

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
MEDITSIINITEADUSTE VALDKOND
BIO- JA SIIRDEMEDITSIINI INSTITUUT
RNA BIOLOOGIA UURIMISGRUPP

Mart Ole Peters

***Staphylococcus aureus* TSLP ekspressiooni indutseerijana inimese
primaarsete keratinotsüütide koekultuuris**

Bakalaureusetöö

Juhendajad PhD Martin Pook

PhD Tõnis Org

TARTU 2023

***Staphylococcus aureus* TSLP ekspressiooni indutseerijana inimese primaarsete keratinotsüütide koekultuuris**

Atopiline dermatiit (AD) on naha haigus, mis on iseloomustatud põletikuga, tugeva sügelusega ja nahabarjääri kahjustustega. *Staphylococcus aureus* on sageli AD patsientidel naha peal leitav patogeen ja on üks AD sümptomite ägenemise põhjus. Lipoteikoonhape (LTA) on bakteri *S. aureus* rakukesta komponent. Tuumuse stromaalne lümfopoetiin (TSLP) on AD patsientide kahjustatud nahas kõrgelt ekspresseeritud tsütokiin ja on AD raskusastme oluline tegur. Selleks, et paremini mõista, kuidas *S. aureus* mõjutab TSLP regulatsiooni analüüsiti käesolevas bakalaureusetöös pika ja lühikese TSLP transkripti ekspressiooni koekultuuris kasvatatud inimese primaarsetes keratinotsüütides, mida mõjutati kuumtöödeldud *S. aureusega*, kuumtöödeldud *S. epidermidisega* ja *S. aureus* LTAga. Keratinotsüütide kasvatamine ja töötlemine viidi läbi võrdlevalt kahes erinevas söötmesüsteemis.

Märksõnad: atopiline dermatiit, tuumuse stromaalne lümfopoetiin, *S. aureus*, põletik

CERCS: B500 Immunoloogia, seroloogia, transplantoloogia

***Staphylococcus aureus* as an inducer of TSLP in primary human keratinocyte cell culture**

Atopic dermatitis (AD) is a skin disease, which is characterized by inflammation, severe itching and disrupted skin barrier. *Staphylococcus aureus* is a common pathogen often found on the skin of patients with AD and is known to further exacerbate its symptoms. Lipoteichoic acid (LTA) is a component of *S. aureus*' cell wall. Thymic stromal lymphopoietin is a highly expressed cytokine in the lesional skin of patients with AD and is a strong factor of its severity. In order to widen the understanding how *S. aureus* affects the regulation of TSLP, the aim of this bachelor's thesis is to compare the expression of the long and the short TSLP transcript in keratinocytes treated with heat-killed *S. aureus*, heat-killed *S. epidermidis* and LTA from *S. aureus*. The cultivation and treatment of keratinocytes was carried out and compared in two different keratinocyte medium systems.

Keywords: atopic dermatitis, thymic stromal lymphopoietin, *S. aureus*, inflammation

CERCS: B500 Immunology, serology, transplantation

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID.....	4
SISSEJUHATUS	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1.1 Atoopiline dermatiit	7
1.1.1 Keratinotsüütide roll naha põletikulistes protsessides	8
1.1.2 TSLP ekspressioon nahas.....	11
1.1.2.2 TSLP isovormid	12
1.1.2.3 TSLP ja AD	13
1.1.3 Naha mikrofloora muutused atoopilise dermatiidi patsientidel.....	14
1.1.3.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	14
1.1.3.2 <i>Staphylococcus epidermidis</i>	15
2. EKSPERIMENTAALOSA.....	16
2.1. Töö eesmärgid.....	16
2.2. Materjal ja meetodika.....	16
2.2.1. Inimese primaarsete keratinotsüütide koekultuur	16
2.2.2. Primaarsete keratinotsüütide mõjutamine bakterirakukomponentidega ja TSLP ekspressiooni stimuleerijatega koekultuuris.....	16
2.2.3 RNA eraldamine inimese primaarsetest keratinotsüütidest.....	17
2.2.4. RT-qPCR mRNA ekspressiooni tuvastamiseks	17
2.2.5. Statistiline analüüs	18
2.3. Tulemused.....	18
2.3.1 Kuumtöödeldud <i>Staphylococcus aureuse</i> , <i>Staphylococcus epidermidise</i> ja <i>Staphylococcus aureuse</i> LTA mõju TSLP ekspressioonile inimese primaarsetes keratinotsüütides.....	18
2.3. Arutelu.....	22
KOKKUVÕTE	26
Summary	27
TÄNUSÕNAD.....	28
KASUTATUD ALLIKAD	29
LISAD	36
LIHTLITSENTS.....	40

KASUTATUD LÜHENDID

AD	Atoopiline dermatiit
Agr	(ingl <i>assecory gene regulator</i>)
BAFF	B-raku aktivatsiooni faktor (ingl <i>B-cell activating factor</i>)
BPE	veise põie ekstrakt (ingl <i>bovine pituitary extract</i>)
CAF	vähiga seotud fibroblast (ingl <i>cancer associated fibroblast</i>)
CCR	CC kemokiin retseptor (ingl <i>CC chemokine receptor</i>)
cDNA	komplementaarne DNA
CD	Tsölaakia (ingl <i>coeliac disease</i>)
CD40L	CD40 ligand
CoNS	koagulaas-negatiivsed staphylococcid(ingl <i>coagulase-negative staphylococci</i>)
CTCL	T-rakkude naha lümfoom (ingl <i>Cutaneous T-cell lymphoma</i>)
CXCR	CXC kemokiin retseptor (ingl <i>CXC chemokine receptor</i>)
DMSO	dimetüülsulfoksiid
dsRNA	kaheaheelaline RNA (ingl <i>double-stranded RNA</i>)
EDC	epidermaalse differentsieerumiskompleks (ingl <i>epidermal differentiation complex</i>)
FBS	veise loote seerum (ingl <i>fetal bovine serum</i>)
FLG	filagriin
GM-CSF	granulotsüüt-makrofaag kolooniat stimuleeriv faktor (ingl <i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>)
hMPV	inimese metapneumooviirus (ingl <i>human metapneumovirus</i>)
HKSA	kuumtöödeldud <i>Staphylococcus aureus</i> (ingl <i>heat-killed Staphylococcus aureus</i>)
HKSE	kuumtöödeldud <i>Staphylococcus epidermidis</i> (ingl <i>heat-killed Staphylococcus epidermidis</i>)
IFN	interferoon
IgE	immuunoglobuliin E
IL	interleukiin
IL-7R α	interleukiin-7 retseptori α -ahel
JAK	Janus kinaas (ingl <i>Janus kinase</i>)
KC-SFM	keratinotsüütide seerumivaba meedium (ingl <i>Keratinocyte serum-free meedium</i>)
KGM3	keratinotsüütide kasvu meedium 3 (ingl <i>Keratinocyte Growth edium 3</i>)
lftSLP	pikk TSLP (ingl <i>long-form TSLP</i>)

