõju IRAK1-le avaldus 48h stimulatsiooni korral, kus ekspressioon kasvas RV A16 tõttu 1,4 (\pm 0,1) ja RV 1B tõttu 1,3 (\pm 0,1) korda. CARD10 avaldumine vähenes RV 1B infektsiooni tõttu ligikaudu 2 korda ning kasvas RV A16 toimel 1,3 (\pm 0,1) korda.

Nagu varasemates töödes näidatud (Kim, et al. 2000) (Papadopoulos, et al. 2001) (Laza-Stanca, et al. 2006), stimuleerisid RV-d ka mitmete NF- κ B ja JAK-STAT signaaliraja geenide ekspressiooni taset (Joonis 8B). Rinoviirus A16 infektsioon indutseeris 24h järel nii IL-8, ICAM1, CXCL1 kui ka CXCL5 ekspressiooni ning seda vastavalt 10,3 (\pm 0,7), 13,1 (\pm 2,0), 3,0 (\pm 0,1) ja 16,0 (\pm 1,9) korda. 48h viirusstimulatsiooni puhul suurenes ka IRF1 ja IFITM1 avaldumine – 3,0 (\pm 0,4) ja 10,0 (\pm 1,7) korda. Rinoviirus 1B nakkus põhjustas rakkudes 24h järel suurenenud IL-8, ICAM1, IRF1, CXCL5 avaldumise ning 48h stimulatsiooni korral oli uuritavate geenide ekspressioon võrreldes negatiivse kontrolliga 2,0 (\pm 0,1), 3,7 (\pm 0,1), 1,9 (\pm 0,1) ja 3,1 (\pm 0,2) korda suurem.

Järgmisena analüüsisime, kas kasutatavas katsesüsteemis on rinoviirus võimeline esile kutsuma hingamisteede remodelleerimisega seotud geenide ekspressiooni muutusi. Taaskord kasutati 24h ja 48h ajapunkte ning vaadeldi viirusinfektsiooni toimet bronhiepiteeli rakkude remodelleerimist suunavate geenide HBEGF, FGF2 ja MUC5B ekspressioonile (Joonis 8C). Rinoviirus A16 infektsioon indutseeris HBEGF ekspresseerumist primaarsetes bronhiepiteeli rakkudes: 24h järel 6,5 (\pm 1,0) korda ning 48h tunni möödudes oli ekspressioon suurenenud 11,0 (\pm 1,0) korda. RV 1B toimel suurenes epidermaalse kasvufaktori (HBEGF) ekspressioon

3,3 (\pm 0,1) korda ning vastupidiselt RV A16 tüvele suurenes ka FGF2 ekspressioon keskmiselt 10,5 (\pm 0,9) korda. Mutsiini tootmisele ei avaldanud uuritavad rinoviiruse tüved märkimisväärset mõju.



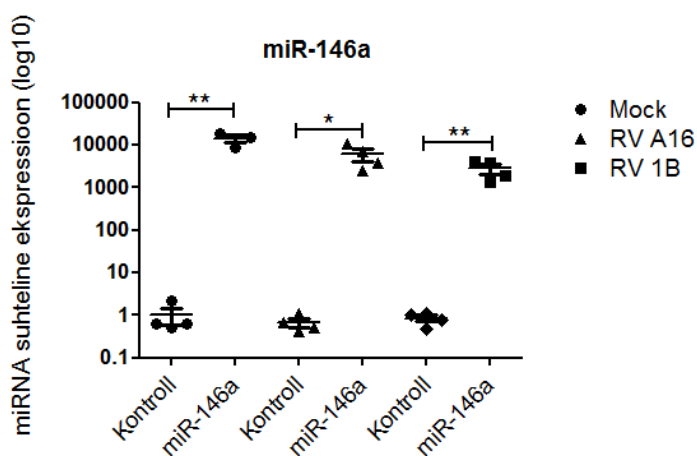
Joonis 8. Rinoviiruse poolt esile kutsutud geeniekspressiooni muutused HBEC rakkudes.

Rakke stimuleeriti rinoviirus (RV) A16 või 1B-ga 24h või 48h. mRNA ekspressiooni tuvastamiseks kasutati RT-qPCR-i meetodit. Tulemused normaliseeriti koduhoidja geeni EF1A ekspressiooni ja negatiivse kontrolli (mock=1) suhtes. Tulemused on kujutatud keskmiste väärtuste ja standardveaga. Statistiliseks analüüsimiseks kasutati T-testi, kus * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$. N=4.

Kokkuvõttes näitavad need tulemused, et rinoviiruse infektsiooni toimel NF- κ B ja JAK-STAT signaaliraja poolt mõjutatud geenide, hingamisteede remodelleerimisega seotud geenide ning miR-146a/b otseste sihtmärkgeenide ekspressioon enamasti suureneb.

2.3.5. PepFect14 on efektiivne meetod miRNA miimide transpordiks HBEC rakkudesse

Et uurida miRNA mõju rakukultuurides, kasutatakse sageli meetodeid, mis põhinevad miRNA miimide transfektsioonil. Seetõttu kontrollisime järgnevalt rakku siseneva peptiidi PepFect14 sobivust miRNA miimide transportimiseks HBEC rakkudesse rinoviiruse nakkuse korral. Joonis 9 kujutatud tulemused näitavad, et HBEC rakud, millele lisati PepFect14 ja miR-146a miimi kompleksid, sisaldasid tuhandeid kordi rohkem miR-146a miimi võrreldes kontrolliga – „mock“ puhul oli antud miRNA ekspressioon 14030 (\pm 2392) korda, rinoviirus A16-ga stimuleeritud rakkudes 6085 (\pm 1918) ja RV 1B-ga stimuleeritud rakkudes 2804 (\pm 702,7) korda kõrgem. „mock“ katses lisati viiruse asemel HBEC rakkudele RV-ga mitte nakatatud HeLa rakkude kasvusöödet, mida oli käsitletud viiruse eraldamise protokolliga järgides (täpsem kirjeldus punktis 2.2.2.). Need tulemused kinnitavad, et PepFect14 on sobiv transporter miRNA miimide transfektsiooniks bronhiepiteeli rakkudesse.



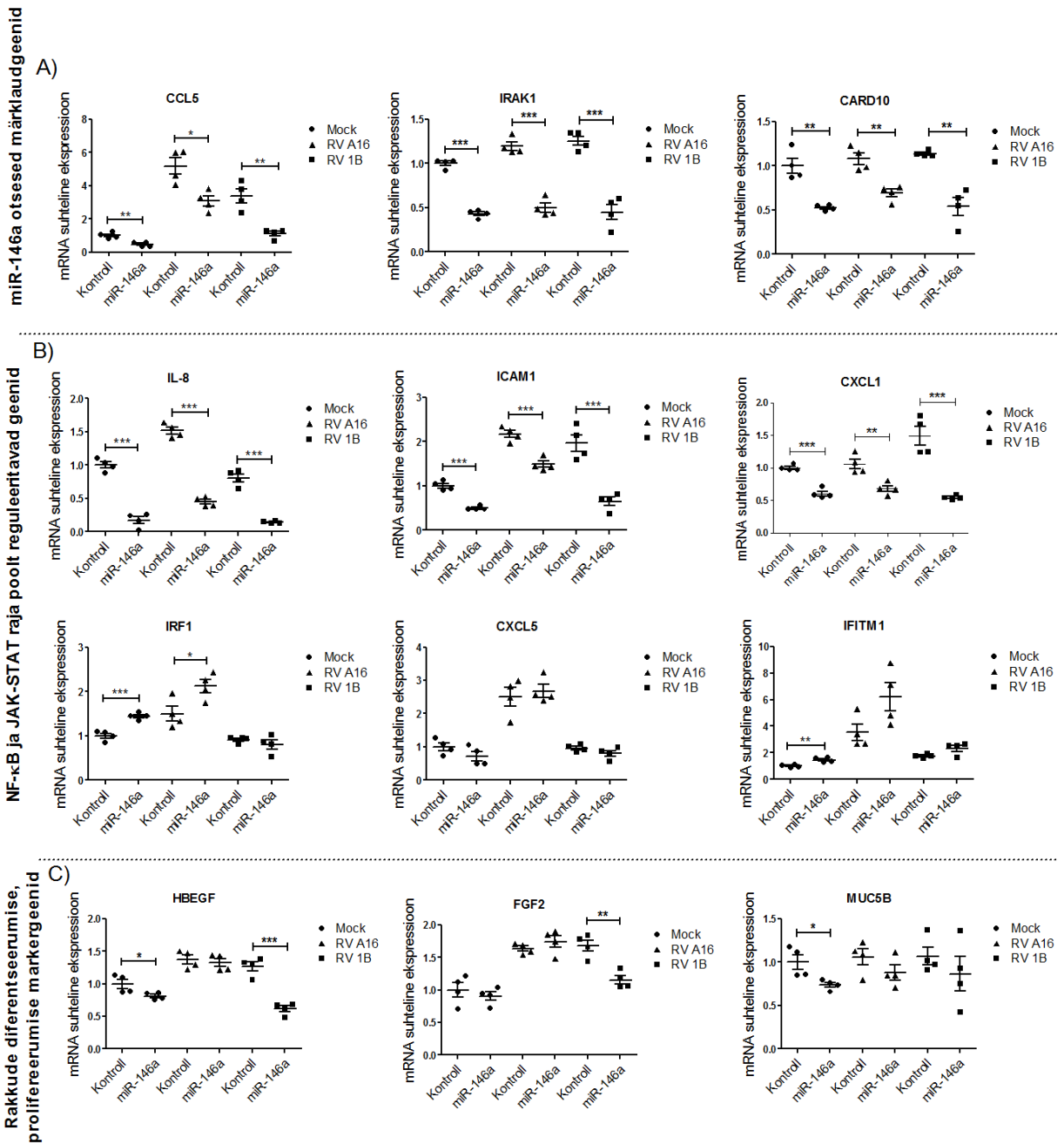
Joonis 9. PepFect14 on sobiv transporter miR-146a miimi transfektsiooniks HBEC rakkudesse. Inimese bronhiepiteeli rakke transfektsioneeriti miR-146a miimi (miR-146a) või kontroll-miRNAga (kontroll). 24h peale transfektsiooni asendati sööde uuega ning rakkudele lisati viiruslahust. 48h peale rinoviirustega nakatamist tuvastati miRNA ekspressioon RT-qPCR-i meetodit kasutades. Tulemused normaliseeriti koduhoidja geeni let7a ekspressiooni, negatiivse kontroll-miRNA-ga transfektsioneeritud ja nakatatud rakkude (kontroll=1) suhtes. Tulemuste statistiliseks analüüsimiseks kasutati T-testi, kus * P < 0,05; ** P < 0,01. N=4