LC	Langerhansi rakk (ingl <i>Langerhans cell</i>)
LPS	lipopolüsahhariid
LTA	lipoteikoonhape (ingl <i>lipoteichoic acid</i>)
LF β	lümfotoksiin beta (ingl <i>lymphotoxin beta</i>)
MHC-II	peamine koesobivuskompleks II (ingl <i>major histocompatibility complex II</i>)
NF- κ B	tuumafaktor κ B (ingl <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>)
NHBE	normaalne bronhi epiteeli rakk (ingl <i>normal human bronchial epithelial cell</i>)
NHEK	normaalne inimese epidermaalne keratinotsüüt (ingl <i>normal human epidermal keratinocytes</i>)
PAMP	patogeeniga seotud molekulaarne muster (ingl <i>pathogen-associated molecular pattern</i>)
PBS	fosfaat-puhverdatud saliin (ingl <i>phosphate-buffered saline</i>)
Poly I:C	polüinosiin-polütsütidüülhape (ingl <i>polyinosinic: polycytidylic acid</i>)
PRR	mustrit äratundev retseptor (ingl <i>pattern recognition receptor</i>)
PSM	fenoolis lahustuv moduliin (ingl <i>phenol-soluble modulin</i>)
RANKL	NF- κ B ligandi retseptori aktivaator (ingl <i>Receptor Activator of NF-κB Ligand</i>)
rEGF	inimese rekombinantne epidermaalne kasvufaktor (ingl <i>human recombinant epidermal growth factor</i>)
RXR	retinoid X retseptor
sfTSLP	lühike TSLP (ingl <i>short-form TSLP</i>)
SNP	üksiku nukleotiidi polümorfism (ingl <i>single nucleotide polymorfism</i>)
STAT	signaali transduktsiooni ja transkriptsiooni aktivaator (ingl <i>signal transducer and activator of transcription</i>)
Th	abistaja rakk (ingl <i>T-helper</i>)
TGF	transformeeriv kasvufaktor (ingl <i>transforming growth factor</i>)
TNF	tuumori nekroosifaktor (ingl <i>tumor necrosis factor</i>)
TLR	tolli-laadne retseptor (ingl <i>toll-like receptor</i>)
TSLP	tuumuse stromaalne lümfoetiin (ingl <i>thymic stromal lymphopoietin</i>)
TSLPR	tuumuse stromaalse lümfoetiini retseptor
VDR	vitamiin D retseptor

SISSEJUHATUS

Atoopiline dermatiit (AD) on krooniline nahahaigus, mis esineb globaalselt 15-20% lastel ja kuni 10% täiskasvanutel (Laughter et al., 2021). Sümptomid on krooniline nahapõletik ja epidermaalse barjääri funktsioonihäired (Furie et al., 2017; Tamagawa-Mineoka & Katoh, 2020). Atoopilist dermatiiti võivad mõjutada erinevad faktorid, näiteks patsiendile sobimatud šampoonid, allergeenid, mis võivad süvendada AD tekitatud kahjustusi, või mikroobid, näiteks *Staphylococcus aureus*, mis võimendavad AD sümptomeid (Tamagawa-Mineoka & Katoh, 2020).

Staphylococcus aureus on levinud naha peal elav patogeene bakter (Grice & Segre, 2011). Eriti AD patsientidel on suurem tõenäosus nakatuda mõne viiruse või bakteriga ja neil on *S. aureuse* infektsioon tavaline (Traidl et al., 2021). On teada, et *S. aureus* indutseerib tütümuse stromaalse lümfoetiini (ingl *thymic stromal lymphopoietin*) (TSLP) vabanemist, mis on üks oluline AD-d mõjutav tsütokiin (Vu et al., 2010). *Staphylococcus epidermidis* on samuti naha peal elav bakter. Kuigi varem arvati, et tegemist on naha kommensaaliga, siis on tänapäeval teada, et ta on ka võimaline muutuma patogeeniks (Cau et al., 2021). Lipoteikoonhape (LTA) on *S. aureuse* rakukesta komponent, mille retseptorid keratinotsüütides on tollilaadsed retseptorid 2 ja 6 (TLR2/TLR6, *toll-like receptor*) (Pietrocola et al., 2011). On näidatud, et LTA võib olla mõju TSLP ekspressioonile (Brauweiler et al., 2020).

TSLP on tsütokiin, mis on tugevalt ekspresseeritud AD-i patsientide keratinotsüütides (Soumelis et al., 2002). TSLP ülesanne on Th2 ja Th22 immuunvastuse algatamine. Th2 ja Th22 seotud tsütokiinide kõrge tase võib viia filaggrini ekspressiooni vähenemiseni ning seeläbi nahabarjääri funktsiooni häireni, mis on üks AD sümptom (Furie et al., 2017). On teada kaks peamist TSLP isovormi, millest üks on pikk isovorm (*long-form-TSLP*), ning eelkõige seotud Th2 tüüpi immuunvastusega ja on põletiku korral rohkem ekspresseeritud. Lühike isovorm (*short-form-TSLP*) mängib olulist rolli epiteeli homöostaasis (Varricchi et al., 2018).

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks on uurida, kuidas mõjutavad kuumtöödeldud *S. aureus*, kuumtöödeldud *S. epidermidis* ja *S. aureuse* LTA TSLP transkripti isovormide lftTSLP ja sfTSLP ekspressiooni primaarsetes keratinotsüütides. Lisaks võrreldakse neid tulemusi kahes erinevas söötmesüsteemis kasvatatud keratinotsüütidest saadud materjalis.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Atoopiline dermatiit

Atoopiline dermatiit on nahahaigus, mis esineb globaalselt 15-20% lastel ja kuni 10% täiskasvanutel (Laughter et al., 2021). AD-d iseloomustab krooniline nahapõletik, kuiv nahk, epidermise barjääri düsfunktsioon ja intensiivne sügelus, mille indutseeritud kratsimine süvendab põletikku ja rakukahjustusi (Furie et al., 2017). AD on multifaktoriaalne haigus (Ibrahim et al., 2020), mille sümptomid on tugevalt kõikuvad remissioonide ja retsidiividega (Katoh et al., 2019) ja selle patogenees ei ole veel täielikult teada (Ibrahim et al., 2020). On leitud positiivne korrelatsioon AD ja muude erinevate haiguste (nt. allergiad, südamehaigused või ka vaimsed haigused nagu depressioon) vahel (Silverberg et al., 2018). Teada on ka geneetilise eelsoodumuse esinemine: kui vanematel on astma, riniit või toidualergia, siis on tõenäosus, et lapsel tekib AD umbes 1,5 korda suurem (Torres et al., 2019). Lapsel on AD tekkimise tõenäosus kolm korda suurem, kui ühel vanemal on AD ja viis korda suurem, kui see esineb mõlematel vanematel (Torres et al., 2019).

Mutatsioonid, mis põhjustavad muutusi valgus filaggriin on oluline faktor AD varajasel tekkimisel (Weidinger et al., 2006). Filaggriin on profilaggriooni lõikeprodukt ja selle puuduse põhjuseks võib olla mutatsioon filaggrini (FLG) geenis või profilaggriooni lõikavate proteaaside mutatsioonid (Weidinger et al., 2006). Filaggrini puudus põhjustab häireid naha epidermise funktsioonis ja tõstab seetõttu mikroobilise infektsiooni riski (Cabanillas & Novak, 2016). Lisaks sellele on AD patsientide naha sarvkihis võrreldes tervete patsientidega vähem urokaanhapet ja pürrolidoon-5-karbonsüülhapet (püroglutamiinhappe derivaat), mis on filaggrini laguproduktid ja olulised naturaalsed niiskusfaktorid ning seeläbi seotud AD patsientide kuiva nahaga (Cabanillas & Novak, 2016).

Epidermaalsetel dendriitrakkudel on trimeersed kõrge affiinsusega retseptorid, mis võivad koos antikehaga immunoglobuliin E (IgE) esile kutsuda T-rakkude poolt vahendatud immuunreaktsiooni (Novak, 2012). IgE-ga seonduvad ka erinevad keratinotsüütidel pärinevad antigeenid (Zeller et al., 2009). AD patsientidel on Th2-rakke soodustavate tsütokiinide ekspressioon ja immunoglobuliin E (IgE) tase kõrgem (Weidinger & Novak, 2016). AD patsientidel on näiliselt tervel nahal võimalik tuvastada põletikuga seotud markereid ja esineb suurem arv Th2-rakke ja põletikku soodustavaid tsütokiine (Novak, 2012). Th-2 immuunvastus on muu hulgas indutseeritud ka TSLP poolt ning see aktiveerib dendriitrakke ja indutseerib naiivseid CD4⁺ rakke tootma põletikuga seotud tsütokiine (Beken et al., 2020).

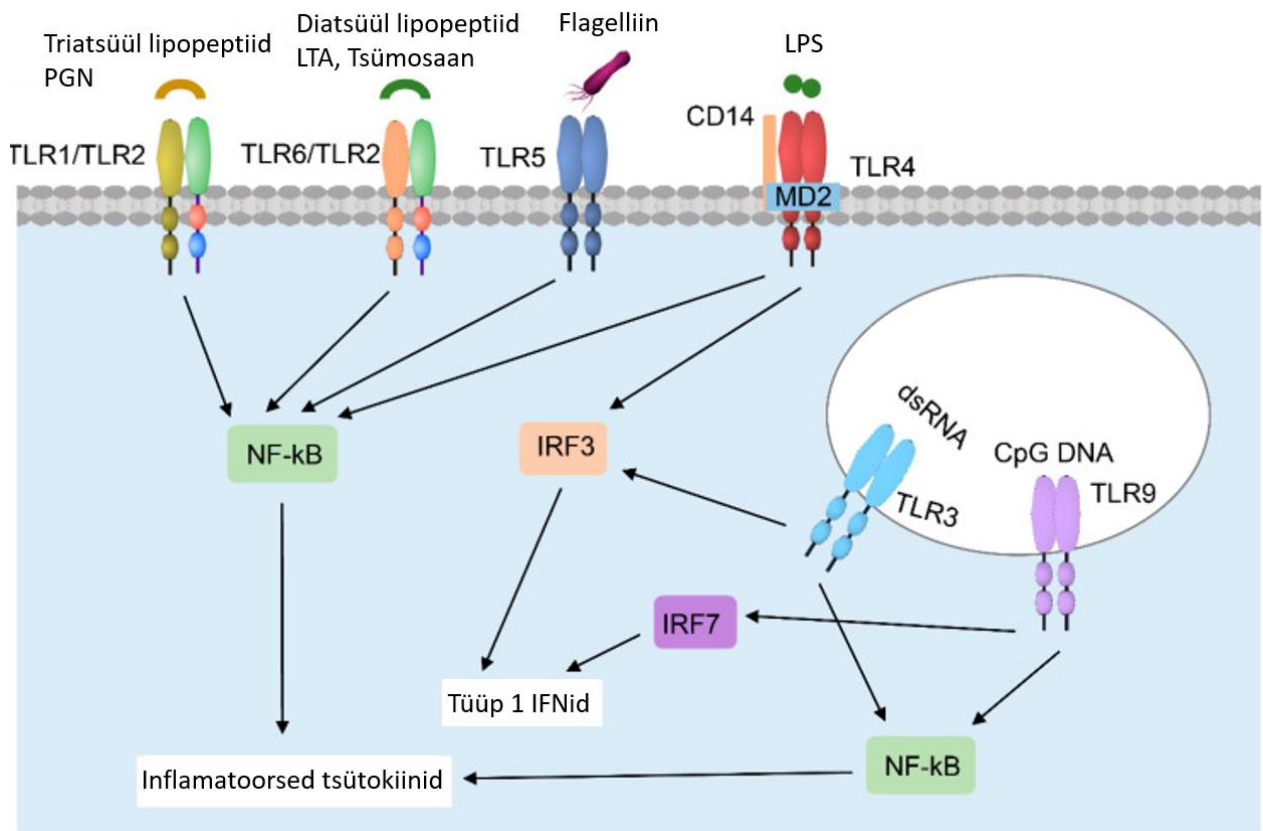
1.1.1 Keratinotsüütide roll naha põletikulistes protsessides