2.3.6. miR-146a reguleerib rinoviiruse indutseeritud geeniekspressiooni

Järgnevalt soovisime välja selgitada, kas miR-146a mõjutab viirusvastust rinoviirusega nakatatud HBEC rakkudes. Selleks transfekteerisime bronhiepiteeli rakke miR-146a või kontroll miRNA-ga, siis lisasime rakkudele rinoviirus A16 või 1B ning seejärel analüüsisime miR-146a märklaudgeenide ja RV poolt indutseeritud geenide ekspressiooni. Joonis 10A näitab, et mikroRNA-146a inhibeeris kõikides tingimustes oma sihtmärkgeenide ekspressiooni: CCL5, IRAK1 ning CARD10 ekspressioon vähenes miR-146a toimetel keskmiselt 2,4 ($\pm 0,5$), 2,6 ($\pm 0,1$) ja 1,8 ($\pm 0,1$) korda võrreldes vastavate kontroll-transfektsioonidega.

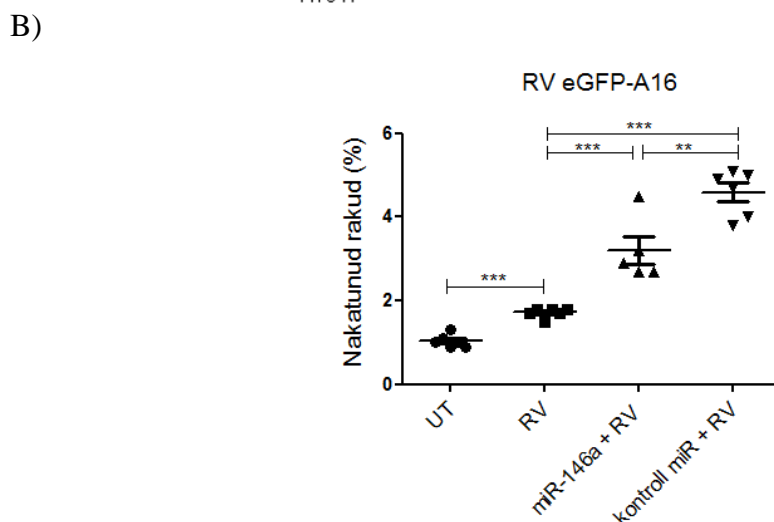
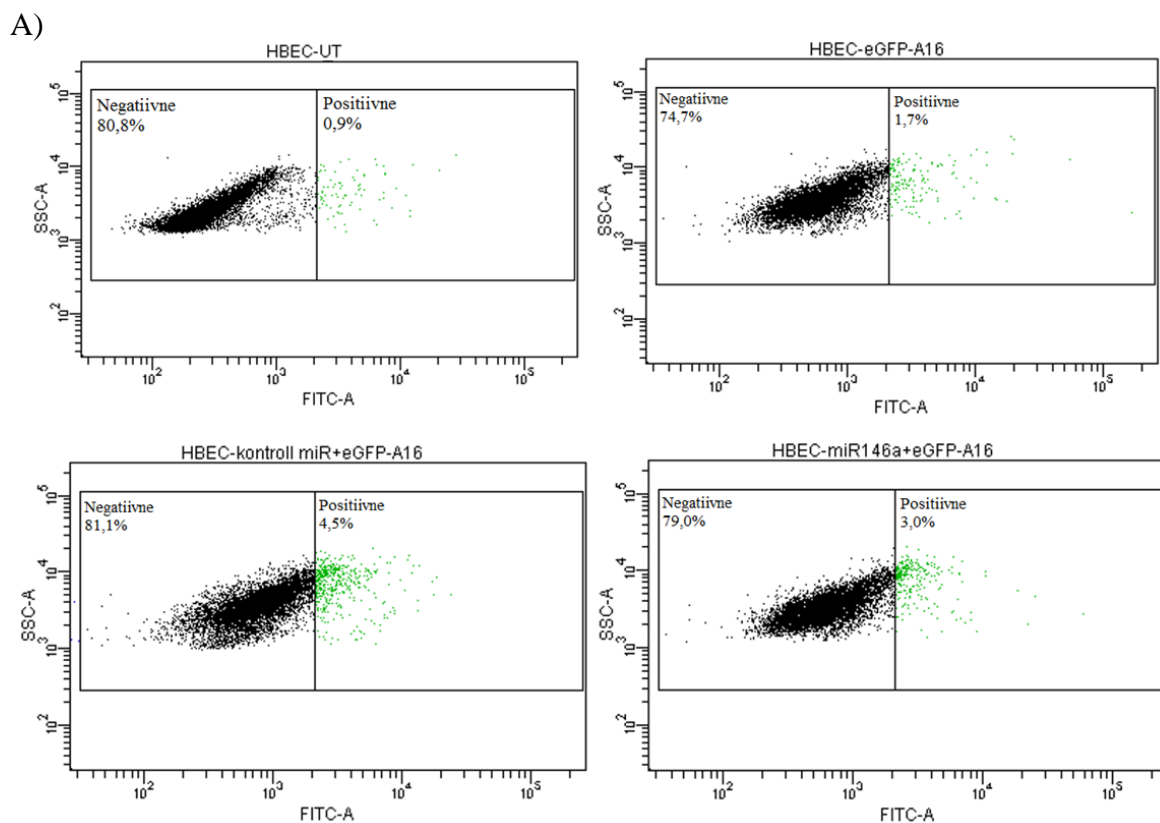
Rinoviirus A16 stimuleeritud NF- κ B signaaliraja geenide IL-8, ICAM1, CXCL1 ekspressioon oli keskmiselt 3,4 ($\pm 0,1$), 1,5 ($\pm 0,1$) ja 1,6 ($\pm 0,1$) korda väiksem miR-146a miimiga transfekteeritud rakkudes võrreldes vastavate kontroll-transfektsioonidega. Teise rinoviiruse tüve (1B) indutseeritud geeniekspressioon oli miR-146a miimiga transfekteeritud rakkudes samuti väiksem võrreldes kontroll-transfekteeeritud rakkudega – IL-8 puhul 5,7 ($\pm 0,1$) ICAM1 3,0 ($\pm 0,1$) ja CXCL1 2,7 ($\pm 0,1$) korda. JAK-STAT raja poolt reguleeritud geeni IRF1 ekspressioon suures mikroRNA-146a miimi juuresolekul rinoviirus A16 infektsiooni ajal 1,4 ($\pm 0,2$) korda ning mock nakatatud rakkudes 1,5 ($\pm 0,1$) korda võrreldes vastavate kontroll-transfektsioonidega. IFITM1 ja CXCL5 avaldumine ei muutunud miR-146a transfektsiooni toimetel võrreldes kontroll-miimiga transfekteeritud rakkudega üheski uuritud tingimuses statistiliselt oluliselt.