Nahk on inimeste kõige suurem organ ja koosneb epidermisest, dermisest ja hüpodermisest (Arda et al., 2014). Esimene kaitsebarjäär on epidermis ehk marrasnahk (Baroni et al., 2012). See koosneb omakorda viiest kihist. Kõige välimine kiht on sarvkiht (*stratum corneum*), teine (ainult käte või jalataldade paksus nahas leitav) kiht on läikekiht (*stratum lucidum*), kolmas on sõmerkiht (*stratum granulosum*), neljas kiht on ogakiht (*stratum spinosum*) ja kõige sisemine on basaalkiht (*stratum basale*) (Wickett & Visscher, 2006).

Basaalkihi põhirakud on basaalsed keratinotsüüdid, mis differentseeruvad edasi ogakihi rakkudeks (Fuchs, 1990). Lisaks leidub basaalkihist ka melanotsüüte ja merkele rakke (Nguyen et al., 2017; Yousef et al., 2024). Viimati mainitud kirjandusallikas on kirjeldatud ülejäänud kihtide ülesehitust järgmiselt: ogakiht on 8-10 rakukihiga desmosoomidega ühendatud ebakorrapäraseid rakke sisaldav rakukiht. Ogakihi rakkude vahelt leidub Langerhansi denriittrakke. Sõmerkihi rakud on teemandi kujulised ja omavad keratohüaliini ja lamellaarseid graanuleid. Lamellaarsete graanulite glükolipiidid hoiavad rakke koos. Läikekihis leiduvad keratinotsüüdid on surnud. Selles kihis toodetud eleidiin on üks keratohüaliini transformatsiooni produkt. Sarvkiht on kõige pindmine ja 20-30 rakukihi paksune. Surnud ilma tuumata keratinotsüüdid moodustavad seal esimese kaitsebarjääri.

Keratinotsüütide diferentseerumine on peamiselt reguleeritud epidermaalse differentsieerumiskompleksi (EDC) kuuluvate geenide poolt, mis kodeerivad muu hulgas involukriini, lorikriini ja väikseid proliinirikkaid valke (Moltrasio et al., 2022). Nende peamine roll nahas on organismi kaitse välismõjurite vastu (Pastar et al., 2014). Nende kaitse põhineb selles, et nad moodustavad barjääri, mis ennast ise vigastuste puhul parandab (Pastar et al., 2014).

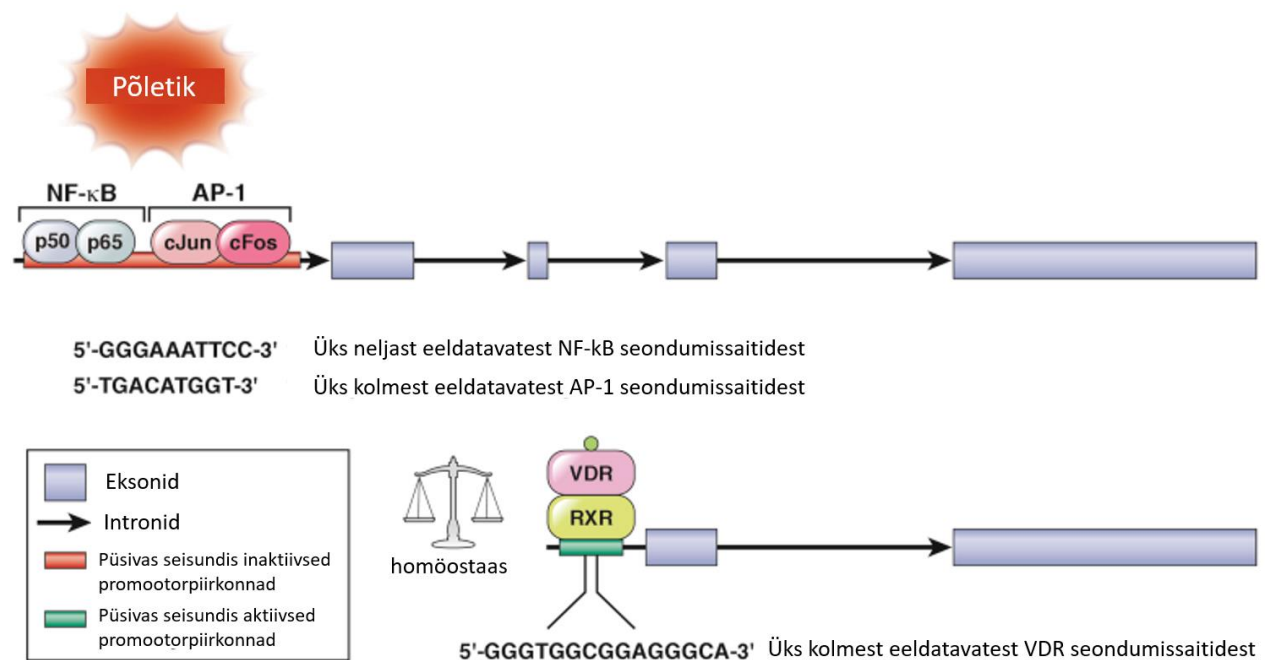
Füüsilise kaitse kõrval on keratinotsüütidel ka teisi organismi kaitsmise mehhanisme. Üks viis on PRR-ide (*pattern recognition receptor*) kaudu signaalide äratundmine. On olemas erinevaid PRR retseptoreid, mis keratinotsüütides on peamiselt TLR-id (Lebre et al., 2007). PRR-id tunnevad ära erinevaid patogeeni komponente ehk patogeeni seotud molekulaarseid mustreid (PAMP, ingl *pathogen-associated molecular pattern*) (Lebre et al., 2007). PAMP-id on näiteks bakterite lipopolüsahhariidid (LPS) (Lebre et al., 2007) või bakteri *Staphylococcus aureus* pinnal olev LTA (*lipoteichoic acid*) (Lai et al., 2009). LTA retseptorid on TLR2 ja TLR6, mis algatavad pärast nende aktiveerimist NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cell*) signaalraja (Pietrocola et al., 2011).



Joonis 1. Keratinotsüütide signaalrajad tolli-laadsete retseptorite (TLR) kaudu. Raku membraanil on retseptorid TLR1, 2, 4, 5 ja 6. Keratinotsüütide rakusisestel osakestel on leida TLR3 ja 9. TLR2 tunneb ära erinevaid patogeeniga seotud molekulaarseid mustreid, mille juurde kuuluvad triatsüül lipopeptiid koos TLR1ga. Kombinatsioonis TLR6ga tunneb TLR2 ära diatsetüül lipopeptiidi, peptiidoglükaani (PGN), lipoteikoonhapet (LTA) ja tsümosaani (ingl *Zymosan*). TLR 5 tunneb ära flagelliini. TLR4 tunneb ära lipopolüsahhariidi (LPS), milleks on vaja abistavaid valke differentseerumise klaster (CD14, *cluster of differentiation*) ja müeloid differentseerumisfaktor 2 (MD2, *myeloid differentiation factor 2*). Endosomaalsel membraanil olevad TLR3 ja TLR9 tunnevad ära vastavalt kaheahelalist RNAd (dsRNA) ja metüleerimata CpG DNAd. Stimulatsiooni korral aktiveerivad TLRid NF-κB (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) signaalraja aktiveerides põletikuga seotud tsütokiine. Lisaks võivad TLR3 ja 9 indutseerida tüüp 1 interferoonide (IFN) ekspressiooni interferooni regulatsiooni faktor 3 (TLR3) ja interferooni regulatsiooni faktor 7 (TLR9) signaalradade kaudu. Modifitseeritud ja tõlgitud (Piipponen et al., 2020) järgi.

Eristatakse kanoonilist ja alternatiivset NF-κB signaalrada. Kanoonilist signaalrada aktiveerivad põletikku indutseerivad tsütokiinid nagu IL-1 ja TNF-α (Karin et al., 2004) aga ka TLR-id (Akira et al., 2006). Alternatiivne signaalrada on aktiveeritud TNF-perekonna tsütokiinide poolt, välja arvatud TNFα. Sinna kuuluvad LT β, CD40L, TNFS5, BAFF, TNFS13B, RANKL ja TNFSF11 (Lawrence, 2009). Kanoonilise ja alternatiivse signaalrada erinevus seisneb aktiveeritavates kompleksides. Kanoonilisel signaalrajal aktiveeritakse RelA IκB fosforüleerimise abil, milles osalevad IκB- kinaasi subühikud IKKγ, IKKβ ja kinaasi aktiivsuse jaoks mitte tingimata vajalik IKKα

(Zandi et al., 1997). Kanooniline signaalrada on seotud põletiku soodustavate protsessidega. Inimese ateroskleroosi mudelis näidati, et kanooniline NF- κ B suurendab põletiku soodustavate tsütokiinide ekspressiooni (Monaco et al., 2004). Kuid on ka leitud, et NF- κ B subühik p50 inhibeerib proinflammatoorsete tsütokiinide ekspressiooni (Bohuslav et al., 1998). Alternatiivne signaalrada viib RelB/p52 kompleksi aktiveerimiseni, milleks fosforüleeritakse ja töödeldakse p100 I κ B kiinaasi subühikute NIK ja IKK α abil (Senftleben et al., 2001). Alternatiivse NF- κ B signaalraja peamiseks ülesandeks arvatakse olevat põletikuvastane roll, mis seisneb näiteks IKK α poolt kanoonilise signaalraja inhibeerimises bakteriaalses infektsioonis või alternatiivse raja RelB ja p52 põletikuvastases mõjus (Lawrence, 2009). Lee ja Ziegler (2007) näitasid ka, et NF- κ B on tähtis TSLP ekspressioonil. See informatsioon võiks siduda *S. aureuse* LTA mõju TSLP ekspressiooni regulatsioonile TLR2/TLR6 ja NF κ B signaalraja kaudu.