Viimasena uuriti kopsuepiteeli remodelleerimisega seotud geenide avaldumist ning nähti, et rinoviiruse nakkuse ajal vähendab miR-146a üleekspressioon nii HBEGF kui ka FGF2 ekspressiooni – HBEGF avaldumine vähenes RV 1B infektsiooni korral 2,1 ($\pm 0,1$) korda ja „mock“ nakatatud rakkude puhul 1,2 ($\pm 0,1$) korda võrreldes vastavate kontroll-transfektsioonidega ning FGF2 ekspresseerumine kahanes 1,5 ($\pm 0,1$) korda. MUC5B puhul erinevusi geeniekspressioonis üheski tingimuses ei täheldatud.



Joonis 10. miR-146a üleekspressiooni mõju viirusvastusele RV-ga nakatatud HBEC rakkudes. Rakke transfecteeriti miR-146a miimi (miR-146a) või kontroll-miRNA-ga (kontroll). 24h peale transfectiooni asendati sööde uuega ning rakke nakatati 48h rinoviirustega. mRNA ekspressioon tuvastati RT-qPCR-i meetodit kasutades ja normaliseeriti koduhoidja geeni EF1A ekspressiooni ja negatiivse kontroll-miRNA (kontroll=1) suhtes. Tulemuste statistiliseks analüüsimiseks kasutati T-testi, kus * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$. N=4.

Eelnev eksperiment näitas, et miR-146a on võimeline vähendama rinoviirus A16 retseptori (ICAM1) ekspressiooni inimese primaarsetes bronhiepiteeli rakkudes. Samuti on teada, et viirustega nakatumise efektiivsus sõltub viirusvastusest rakkudes. Seetõttu sooviti järgmisena teada saada, kas miR-146a üleekspressiooni korral esineb muutuseid efektiivsuses, millega RV rakke nakatab. Selleks transfecteeriti HBEC rakke miR-146a miimiga, seejärel nakatati eGFP-d ekspresseeriva rinoviirusega (eGFP-A16) ja läbivoolu-tsütomeetria abil analüüsiti rakkudes viiruse olemasolu (st fluorestsentsi olemasolu). Saadud tulemused on kujutatud Joonis 11.



Joonis 11. eGFP-A16 nakatamise efektiivsus transfecteeritud HBEC rakkudes. Rakke transfecteeriti miR-146a või kontroll-miRNA miimiga. 24h pärast transfectiooni lisati

rakkudele uus sõõde ning eGFP-A16 viirus (MOI 0,01). 48h pärast nakatamist analüüsiti läbivoolutsütomeetri abil fluorestsentsi olemasolu rakkudes. A) Tulemused on kujutatud histogrammi ja dot plotina, graafikutele on protsendina märgitud positiivsete fluorestsentsi kiirgavate rakkude arv. B) T-testi abil analüüsitud tulemused, milles ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$. N=6.

Katse näitas, et võrreldes töötlemata rakkudega, nakatuvad miRNA miimidega transfekteeritud rakud rinoviirusesse rohkem. Kontroll-miRNA-ga transfekteeritud bronhiepiteeli rakkudest oli ligikaudu 4,58 ($\pm 0,22$)% rinoviirusega nakatunud. Samas miR-146a miimiga transfekteeritud rakkudest nakatus vaid 3,20 ($\pm 0,34$)%. Kokkuvõttes näitavad need tulemused, et miR-146a mõjutab bronhiepiteeli rakkude viirusvastust ning nende nakatumise efektiivsust rinoviirus A16-ga.

2.4. Arutelu ja järeldused

Astma on laialtlevinud hingamisteede haigus, mille tüüpilisteks sümptomiteks on bronhide silelihaste kokkutõmmetest ja suurenenud limaeritusest tingitud kõhimine ning vilisev hingamine (Lemanske Jr ja Busse 2010) (Locksley 2010). Arvatakse, et astma teke ja ägenemine on seotud rinoviirusinfektsioonidega, mis allergeenidega koostoimes põhjustavad hingamisteedes kroonilise põletiku tekke (Kusel, et al. 2007) (Jackson, Gern ja Lemanske Jr 2016). Kuna varem on näidatud, et miR-146a/b on võimelised mõjutama põletikulisi protsesse ning viirusnakkuse poolt aktiveeritavate geenide ekspressiooni mitmetes erinevates raku tüüpides (Taganov, et al. 2006) (Perry, et al. 2008) (Rebane ja Akdis 2013), siis uurisime antud magistritöös miR-146a/b ekspressiooni regulatsiooni ning kas ja kuidas miR-146a mõjutab inimese primaarsete bronhiepiteeli rakkude viirusvastust ja rakkude nakatumist rinoviirusinfektsiooni korral.

Töö esimesed eksperimendid viitasid, et uurimiseks valitud mikroRNA-d miR-146a/b osalevad bronhiepiteeli rakkude põletikuliste protsesside regulatsioonis, sest vastusena proinflammatoorsete tsütokiinide IFN- γ , TNF- α , IL-17A ja IL-22 stimulatsioonile kasvas rakkudes nii miR-146a kui miR-146b ekspressioon. Kuna miR-146a ekspressioonitase oli võrreldes miR-146b ekspressiooniga ligi 16 korda kõrgem, võib oletada, et antud miRNA-l on bronhiepiteeli rakkudes olulisem funktsioon.

Erialasest kirjandusest on teada, et miR-146a ekspressioon sõltub tuumafaktor κ B vahendatud signaaliraja aktiivsusest ning miR-146b avaldumine on reguleeritud läbi STAT signaliseerimise (Perry, et al. 2008) (Williams, et al. 2008) (Lu ja Rothenberg 2013). Seda silmas pidades, uuriti samade proinflammatoorsete tsütokiinide mõju erinevatele NF- κ B ja JAK-STAT signaaliraja poolt mõjutatud geenide ekspressioonile. Tulemustest selgus, et uuritavad tsütokiinid ja nende kombinatsioonid indutseerisid HBEC rakkudes põletikuliste protsessidega seotud geenide CCL5 ja IL-8 avaldumist, mille ülesanneteks on värvata põletikukoldesse eosinofiile ja neutrofiile. Tsütokiine omavahel kombineerides tekkis bronhiepiteeli rakkudes tugevam immuunvastus, mis viitab, et uuritavatel tsütokiinidel esineb teatud sünergeetiline efekt. IFN- γ ja IL-22 stimulatsioon põhjustas oodatult interferooniraja koosseisu kuuluvate geenide IRF1 ja IFITM1 ekspresseerumise. Lisaks kinnitasime läbiviidud katsetega, et meie poolt uuritud tsütokiinid kutsusid bronhiepiteeli rakkudes esile kasvufaktorite ja mutsiini ekspresseerumise, mida seostatakse kopsuepiteeli histoloogilise muutumisega, mis on astmale ja kroonilisele põletikule omane tunnus (Jakiela, Gielicz, et al.

2014). Lisaks näitasid kirjeldatud katsed, et kõik kasutatud tsütokiinid töötasid HBEC rakkude stimulatsioonil.

Kuna antud magistritöö esmaseks eesmärgiks oli uurida, kas ja millist rolli omavad miR-146a/b bronhiepiteeli rakkudes rinoviiruse nakkuse puhul, hinnati järgmisena rinoviiruse nakkuse mõju HBEC rakkudele. Tulemused näitasid, et nii RV tüvi A16 kui ka 1B indutseerisid miR-146a ja vähesel määral ka miR-146b ekspressiooni HBEC rakkudes. Samuti indutseerisid need mõlemad rinoviirustüved NF- κ B vahendatud geenide IL-8, ICAM1 ning CXCL1 ekspresseerumist. Rakkude infektsiooni korral RV-dega, kasvas ka STAT transkriptsioonifaktori poolt reguleeritud geenide IRF1, CXCL5 ning IFITM1 ekspressioon. Samuti selgus, et RV nakkuse korral võib olla HBEC rakkude diferentseerumine ja proliferatsioon soodustatud, sest nii fibroblasti kasvufaktor 2 (FGF2) kui ka hepariini siduva epidermaalse kasvufaktori (HBEGF) ekspressioon suurenes. Kuna samad epiteeli remodelleerimisega seotud geenid ekspresseerusid ka rakkude stimuleerimisel proinflammatoorsete tsütokiinidega, võib järeldada, et bronhiepiteeli histoloogiline muutumine on tingitud pigem üldistest põletikulistest protsessidest ning tegemist pole otseselt viirusnakkuse tagajärgiga. Nendest tulemustest lähtuvalt võib arvata, et rinoviiruse infektsioon põhjustab bronhiepiteeli rakkudes NF- κ B signaaliraja kaudu põletiku teket ning viiruse leviku piiramiseks indutseeritakse rakkudes ka interferoonid ja nende poolt mõjutatud geenide ekspressioon. Kuna rinoviirused indutseerivad rakkudes NF- κ B vahendatud geeniekspressiooni, siis kaasneb sellega ka miR-146a ekspressiooni suurenemine, mis viitab võimalusele, et antud mikroRNA peamiseks funktsiooniks viirusnakkuse ajal HBEC rakkudes on üldise põletikulise vastuse reguleerimine.