Joonis 2. Inimese TSLP geeni lookus. Erinevad transkriptsioonifaktorid seonduvad erinevatele saitidele ja indutseerivad sõltuvalt kontekstist, koest ja stiimulist pika ja lühikese TSLP isovormi. RXR, retinoid X retseptor; VDR, vitamiin D retseptor. Modifitseeritud ja tõlgitud (Tsilingiri et al., 2017) järgi

Keratinotsüüdid reageerivad erinevatele tsütokiinidele ning ekspresseerivad omakorda tsütokiine, et mõjutada immuunrakke. Näiteks toodetakse neis IFN- γ ja TNF- α retseptoreid (Boorsma et al., 1999), mille stimulatsioon indutseerib mõlemal juhul proinflammatoorse kemokiini CXCL-5 ja TNF- α puhul vaid CXCL-8 ekspressiooni (J. Li et al., 1996). TNF- α , CXCL-5 ja CXCL-8 mängivad lisaks olulist rolli makrofaagide ja neutrofiilide aktiveerimisel ja värbamisel (Larouche et al.,

2018). IFN- γ suurendab lisaks sellele ka tüüp II peamise koesobivuskompleksi (MHC-II) ekspressiooni (Albanesi et al., 1998), ja võimaldab keratinotsüütidel interakteeruda T-lümfotsüütidega olles atüüpiline antigeeni presenteerija (Auböck et al., 1986). Erinevate haavade paranemiseks ja barjääri taastumiseks on tsütokiinid IL-6, C-C kemokiin retseptorid (CCR) ja C-X-C- motiiv kemokiin retseptorid (CXCR), mis on toodetud nii immuunrakkude, kui ka keratinotsüütide poolt (Kroeze et al., 2012; Lin et al., 2003). Keratinotsüütide IL-34 (Greter et al., 2012), TGF- β (Kel et al., 2010) ja RANKL (Loser et al., 2006) on tähtsad Langerhansi rakkude (LC) kasvul ja differentseerumisel ning nende migreerumist lümfisõlmedesse põhjustavad IL-1 β , TNF- α ja GM-CSF (Enk & Katz, 1992). Lümfisõlmedes aktiveerivad LCd naiivseid T-rakke, mida värvatakse haavadesse (Soumelis et al., 2002).

1.1.2 TSLP ekspressioon nahas

Tuumuse stromaalne lümfopoetin (TSLP) on tsütokiin, mis on peamiselt ekspresseeritud naha, kopsude, soolestiku ja tuumuse epiteelrakkudes ja see leiti esmalt hiirte tuumuse stromaales raku-liinist (Friend et al., 1994; Rimoldi et al., 2005). Sellele vastavad retseptorid TSLPR ja IL-7R α on muuhulgas ekspresseeritud vereloome rakkudes (Pandey et al., 2000; Reardon et al., 2011; Ziegler & Artis, 2010). Erinevates uuringutes on leitud, et TSLP on seotud paljude immuunhaigustega, mis hõlmavad nahka, kopse, ja seedeelundkonda. TSLP ekspressiooni muutusi on täheldatud põletikulise nahaga patsientidel, kellel on näiteks netheroni sündroom (Briot et al., 2009) või AD (Soumelis et al., 2002). On teada, et TSLP on oluline faktor AD progressioonis allergilise riniidini või astmani (Han et al., 2012). Samuti on kindlaks tehtud, et TSLP mängib rolli erinevates vähitüüpides. Näiteks leiti kõhunäärme vähis, et CAF-id (*cancer associated fibroblast*) aktiveerivad läbi TSLP sekretsiooni dendriittrakke, mis viib Th2 rakkude polariseerimiseni, millel on oluline korrelatsioon vähi progressiooniga (Monte et al., 2011). Lisaks on CTCL-ides (*cutaneous T-cell lymphoma*) TSLP ekspressioon kõrge ja võib olla seotud lümfoomide tekkimisega (Takahashi et al., 2016).

TSLP mõju avaldub seondudes IL-7 retseptori α -ahelaga (IL-7R α) ja TSLP retseptoriga (TSLPR/CRLF2), kusjuures TSLPR ja TSLP omavaheline afiinsus on nõrk, kuid TSLPR ja IL-7R α heterodimeerne kompleks genereerib kõrge afiinsusega seondumissaidi (Pandey et al., 2000). TSLP ja IL-7 on osaliselt sarnaste funktsioonidega, kuna mõlemad aktiveerivad B-lümfotsüüte sarnaselt ja seonduvad mõlemad IL-7R α α -ahelaga (Friend et al., 1994; Park et al., 2000). TSLP signaalid käivad JAK/STAT (*Janus kinase/ transducer and activator of transcription*) signaalraja

kaudu, kus retseptorite heterodimeeri TSLPR-IL7R α signaaliülekanne käib vastavalt JAK2 ja JAK1 kaudu (Wang et al., 2022). Edasi aktiveeritakse signaal läbi STAT5A ja STAT5B ning vahesemal määral ka läbi STAT1 ja STAT3 (Rochman et al., 2010).

1.1.2.2 TSLP isovormid

Inimese puhul on hetkel teada, et eksisteerib kolm peamist TSLP transkripti varianti, millest ainult kaks moodustavad kodeerivat RNAd. Need kaks transkripti kodeerivad pikka vormi TSLPd (lftTSLP), mis on 159 aminohapet pikk, ja lühikest vormi (sfTSLP), mis hõlmab pika lftTSLP viimast 63 aminohapet (Fornasa et al., 2015). Esmalt arvati, et erinevate transkriptide näol on tegemist splaissimisproduktidega (Harada et al., 2009). Hiljem avastati aga, et tegemist on kahe erineva lugemisraamiga ja neid kontrollivad kaks erinevat promotori piirkonda (Fornasa et al., 2015; Harada et al., 2011). Erinevalt lftTSLP-st on sfTSLP ka terves nahas ekspresseeritud ning ei aktiveeri STAT5-te ja on lisaks sellele rohkem antibakteriaalse mõjuga (Bjerkan et al., 2015). Erinevate TSLP isovormide antibakteriaalse mõju testimiseks on kasutatud baktereid *S. mitis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* ja *Bacillus cereus*. Näidati, et sfTSLP vähendab bakterite arvu oluliselt rohkem kui lftTSLP (Bjerkan et al., 2015). Lisaks antibakteriaalse mõjule on sfTSLP ka põletikuvastane mõju, mis on tagatud sellega, et see isovorm takistab dendriitrakkude võimet indutseerida T-rakkude proinflammatoorsete tsütokiinide tootmist (Fornasa et al., 2015) Põletikuvastane efekt on vahendatud signaalrajaga, kus STAT5 asemel fosforüleeritakse p38 α (Bjerkan et al., 2015; Fornasa et al., 2015). See viitab sellele, et sfTSLP võib olla teine retseptor kui TSLPR (Bjerkan et al., 2015).

Pikk TSLP seondub TSLPR ja IL-7R α heterodimeerse kompleksiga (Park et al., 2000). NF- κ B on tähtis TSLP pika vormi ekspressiooni jaoks, kuna TSLP promotoralas esineb NF- κ B seondumisaht (Lee & Ziegler, 2007). On leitud, et inimeste normaalsete bronhi epiteelrakkudes (NHBE) on lftTSLP ekspressioon kõrgenenud, kui seda stimuleeritakse viiruseanaloogiga poly(I:C) ja see efekt on veel suurem, kui lftTSLP promotoregionis esineb SNP rs3806933(-847 C>T), mis põhjustab aktivaatorvalgu 1 AP-1(activating protein 1) seondumist sellele saidile (Harada et al., 2009). Kõrgenenud lftTSLP ekspressioonil bronhiepiteeli rakkudes on leitud ka positiivne korrelatsioon bronhiaalse astmaga (Harada et al., 2009). lftTSLP on tähtis tsütokiin põletikuvastusele. Seda isovormi leidub ainult põletikulises nahas ja põletiku tekitamine on suures osas põhjustatud CD11c⁺ dendriitrakkude aktiveerimisest, mis omakorda toodavad Th2 rakke värbavaid kemokiine (Soumelis et al., 2002).

Fornasa et al., 2015 teadustöös näidati, et patogeensed bakterid tõstavad immoraliseeritud sool-erakkude (*Caco-2*, *Cancer coli*) rakuliinis lftTSLP ja langetavad sfTSLP ekspressiooni, kuid mittepatogeensed bakterid ei näidanud mingit muutust. On ka teada, et AD patsientide põletikulises nahas on lftTSLP ekspressioon kõrgem kui mittepõletikulises nahas ja sfTSLP on põletiku korral vähem ekspresseeritud (Fornasa et al., 2015). Üldiselt arvatakse hetkel, et lühikesel TSLP isovormil on nahas homöostaatiline roll ja pikal isovormil on põletikuline roll (Fornasa et al., 2015).

TSLP isovormid mängivad ka rolli teistes haigustes. Tsöliaakia (CD) patsientidel on mõlemad TSLP isovormid vähem ekspresseeritud (Biancheri et al., 2016). Huvitav on see, et CD patsientide limaskestas üleekspresseritud valk furin on võimeline lftTSLPd lagundama (Biancheri et al., 2016).

Munasarja-, endomeetriumi- ja emakakaelavähi rakuliinides on leitud, et esineb ainult sfTSLP üleekspressioon ja see on tuumori kasvu soodustav (Chan et al., 2021). Huvitav on asjaolu, et TSLPR ei ole alati tuumori rakkudes ekspresseeritud, viidates veelkord sellele, et sfTSLP signaaliülekanne ei käi selle retseptori kaudu (Chan et al., 2021).

Ka osade viirusnakkuste puhul toimub TSLP ekspressiooni indutseerimine. Metapneumoviiruse mõju (hMPV) TSLP isovormide ekspressioonile on uuritud inimese hingamisteede epiteelirakuliinides (BEAS-2B ja A549) ja inimese loote kopsu fibroblastide rakuliinis ja leiti, et ekspressioon suurenes ainult lftTSLP isovormil (Y. Li et al., 2018). Samas töös kasutati UV-inaktiveeritud hMPV ja leiti, et lftTSLP ekspressioon on sõltuv viiruse replikatsioonist ja selle ekspressiooni algatavad retseptorid TLR-3 ja RIG-1 NF- κ B signaalraja kaudu.

1.1.2.3 TSLP ja AD

On teada, et TSLP on AD patsientide põletikulises nahas düsreguleeritud (Fornasa et al., 2015). Seega on TSLP oluline roll ADs. Lisaks on leitud seoseid ka geneetiliste markeritega: kõrge AD risk on seotud kolme TSLP-i SNP-ga (rs11466749, $P=0.028$; rs1898671, $P = 0.001$; rs2416259, $P=0.021$) (Gao et al., 2010). lftTSLP ekspressioonitase naha sarvkihi keratinotsüütides korreleerub isegi AD sümptomite raskusastmega (Dong et al., 2016), kus SCORAD haigusindeks näitab ka TSLP ja naha kuivusega korrelatsiooni (Sano et al., 2013). Niiskuskasvatamine nahale vähendab TSLP ekspressiooni ja AD sümptomeid (Sano et al., 2013). Kuiv nahk on oluline AD sümptom (Furie et al., 2017). Üks oluline tegur naha niiskuse tagamises on filagriini laguproduktid (Cabanillas & Novak, 2016). TSLP ei seostu filagriini loss-of-function mutatsioonide mõjuga AD-le (Klonowska et al., 2022).