Selle hüpoteesi kinnitamiseks transfekteeriti HBEC rakke miR-146a-ga, seejärel nakatati rakke rinoviirustega ning RT-qPCR-i abil uuriti valitud geenide ekspresseerumist. Saadud tulemustest selgus, et miR-146a üleekspressiooni toimetel vähenes miR-146a otseste sihtmärkgeenide CCL5, IRAK1 ning CARD10 ekspressioon. Samuti kahanes IL-8 ekspresseerumine HBEC rakkudes. Kuna miR-146a reguleerib NF- κ B raja aktiivsust läbi IRAK1 ja CARD10 ekspressiooni inhibeerimise, siis väheneb seeläbi ka CCL5 ja IL-8 ekspressioon. Nende kemokiinide ekspressiooni vähenemisel ei teki põletikukoldesse immuunrakkude liikumiseks vajalikku kemotaksist ning seetõttu lokaalne põletik kahaneb. Lisaks näitasid tulemused, et miR-146a toimetel vähenes ka rakkude diferentseerumise ja proliferatsiooniga seotud markergeenide HBEGF ning FGF2 ekspresseerumine, mis kinnitab, et bronhiepiteeli histoloogiline muutumine on üldine põletiku tagajärg ning

inhibeerides miR-146a abil NF- κ B raja aktiivsust, on tõenäoliselt võimalik ka bronhiepiteeli remodelleerimist kontrollida.

Eelneva eksperimendi tulemused näitasid, et miR-146a toimel vähenes HBEC rakkudes ICAM1 mRNA ekspressioon. Kuna ICAM1 on RV A16 poolt kasutatav retseptor bronhiepiteeli rakkudesse sisenemiseks, soovisime teada saada, kas miR-146a on võimeline mõjutama HBEC rakkude nakatumist rinoviirusega. Lisaks on teada, et rakulise viirusvastuse intensiivsus mõjutab nakatumise efektiivsust. Et uurida, kas miR-146a mõjutab rinoviirusega nakatumist, viisime bronhiepiteeli rakkudesse miR-146a miimid, seejärel lisasime rakkudele eGFP-d ekspresseeriva rinoviirus A16 ning rakkude nakatumise efektiivsust hindasime läbivoolutsütomeetria abil. Leidsime, et transfekteerides rakke miR-146a miimidega, nakatus võrreldes kontroll-transfektsiooniga väiksem protsent HBEC rakke. Nendest kõikidest tulemustest lähtuvalt võime järeldada, et miR-146a omab bronhiepiteeli rakkudes võimet pärssida rinoviirusinfektsiooni põhjustatud immuunsüsteemi aktiveerimist. Seeläbi tõenäoliselt vähendab miR-146a ka astmaga seotud hingamisteede põletikku rinoviirusnakkusest põhjustatud astma ägenemise korral. Siiski tuleks arvesse võtta, et antud magistritöö raames tehti eksperimente rakkudega, mis pärinesid vaid kahelt doonorilt ja tulemuste kinnitamiseks on vajalikud edasised uuringud. Samuti võimaldaks näiteks hiire hingamisteede RV infektsiooni mudeli kasutamine võrdlevalt miR-146a puudulikul ja metsikut tüüpi hiirel uurida täpsemalt ja põhjalikumalt rinoviiruse nakkust ja sellega kaasnevat immuunvastuse erinevusi sõltuvalt miR-146a puudumisest või olemasolust organismi tasemel.

KOKKUVÕTE

Astma on hingamisteede krooniline põletikuline haigus, mille ägenemine arvatakse olevat seotud rinoviirusinfektsioonidega. On teada, et astma haigetel nakatab rinoviirus bronhiepiteeli rakke, kuid miks tekib astma ägenemine ja kuidas saaks seda ära hoida, on seni ebaselge. Käesoleva magistritöö käigus uurisime immuunregulatoorsete miRNA-de, miR-146a/b, ekspressiooni ning funktsioone inimese primaarsetes bronhiepiteeli rakkudes rinoviiruse infektsiooni ajal.

Leiti, et miR-146a/b ekspressioon kasvas HBEC rakkudes vastusena proinflammatoorsete tsütokiinide IFN- γ , TNF- α , IL-17A ja IL-22 stimulatsioonile. Uuritavad tsütokiinid indutseerisid bronhiepiteeli rakkudes nii põletikuliste protsessidega seotud geenide CCL5 ja IL-8 avaldumist kui ka interferoonraja koosseisu kuuluvate geenide IRF1 ja IFITM1 ekspresseerumist. Lisaks suurenes kasvufaktorite ja mutsiini ekspressioon, mis on iseloomulik kopsuepiteeli histoloogilisele muutumisele.

Järgnevalt tuvastasime, et rinoviirusinfektsioon indutseeris bronhiepiteeli rakkudes miR-146a ja vähesel määral ka miR-146b ekspressiooni. Samuti kasvas rakkudes nii NF- κ B kui STAT transkriptsioonifaktori vahendatud geenide ekspressioon. Kuna miR-146a/b ekspressioon sõltub NF- κ B või STAT vahendatud signaaliraja aktiivsusest, siis oletasime, et nende miRNA-de üheks funktsiooniks viirusnakkuse ajal võib olla reguleerida bronhiepiteelis viirusvastust ning viisime läbi katsed selle hüpoteesi kontrollimiseks.

HBEC rakke miR-146a-ga transfekteerides selgus, et miR-146a üleekspressiooni toimel kahanes miR-146a otseste sihtmärkgeenide CCL5, IRAK1 ning CARD10 ekspressioon ning seeläbi vähenes ka rinoviiruse indutseeritud NF- κ B raja aktiivsus. Samuti vähenes HBEC rakkudes HBEGF ning FGF2 ekspresseerumine, mis viitab sellele, et bronhiepiteeli histoloogiline muutumine on tingitud põletikust. Lisaks leiti töös, et miR-146a transfektsiooni korral nakatus väiksem protsent rakke rinoviirusega.

Kokkuvõttes näitavad käesoleva magistritöö tulemused, et miR-146a/b roll inimese primaarsetes bronhiepiteeli rakkudes rinoviirusinfektsiooni korral on põletikulise vastuse ja immuunsüsteemi aktiivsuse reguleerimine ning et miR-146a on võimeline pärssima rinoviirusinfektsiooni HBEC rakkudes. Saadud tulemuste põhjal võib oletada, et miR-146a võib olla üks faktoritest, mis aitab kontrollida astma sümptomeid rinoviirusinfektsiooni ajal.

The role of miR-146a/b in the regulation of immune responses to Human Rhinoviruses in primary bronchial epithelial cells

Anet Kivihall

SUMMARY

Asthma is a chronic inflammatory disease of the airways that is characterized by coughing, wheezing and chest tightness, caused by bronchial spasms and increased mucus production. Asthma exacerbations are often associated with rhinoviruses (RV), which are RNA viruses that infect the upper airways and cause common colds.

microRNAs (miRNAs) are post-transcriptional gene expression regulators that are involved in the regulation of many biological processes. The aim of this study was to investigate the expression and functions of miR-146a and miR-146b (miR-146a/b) during rhinovirus infections in primary human bronchial epithelial cells (HBECs).

First, we showed that the expression of miR-146a/b was increased in response to proinflammatory cytokines IFN- γ , TNF- α , IL-17A and IL-22 in HBECs. The same cytokines induced the expression of CCL5 and IL-8, that are associated with inflammatory processes and the expression of IRF1, IFITM1, which belong to the interferon signaling pathway. In addition, growth factors and mucin were more highly expressed in response to stimulation with cytokines, which is a characteristic feature of histological remodeling of the airways.

Second, we confirmed that miR-146a expression was induced by rhinovirus infection in HBECs. The expression of miR-146b was also increased, but was about 16-times lower than that of miR-146a. We also detected that genes, which are regulated by NF- κ B or STAT transcription factors, were more highly expressed in HBECs infected with rhinovirus. Since the expression of miR-146a/b is NF- κ B or JAK-STAT pathway dependent, we proposed that these miRNAs may regulate cellular responses to rhinovirus infection in bronchial epithelial cells.

To confirm this hypothesis, we transfected HBEC cells with miR-146a. Our results demonstrate, that overexpression of miR-146a reduces the expression of CCL5, IRAK1, CARD10 and therefore miR-146a most probably inhibits RV induced activation of NF- κ B signaling pathway. We also noticed that the expression of HBEGF and FGF2 was decreased, which suggests that bronchial remodelling is caused by inflammation and it is not a specific result of RV infection. Finally, we found that cells transfected with miR-146a were infected

with rhinovirus less as compared to controltransfected cells, which suggests that miR-146a has capacity to inhibit rhinovirus infection.

Taken together, the results of this study show that the function of miR-146a/b have capacity to regulate inflammatory processes and immune system activation during rhinovirus infection in human bronchial epithelial cells. These results suggest that miR-146a/b are capable of controlling the symptoms of asthma and the exacerbations caused by rhinovirus.

TÄNUAVALDUSED

Sooviksin eelkõige tänada oma juhendajaid Ana Rebast ja Viljar Jaksi, kelle abil käesolev töö valmis. Samuti soovin tänada meie koostööpartnereid – dr. Bogdan Jakielat, kellelt saadi kingitusena primaarsed bronhiepiteeli rakud, Sebastian Johnstonit, Yuri A. Bochkovi ja James E. Gerni, kellelt saadi kingitusena eksperimentides kasutatud rinoviiruste tüved A16, 1B ning pA16-eGFP plasmiid. Tänan ka teisi RNA bioloogia uurimisgrupi liikmeid, eriti Alar Aabi, kes lõi antud magistritööle eelnevalt eGFP-A16 viiruse ning Helen Hermanni, Egon Urgardit nende toetuse ja abi eest katsete läbiviimisel.

KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU

A) Ajakiri

1. Acharya, K. Ravi, ja Steven J. Ackerman. „Eosinophil Granule Proteins: Form and Function.“ *The Journal of Biological Chemistry* 289, nr 25 (2014): 17406–17415.
2. Akdis, Mübeccel, et al. „Interleukins, from 1 to 37, and interferon-g: Receptors, functions, and roles in diseases.“ *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 127 (2011): 701-721.
3. Assayag, Evelyne Israël, Marie-Josée Beaulieu, ja Yvon Cormier. „Bronchodilatory and Anti-Inflammatory Effects of ASM-024, a Nicotinic Receptor Ligand, Developed for the Treatment of Asthma.“ *PLOS ONE*, 2014: 9(1): e86091.
4. Baldwin Jr, Albert S. „The transcription factor NF-kB and human disease.“ *The Journal of Clinical Investigation* 107 (2001): 3-6.
5. Baraldo, S, et al. „Deficient antiviral immune responses in childhood: distinct roles of atopy and asthma.“ *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 130, nr 6 (2012): 1307-14.
6. Barnes, Peter J. „Severe asthma: Advances in current management and future therapy.“ *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 129 (2012): 48–59.
7. Basinski, Tomasz M., et al. „Dual nature of T cell–epithelium interaction in chronic rhinosinusitis.“ *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 124, nr 1 (2009): 74–80.
8. Beasley, Richard, Mark Weatherall, Robert Hancox Philippa Shirtcliffe, ja Helen K. Reddel. „Combination corticosteroid/b-agonist inhaler as reliever therapy: A solution for intermittent and mild asthma?“ *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 133 (2014): 39-41.
9. Bener, Abdulbari, Mohammad S. Ehlayel, Hale Z. Bener, ja Qutayba Hamid. „The impact of Vitamin D deficiency on asthma, allergic rhinitis and wheezing in children: An emerging public health problem.“ *Journal of Family and Community Medicine* 21, nr 3 (2014): 154-161.
10. Ben-Shushan, Dikla, Ela Markovsky, Hadas Gibori, Galia Tiram, Anna Scomparin, ja Ronit Satchi-Fainaro. „Overcoming obstacles in microRNA delivery towards improved cancer therapy.“ *Drug Delivery and Translational Research* 4 (2014): 38-49.
11. Berman, Reena, Di Jiang, Qun Wu, ja Hong Wei Chu. „ α 1-Antitrypsin reduces rhinovirus infection in primary human airway epithelial cells exposed to cigarette smoke.“ *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease* 11 (2016): 1279–1286.
12. Berry, Mike A., et al. „Evidence of a Role of Tumor Necrosis Factor α in Refractory Asthma.“ *The New England Journal of Medicine* 354 (2006): 697-708.

13. Bochkov, Y.A., K.M. Hanson, S. Keles, R.A. Brockman-Schneider, N.N. Jarjour, ja J.E. Gern. „Rhinovirus-induced modulation of gene expression in bronchial epithelial cells from subjects with asthma.“ *Mucosal Immunology* 3, nr 1 (2010): 69-80.
14. Braun, David A., Miguel Fribourg, ja Stuart C. Sealfon. „Cytokine response is determined by duration of receptor and signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3) activation.“ *The Journal of Biological Chemistry* 288 (2013): 2986-2993.
15. Burrill, Cecily P., ja Raul Andino Vanessa R. Strings. „Poliovirus: Generation, Quantification, Propagation, Purification, and Storage.“ *Current Protocols in Microbiology*, 2013: 15H.1.1-15H.1.27.
16. Causton, Benjamin, et al. „CARMA3 Is Critical for the Initiation of Allergic Airway.“ *The Journal of Immunology* 195, nr 2 (2015): 683-694.
17. Choy, David F., et al. „Gene Expression Patterns of Th2 Inflammation and Intercellular Communication in Asthmatic Airways.“ *The Journal of Immunology* 186, nr 3 (2011): 1861–1869.
18. Christopher, Ajay Francis, Raman Preet Kaur, Gunpreet Kaur, Amandeep Kaur, Vikas Gupta, ja Parveen Bansal. „MicroRNA therapeutics: Discovering novel targets and developing specific therapy.“ *Perspectives in Clinical Research* 7, nr 2 (2016): 68–74.
19. Ciriaco, Miriam, Pasquale Ventrice, Gaetano Russo, Maria Scicchitano, ja Giovanni Mazzitello. „Corticosteroid-related central nervous system side effects.“ *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics* 4 (2013): S94–S98.
20. Cohen, Sheldon, et al. „Chronic stress, glucocorticoid receptor resistance, inflammation, and disease risk.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, nr 16 (2012): 5995–5999.
21. Conner, Sean D., ja Sandra L. Schmid. „Regulated portals of entry into the cell.“ *Nature* 422 (2003): 37-44.
22. Contoli, Marco, et al. „Role of deficient type III interferon- λ production in asthma exacerbations.“ *Nature Medicine* 12 (2006): 1023-1026.
23. Coyne, Carolyn B., Miriam K. Vanhook, Todd M. Gambling, Johnny L. Carson, Richard C. Boucher, ja Larry G. Johnson. „Regulation of Airway Tight Junctions by Proinflammatory Cytokines.“ *Molecular Biology of the Cell* 13, nr 9 (2002): 3218–3234.
24. Cras, Timothy D. Le, et al. „Epithelial EGF receptor signaling mediates airway hyperreactivity and remodeling in a mouse model of chronic asthma.“ *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 300 (2011): 414-421.
25. Crone, Stephanie Geisler, et al. „microRNA-146a inhibits G protein-coupled receptor-mediated activation of NF- κ B by targeting CARD10 and COPS8 in gastric cancer.“ *Molecular Cancer* 11 (2012): 71.

26. Crystal, Ronald G., Scott H. Randell, John F. Engelhardt, Judith Voynow, ja Mary E. Sunday. „Airway Epithelial Cells Current Concepts and Challenges.“ *Proceedings of the American Thoracic Society* 5 (2009): 772–777.
27. Curtale, Graziella, Massimiliano Mirolo, Tiziana Ada Renzi, Marzia Rossato, Flavia Bazzoni, ja Massimo Locati. „Negative regulation of Toll-like receptor 4 signaling by IL-10-dependent microRNA-146b.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (2013): 11499-11504.
28. Curtale, Graziella, Massimiliano Mirolo, Tiziana Ada Renzi, Marzia Rossato, Flavia Bazzoni, ja Massimo Locati. „Negative regulation of Toll-like receptor 4 signaling by IL-10-dependent microRNA-146b.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (2013): 11499-11504.
29. Ezzat, Kariem, et al. „PepFect 14, a novel cell-penetrating peptide for oligonucleotide delivery in solution and as solid formulation.“ *Nucleic Acids Research* 39 (2011): 5284–5298.
30. Fahy, John V., ja Burton F. Dickey. „Airway Mucus Function and Dysfunction.“ *The New England Journal of Medicine* 363 (2010): 2233-2247.
31. Fallon, Padraic G., et al. „A homozygous frameshift mutation in the murine filaggrin gene facilitates enhanced percutaneous allergen priming.“ *Nature Genetics* 41, nr 5 (2009): 602–608.
32. Farkhani, Samad Mussa, Alireza Valizadeh, Hadi Karami, Samane Mohammadi, ja Fariba Badrzadeh Nasrin Sohrabi. „Cell penetrating peptides: Efficient vectors for delivery of nanoparticles, nanocarriers, therapeutic and diagnostic molecules.“ *Peptides* 57 (2014): 78–94.
33. Felton, Jennifer M., Christopher D. Lucas, Adriano G. Rossi, ja Ian Dransfield. „Eosinophils in the lung – modulating apoptosis and efferocytosis in airway inflammation.“ *Frontiers in Immunology* 5, nr 302 (2014).
34. Frew, Anthony J. „Allergen immunotherapy.“ *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 125, nr 2 (2010): 306-313.
35. Fujisawa, Tomoyuki, Sharlene Velichko, Philip Thai, Li-Yin Hung, Fei Huang, ja Reen Wu. „Regulation of Airway MUC5AC Expression by IL-1 β and IL-17A; the NF- κ B Paradigm.“ *The Journal of Immunology* 183 (2009): 6236–6243.
36. Futaki, Shiroh, et al. „Stearylated Arginine-Rich Peptides: A New Class of Transfection Systems.“ *Bioconjugate Chemistry* 12 (2001): 1005–1011.
37. Ganesan, Shyamala, et al. „TLR2 Activation Limits Rhinovirus-Stimulated CXCL-10 by Attenuating IRAK-1–Dependent IL-33 Receptor Signaling in Human Bronchial Epithelial Cells.“ *The Journal of Immunology* 197 (2016): 2409-2420.

38. Ganesan, Shyamala, ja Uma S. Sajjan. „Repair and Remodeling of airway epithelium after injury in Chronic Obstructive Pulmonary Disease.“ *Current Respiratory Care Reports* 2, nr 3 (2013): 10.1007/s13665-013-0052-2.
39. Garzon, Ramiro, George A. Calin, ja Carlo M. Croce. „MicroRNAs in Cancer.“ *The Annual Review of Medicine* 60 (2009): 167–179.
40. Gern, James E, Delores A French, Kristine A Grindle, Rebecca A Brockman-Schneider, Shin-Ichi Konno, ja William W Busse. „Double-Stranded RNA Induces the Synthesis of Specific Chemokines by Bronchial Epithelial Cells.“ *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 28 (2003): 731–737.
41. Gern, James E. „How rhinovirus infections cause exacerbations of asthma.“ *Clinical and Experimental Allergy* 45 (2015): 32-42.
42. Gern, James E., et al. „Bidirectional interactions between viral respiratory illnesses and cytokine responses in the first year of life.“ *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 117, nr 1 (2006): 72-78.
43. Groot, Jantina C. de, et al. „Vitamin D reduces eosinophilic airway inflammation in nonatopic asthma.“ *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 135, nr 3 (2015): 670–675.
44. Hardyman, Michelle A., et al. „TNF- α -mediated bronchial barrier disruption and regulation by src-family kinase activation.“ *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 132 (2013): 665–675.
45. Hermann, Helen, et al. „miR-146b probably assists miRNA-146a in the suppression of keratinocyte proliferation and inflammatory responses in psoriasis.“ *Journal of Investigative Dermatology*, 2016.
46. Heymann, Peter W, et al. „Viral infections in relation to age, atopy, and.“ *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 114, nr 2 (2004): 239-247.
47. Hogan, Simon P., et al. „Eosinophils: Biological Properties and Role in Health and Disease.“ *Clinical and Experimental Allergy* 38 (2008): 709–750.
48. Humbert, Marc, et al. „Omalizumab in Asthma: An Update on Recent Developments.“ *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice* 2 (2014): 525–536.
49. Huse, Morgan, Björn F Lillemeier, Michael S Kuhns, Daniel S Chen, ja Mark M Davis. „T cells use two directionally distinct pathways for cytokine secretion.“ *Nature Immunology* 7 (2006): 247 - 255.
50. Hutchins, Andrew P., Diego Diez, ja Diego Miranda-Saavedra. „The IL-10/STAT3-mediated anti-inflammatory response: recent developments and future challenges.“ *Briefings in Functional Genomics* 12 (2013): 489-498.

51. Jackson, Daniel J, James E Gern, ja Robert F Lemanske Jr. „The contributions of allergic sensitization and respiratory pathogens to asthma inception.“ *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 137 (2016): 659-665.
52. Jakiela, Bogdan, et al. „Th2-Type Cytokine–Induced Mucus Metaplasia Decreases Susceptibility of Human Bronchial Epithelium to Rhinovirus Infection.“ *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 51 (2014): 229-241.
53. Jakiela, Bogdan, Rebecca Brockman-Schneider, Svetlana Amineva, Wai-Ming Lee, ja James E. Gern. „Basal Cells of Differentiated Bronchial Epithelium Are More Susceptible to Rhinovirus Infection.“ *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 38, nr 5 (2008): 517-523.
54. Janssen-Heininger, Yvonne M. W., et al. „Nuclear Factor κ B, Airway Epithelium, and Asthma.“ *Proceedings of the American Thoracic Society* 6 (2009): 249–255.
55. Jartti, Tuomas, ja James E Gern. „Rhinovirus-associated wheeze during infancy and asthma development.“ *Current Respiratory Medicine Reviews* 7, nr 3 (2011): 160-166.
56. Jartti, Tuomas., et al. „Distinct regulation of tonsillar immune response in virus infection.“ *European Journal of Allergy and Clinical Immunology* 69 (2014): 658-667.
57. Johansson, Kristina, Carina Malmhäll, Patricia Ramos-Ramirez, ja Madeleine Radinger. „MicroRNA-155 is a critical regulator of type 2 innate lymphoid cells and IL-33 signaling in experimental models of allergic airway inflammation.“ *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 139 (2017): 1007-1016.
58. Kabesch, Michael. „Early origins of asthma (and allergy).“ *Molecular and Cellular Pediatrics*, 2016.
59. Katpally, Umesh, Tong-Ming Fu, Daniel C. Freed, Danilo R. Casimiro, ja Thomas J. Smith. „Antibodies to the Buried N Terminus of Rhinovirus VP4 Exhibit Cross-Serotypic Neutralization.“ *Journal of Virology* 83, nr 14 (2009): 7040–7048.
60. Kelly, John T., ja William W. Busse. „Host immune responses to rhinovirus: Mechanisms in asthma.“ *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 122, nr 4 (2008): 671–684.
61. Kho, Alvin T., et al. „Circulating MicroRNAs: Association with Lung.“ *PLOS ONE* 11(6):e0157998 (2016).
62. Kim, Harold, ja Jorge Mazza. „Asthma.“ *Allergy, Asthma & Clinical Immunology* 7 (2011): 1-9.
63. Kim, Jean, Scherer P. Sanders, Edward S. Siekierski, Vincenzo Casolaro, ja David Proud. „Role of NF- κ B in Cytokine Production Induced from Human Airway Epithelial Cells by Rhinovirus Infection.“ *The Journal of Immunology* 165 (2000): 3384-3392.
64. Kim, Suil, Courtney Lewis, ja Jay A. Nadel. „CCL20/CCR6 Feedback Exaggerates Epidermal Growth Factor Receptor-Dependent MUC5AC Mucin Production in Human

- Airway Epithelial (NCI-H292) Cells.“ *The Journal of Immunology* 186, nr 6 (2011): 3392-3400.
65. King, Andrew M. Q., Michael J Adams, ja Eric B Carstens, . *Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego: Academic Press, 2011.
66. Korn, Stephanie, Marisa Hübner, Matthias Jung, Maria Blettner, ja Roland Buhl. „Severe and uncontrolled adult asthma is associated with vitamin D insufficiency and deficiency.“ *Respiratory Research* 14, nr 25 (2013).
67. Korpi-Steiner, N.L., M. E. Bates, W. M. Lee, D. J. Hall, ja P. J. Bertics. „Human rhinovirus induces robust IP-10 release by monocytic cells, which is independent of viral replication but linked to type I interferon receptor ligation and STAT1 activation.“ *Journal of leukocyte biology* 80, nr 6 (2006): 1364-1374.
68. Kotaniemi-Syrjänen, Anne, Raija Vainionpää, Tiina M. Reijonen, Matti Waris, Kaj Korhonen, ja Matti Korppi. „Rhinovirus-induced wheezing in infancy—the first sign of childhood asthma?“ *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 111, nr 1 (2003): 66-71.
69. Kristensen, Mie, Ditlev Birch, ja Hanne Mørck Nielsen. „Applications and Challenges for Use of Cell-Penetrating Peptides as Delivery Vectors for Peptide and Protein Cargos.“ *International Journal of Molecular Sciences* 17, nr 2 (2016): 185.
70. Kusel, Merci M. H., et al. „Early-life respiratory viral infections, atopic sensitization, and risk of subsequent development of persistent asthma.“ *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 119, nr 5 (2007): 1105-1110.
71. Lai, Tianwen, et al. „Long-term efficacy and safety ofomalizumab in patients with persistentuncontrolled allergic asthma: asystematic review and meta-analysis.“ *Scientific Reports*, 2015: doi:10.1038.
72. Laine, Pia, Soile Blomqvist, Carita Savolainen, Koen Andries, ja Tapani Hovi. „Alignment of capsid protein VP1 sequences of all human rhinoviruses prototype strains.“ *Journal of General Virology* 87 (2006): 129-138.
73. Lambrecht, Bart N, ja Hamida Hammad. „The immunology of asthma.“ *Nature Immunology* 16, nr 1 (2015): 45-56.
74. Lambrecht, Bart N., ja Hamida Hammad. „Asthma: The importance of dysregulated barrier immunity.“ *European Journal of Immunity* 43 (2013): 3125–3137.
75. Laza-Stanca, Vasile, Luminita A. Stanciu, Simon D. Message, Michael R. Edwards, James E. Gern, ja Sebastian L. Johnston. „Rhinovirus Replication in Human Macrophages Induces NF-κB-Dependent Tumor Necrosis Factor Alpha Production.“ *Journal of Virology* 80, nr 16 (2006): 8248–8258.
76. Lehto, Tõnis, et al. „Saturated Fatty Acid Analogues of Cell-Penetrating Peptide PepFect14: Role of Fatty Acid Modification in Complexation and Delivery of Splice-Correcting Oligonucleotides.“ *Bioconjugate Chemistry* 28 (2017): 782–792.

77. Lemanske Jr, Robert F., ja William W. Busse. „Asthma: Clinical Expression and Molecular Mechanisms.“ *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 125 (2010): 95-102.
78. Lemanske, Robert F., et al. „Rhinovirus illnesses during infancy predict subsequent childhood wheezing.“ *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 116, nr 3 (2005): 571–577.
79. Lewis, Toby C., et al. „Nasal cytokine responses to natural colds in asthmatic children.“ *Clinical and Experimental Allergy* 42 (2012): 1734-1744.
80. Levy, Jay A. „The Unexpected Pleiotropic Activities of RANTES.“ *The Journal of Immunology* 182, nr 7 (2009): 3945-3946.
81. Li, Zhonghan, ja Tariq M. Rana. „Therapeutic targeting of microRNAs: current status and future challenges.“ *Nature Reviews Drug Discovery* 13 (2014): 622–638.
82. Lin, Henry, et al. „Omalizumab rapidly decreases nasal allergic response and FcεRI on basophils.“ *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 113 (2004): 297–302.
83. Lin, Shuibin, ja Richard I. Gregory. „MicroRNA biogenesis pathways in cancer.“ *Nature Reviews Cancer* 15, nr 6 (2015): 321–333.
84. Locksley, Richard M. „Asthma and allergic inflammation.“ *Cell* 140 (2010): 777-783.
85. Lopez-Souza, N., et al. „Resistance of differentiated human airway epithelium to infection by rhinovirus.“ *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* 286, nr 2 (2004): 373-381.
86. Lopez-Souza, Nilceia, et al. „In vitro susceptibility to rhinovirus infection is greater for bronchial than for nasal airway epithelial cells in human subjects.“ *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 123, nr 6 (2009): 1384–1390.
87. Lougheed, M Diane, et al. „Canadian Thoracic Society Asthma Management Continuum – 2010 Consensus Summary for children six years of age and over, and adults.“ *Canadian Respiratory Journal* 17 (2010): 15-24.
88. Lu, Fang, Andreas Weidmer, Chang-Gong Liu, ja Stefano Volinia. „Epstein-Barr Virus-Induced miR-155 Attenuates NF-κB Signaling and Stabilizes Latent Virus Persistence.“ *Journal of Virology* 82 (2008): 10436–10443.
89. Lu, Li-Fan, et al. „Function of miR-146a in controlling Treg cell-mediated regulation of Th1 responses.“ *Cell* 142 (2010): 914–929.
90. Lu, Thomas X., ja Marc E. Rothenberg. „Diagnostic, functional, and therapeutic roles of microRNA in allergic diseases.“ *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 132 (2013): 3-13.

91. Malmhäll, Carina, et al. „MicroRNA-155 is essential for TH2-mediated allergen-induced eosinophilic inflammation in the lung.“ *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 133 (2014): 1429-1438.
92. Martinez-Nunez, Rocio T., Fethi Louafi, ja Tilman Sanchez-Elsner. „The Interleukin 13 (IL-13) Pathway in Human Macrophages Is Modulated by MicroRNA-155 via Direct Targeting of Interleukin 13 Receptor α 1 (IL13Ra1).“ *The Journal of Biological Chemistry* 286 (2011): 1786–1794.
93. McLean, Gary R., et al. „Rhinovirus infections and immunisation induce cross-serotype reactive antibodies to VP1.“ *Antiviral Research* 95 (2012): 193–201.
94. Medzhitov, Ruslan. „Inflammation 2010:New Adventures of an Old Flame.“ *Cell* 140 (2010): 771-776.
95. Message, Simon D., et al. „Rhinovirus-induced lower respiratory illness is increased in asthma and related to virus load and Th1/2 cytokine and IL-10 production.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, nr 36 (2008): 13562–13567.
96. Mäe, Maarja, ja Ülo Langel. „Cell-penetrating peptides as vectors for peptide, protein and oligonucleotide delivery.“ *Current Opinion in Pharmacology* 6 (2006): 509–514.
97. Nicholson, Karl G, Julie Kent, ja Deborah C Ireland. „Respiratory viruses and exacerbations of asthma in adults.“ *BMJ* 307 (1993): 982-986.
98. O'Connell, Ryan M., Konstantin D. Taganov, Mark P. Boldin, Genhong Cheng, ja David Baltimore. „MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, nr 5 (2007): 1604–1609.
99. Oddy, WH, de Klerk NH, Sly PD, ja Holt PG. „The effects of respiratory infections, atopy, and breastfeeding on childhood asthma.“ *European Respiratory Journal* 19, nr 5 (2002): 899-905.
100. Okoye, Isobel S., et al. „Transcriptomics identified a critical role for Th2 cell-intrinsic miR-155 in mediating allergy and antihelminth immunity.“ *PNAS*, 2014: 3081–3090.
101. Pålsson-McDermott, Eva M, ja Luke A J O'Neill. „Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor 4.“ *Immunology* 113 (2004): 153-162.
102. Papadopoulos, N. G., et al. „Rhinovirus infection up-regulates eotaxin and eotaxin-2 expression in bronchial epithelial cells.“ *Clinical & Experimental Allergy* 31 (2001): 1060–1066.
103. Park, Beom Seok, ja Jie-Oh Lee. „Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes.“ *Experimental & Molecular Medicine* 45 (2013): e66.
104. Park, Haein, Xin Huang, Changming Lu, Mitchell S. Cairo, ja Xianzheng Zhou. „MicroRNA-146a and MicroRNA-146b Regulate Human Dendritic Cell Apoptosis and Cytokine Production by Targeting TRAF6 and IRAK1 Proteins.“ *The Journal of Biological Chemistry* 290 (2015): 2831-2841.

105. Parry, David E., William W. Busse, Kris A. Sukow, Claire R. Dick, Cheri Swenson, ja James E. Gern. „Rhinovirus-induced PBMC responses and outcome of experimental infection in allergic subject.“ *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 105, nr 4 (2000): 692-698.
106. Patel, Dhara A., et al. „Interferon response and respiratory virus control are.“ *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 134, nr 6 (2013): 1402-1412.
107. Pelaia, Girolamo, et al. „Cellular Mechanisms Underlying Eosinophilic and Neutrophilic Airway Inflammation in Asthma.“ *Mediators of Inflammation*, 2015.
108. Perry, Mark M., Sterghios A. Moschos, Andrew E. Williams, Neil J. Shepherd, Hanna M. Larner-Svensson, ja Mark A Lindsay. „Rapid changes in microRNA-146a expression negatively regulate the interleukin-1 β induced inflammatory response in human lung alveolar epithelial cells.“ *Journal of Immunology* 180, nr 8 (2008): 5689–5698.
109. Pfaff, Janina, et al. „Structural features of Argonaute–GW182 protein interactions.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, nr 40 (2013): 3770–3779.
110. Plank, Maximilian, Steven Maltby, Joerg Mattes, ja Paul S Foster. „Targeting translational control as a novel way to treat inflammatory disease: the emerging role of MicroRNAs.“ *Clinical & Experimental Allergy* 43 (2013): 981–999.
111. Proud, David, et al. „Gene Expression Profiles during In Vivo Human Rhinovirus Infection.“ *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 178 (2008): 962-968.
112. Proud, David, et al. „Gene Expression Profiles during In Vivo Human Rhinovirus Infection Insights into the Host Response.“ *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 178 (2008): 962-968.
113. Rebane, Ana, et al. „MicroRNA-146a alleviates chronic skin inflammation in atopic dermatitis through suppression of innate immune responses in keratinocytes.“ *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 134 (2014): 836-847.
114. Rebane, Ana, ja Cezmi A. Akdis. „MicroRNAs: Essential players in the regulation of inflammation.“ *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2013: 15-26.
115. Regberg, Jakob, Artita Srimanee, ja Ülo Langel. „Applications of Cell-Penetrating Peptides for Tumor Targeting and Future Cancer Therapies.“ *Pharmaceuticals (Basel)* 5 (2012): 991–1007.
116. Regberg, Jakob, et al. „Rational design of a series of novel amphipathic cell-penetrating peptides.“ *International Journal of Pharmaceutics* 464 (2014): 111–116.
117. Regberg, Jakob, Luis Vasconcelos, Fatemeh Madani, Ülo Langel, ja Mattias Hällbrink. „pH-responsive PepFect cell-penetrating peptides.“ *International Journal of Pharmaceutics* 501 (2016): 32-38.

118. Rodriguez, Antony, et al. „Requirement of bic/microRNA-155 for Normal Immune Function.“ *Science* 316 (2007): 608–611.
119. Rooij, Eva van, Angela L. Purcell, ja Arthur A. Levin. „Developing MicroRNA Therapeutics.“ *Circulation Research* 110 (2012): 496-507.
120. Royston, Léna, ja Caroline Tapparel. „Rhinoviruses and Respiratory Enteroviruses: Not as simple as ABC.“ *Viruses* 8, nr 16 (2016): doi:10.3390.
121. Rusca, Nicole, ja Silvia Monticelli. „MiR-146a in Immunity and Disease.“ *Molecular Biology International*, 2011: 437301.
122. Sajjan, Umadevi, Qiong Wang, Ying Zhao, Dieter C. Gruenert, ja Marc B. Hershenson. „Rhinovirus Disrupts the Barrier Function of Polarized airway epithelial cells.“ *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 178 (2008): 1271-1281.
123. Sakamoto, M, S Ida, ja T Takishima. „Effect of influenza virus infection on allergic sensitization to aerosolized ovalbumin in mice.“ *The Journal of Immunology* 132 (1984): 2614-2617.
124. Sethupathy, Praveen. „The Promise and Challenge of Therapeutic MicroRNA Silencing in Diabetes and Metabolic Diseases.“ *Current Diabetes Reports* 16, nr 52 (2016).
125. Shahidi, Neal, ja J Mark FitzGerald. „Current recommendations for the treatment of mild asthma.“ *Journal of Asthma and Allergy* 3 (2010): 169–176.
126. Sly, Peter D., et al. „Early identification of children likely to develop persistent asthma: atopy is an integral component of the high risk phenotype.“ *Lancet* 372, nr 9643 (2008): 1100-1106.
127. Zaheer, Raza S., ja David Proud. „Human Rhinovirus–Induced Epithelial Production of CXCL10 Is Dependent upon IFN Regulatory Factor-1.“ *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 43 (2010): 413-421.
128. Zhang, Guohong, Vanessa Gurtu, ja Steven R. Kain. „An Enhanced Green Fluorescent Protein Allows Sensitive Detection of Gene Transfer in Mammalian Cells.“ *Biochemical and Biophysical Research Communications* 227 (1996): 707-711.
129. Taganov, Konstantin D., Mark P. Boldin, Kuang-Jung Chang, ja David Baltimore. „NF- κ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, nr 33 (2006): 12481–12486.
130. Tang, Francesca S M, Philip M Hansbro, Janette K Burgess, Alaina J Ammit, Katherine J Baines, ja Brian G Oliver. „A novel immunomodulatory function of neutrophils on rhinovirus-activated monocytes in vitro.“ *The BMJ* 71 (2016): 1039–1049.
131. Triantafilou, Kathy, Emmanouil Vakakis, Edward A.J. Richer, Gareth L. Evans, Joseph P. Villiers, ja Martha Triantafilou. „Human rhinovirus recognition in non-immune cells is

- mediated by Toll-like receptors and MDA-5, which trigger a synergetic pro-inflammatory immune response.“ *Virulence* 2 (2011): 22–29.
132. Trotta, Rossana, et al. „miR-155 regulates IFN- γ production in natural killer cells.“ *Blood* 119, nr 15 (2012): 3478–3485.
133. Urgard, Egon, et al. „PepFect6-microRNA-146a nanocomplexes inhibit 1 inflammatory responses in keratinocytes and in a mouse model of irritant contact dermatitis.“ *Journal of Controlled Release* 235 (2016): 195–204.
134. Wang, Jia-wang, Kunyu Li, Gary Hellermann, Richard F. Lockey, Subhra Mohapatra, ja Shyam Mohapatra. „Regulating the Regulators: microRNA and Asthma.“ *World Allergy Organization Journal* 4 (2011): 94-103.
135. Wang, Pin, et al. „Inducible microRNA-155 Feedback Promotes Type I IFN Signaling in Antiviral Innate Immunity by Targeting Suppressor of Cytokine Signaling 1.“ *The Journal of Immunology* 185 (2010): 6226-6233.
136. Wang, Qiong, et al. „MDA5 and TLR3 Initiate Pro-Inflammatory Signaling Pathways Leading to Rhinovirus-Induced Airways Inflammation and Hyperresponsiveness.“ *PLOS Pathogens*, 2011: 7(5):e1002070.
137. Wang, Qiong, et al. „Role of double-stranded RNA pattern recognition receptors in rhinovirus-induced airway epithelial cell responses.“ *The Journal of Immunology* 183 (2009): 6989-6997.
138. Wark, Peter A.B., Terry Grissell, Bronwyn Davies, Hayley See, ja Peter G Gibson. „Diversity in the bronchial epithelial cell response to infection with different rhinovirus strains.“ *Respirology* 14 (2009): 180–186.
139. Williams, Andrew E., Mark M. Perry, Sterghios A. Moschos, Hanna M. Larner-Svensson, ja Mark A. Lindsay. „Role of miRNA-146a in the regulation of the innate immune response and cancer.“ *Biochemical Society Transactions*, 2008: 1211-1215.
140. Wong, Chun K., Mandy L. Y. Li, Cheng B. Wang, Wai K. Ip, Ya P. Tian, ja Christopher W. K. Lam. „House dust mite allergen Der p 1 elevates the release of inflammatory cytokines and expression of adhesion molecules in co-culture of human eosinophils and bronchial epithelial cells.“ *International Immunology* 18 (2006): 1327-1335.
141. Xiang, Michael, et al. „STAT3 Induction of MiR-146b Forms a Feedback Loop to Inhibit the NF- κ B to IL-6 Signaling Axis and STAT3-Driven Cancer Phenotypes.“ *Science Signaling* 7, nr 310 (2014).
142. Xiao, Chang, et al. „Defective epithelial barrier function in asthma.“ *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 128 (2011): 549-556.

B) Raamat

1. Rebane, Ana. „microRNA and Allergy.“ rmt: *microRNA: Medical Evidence*, monteerinud: Gaetano Santulli, 331-352. Springer, 2015.
2. Sand, Michael. „The Pathway of miRNA Maturation.“ rmt: *miRNA Maturation*, monteerinud: Christoph Arenz, 3-10. Humana Press, 2014.
3. Turner, Ronald B., ja Wai-Ming Lee. „Rhinovirus.“ rmt: *Clinical Virology, Third Edition*, monteerinud: Douglas D. Richman, Richard J. Whitley ja Frederick G. Hayden, 1063–1082. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 2009.
4. Yin-Murphy, Marguerite, ja Jeffrey W. Almond. „Picornaviruses.“ rmt: *Medical Microbiology. 4th edition.*, monteerinud: Samuel Baron. Texas, Galveston: The University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996.

KASUTATUD VEEBIAADDRESSID

1. http://mirbase.org/cgi-bin/mature.pl?mature_acc=MIMAT0000449 (31.03.2017)
2. http://www.mirbase.org/cgi-bin/mature.pl?mature_acc=MIMAT0002809 (31.03.2017)

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Anet Kivihall
(sünnikuupäev: 03.04.1993)

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

**„miR-146a/b roll rakulise viirusvastuse moduleerimisel inimese primaarsetes
bronhiepiteeli rakkudes rinoviirusinfektsiooni korral“,**
mille juhendajad on Ana Rebane ja Viljar Jaks

- 1.1 reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
 - 1.2 üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
 3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 31.05.2017