TNF- α , IL-4 ja IL-13 on koos võimelised TSLP ekspressiooni suurendama (Bogiatzi et al., 2007). AD puhul on need tsütokiinid kõrgelt ekspresseeritud (Sano et al., 2013). Suurenenud TSLP ekspressioon viib Th2 immuunvastuseni (Beken et al., 2020). (Kitajima et al., 2011)) näitasid, et IL-4 võib põhjustada suurenenud TSLP mõju rakkudele TSLPR kaudu. CD4⁺ rakud on seotud atoopilise dermatiidi immuunvastusega, ja nende TSLPR ekspressioon on selle haiguse sümptomite raskusastme tegur (Tatsuno et al., 2015). TSLP ekspressiooni tuvastamist on kasutatud ka markerina AD ravi kulgemise hindamisel. Tatsuno ja kolleegid (2015) ravisid keskmiste kuni raskete AD sümptomitega patsiente antihistamiinidega ja kortikosteroididega, mis vähendas TSLP+CD4⁺ T-rakke, ja seega vähendasid ka AD sümptomeid kahe nädalaga (Tatsuno et al., 2015)

1.1.3 Naha mikrofloora muutused atoopilise dermatiidi patsientidel

Nahk on inimese kõige suurem organ ja on kodu paljudele erinevatele mikroobidele. Naha mikrofloora, mis koosneb viirustest ja seentest aga peamiselt bakteritest perekonnast *Staphylococcus*, *Micrococcus* ja *Propionibacterium* ning harva või vähesel määral gramm-negatiivsetest batsillidest ja bakteritest perekonnast *Streptococcus*, on naha erinevates kohtades erineva koosseisuga (Davis, 1996). Enamus nahal olevad seeneliikidest on perekonnast *Malassezia* (Findley et al., 2013).

Staphylococcus on grampositiivsete bakterite perekond, millest kommensaal *Staphylococcus epidermidis* leidub enamus inimeste naha peal (Traidl et al., 2021). Vastaselt varasematele arvamustele on teada, et baktereid perekonnast *Staphylococcus* ei leidu ainult nahal pindmiselt, vaid neid on ka leitud sügaval folliikulites (Kearney et al., 1984). Jinnestål ja kolleegid (2014) näitasid, et *Staphylococcus aureus* koloniseerimine naha peal korreleerub naha barjääri funktsiooni vähenemisega transepidermaalse vee kaotuse kaudu (Jinnestål et al., 2014). See omakorda viitab, et AD puhul muutub ka naha mikrofloora pigem patogeenide kasuks.

1.1.3.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus on inimese naha peal levinud patogeen (Grice & Segre, 2011). Rohkem kui 20% tervetest inimestel on seda bakterit leitud ninas (Noble et al., 1967). Väiksem bakterite mitmekesisus viib bakteri *S. aureus* ülekoloniseerimiseni nahal (Kong et al., 2012). Agr (*assecory gene regulator*) on *S. aureus* peamine virulentusega seotud lookus (Abdelnour et al., 1993). Üks osa toksiinidest, mida Agr reguleerib on fenoolis lahustuvad moduliinid (PSM) (Queck et al., 2008). Nende hulgas on peptiidid grupist PSM α , mis on toksilised keratinotsüütidele (Nakagawa et al., 2017). (Nakagawa et al., 2017) näitasid, et PSM α peptiidid põhjustavad tsütokiinide IL-1 α ja IL-36 α vabanemist, mis põhjustavad vastavas koes põletikku (Carrier et al., 2011; Kim et al.,

2013). Üks teine PSM on δ -toksiin, mis põhjustab nuumrakkude degranulatsiooni, mille efekt on IgE juuresolekul tugevam, ja IL-8 ekspressiooni, mis on põletikku soodustav kemokiin (J. Li et al., 1996; Nakamura et al., 2013). Nuumrakkude degranulatsioon soodustab Th2 tüüpi põletikku (Nakamura et al., 2013). Kemokiin IL-8 osaleb lisaks veel neutrofiilide aktivatsioonil ja värbamisel, mis on tähtsad *S. aureuse* vastase kaitse jaoks (J. Li et al., 1996). Haigused, mis põhjustavad neutrofiilide puudust kaasnevad tavaliselt ka *S. aureus* infektsiooniga (Lekstrom-Himes & Gallin). Siiski on see bakter võimeline naha peal edasi elama ka erijuhul, kus PSMide ekspressioon vajadusel väljalülitakse ja seetõttu muutuvad nad neutrofiilidele „nähtamatuteks“ (Shopsin et al., 2008). Lisaks on bakteri rakukesta LTA puhul täheldatud põletikuvastast mõju keratinotsüütidele, mis toimub TLR-3 inhibitsiooni abil läbi TLR-2 retseptori (Lai et al., 2009). Samas on Bauweiler ja kolleegid (2020) näidanud hiire mudelis, et LTA otsene kontakt epidermisega indutseerib tüüp 2 tsütokiine, mis omakorda tõstavad TSLP ekspressiooni. TSLP põhjustab IL-4 ekspressiooni ja basofiilide värbamist ja suurendab lisaks enda ekspressiooni (Brauweiler et al., 2020).

1.1.3.2 *Staphylococcus epidermidis*

Staphylococcus epidermidis on nahal elav bakter, mida saab eristada *S. aureusest* koagulaasi tootmise põhjal: *S. aureus* on koagulaas-positiivne ja *S. epidermidis* on koagulaas-negatiivne (CoNS, *coagulase-negative staphylococci*) (Kloos & Schleifer, 1975). Varem arvati, et *S. epidermidis* on ainult naha kommensaal, kuid hilisemad uuringud tegid kindlaks, et ta on ka võimeline nahabarjääri kahjustama (Cau et al., 2021). Selleks kasutab *S. epidermidis* tsüsteiinproteaasi EcpA, mis on Agr poolt reguleeritud ja töötab sarnaselt nagu mõned *S. aureuse* PSM-id. Kuid see on tingitud bakteri kõrgest kontsentratsioonist, naha pH väärtusest ja teiste koagulaas-negatiivsete bakterite olemasolust, kes suudavad *S. epidermidise* Agr süsteemi inhibeerida (Cau et al., 2021). Ka *S. epidermidisel* on rakumembraanil LTA, mille mõju on keratinotsüütide puhul põletiku vastust pärssiv. (Lai et al., 2009) katsetasid *S. epidermidise* mõju Poly(I:C) vastusele, mis on TLR3 stiimul ja said leidsid, et *S. epidermidise* mõjul on Poly(I:C) indutseeritud TNF- α ekspressioon inimese primaarsetes keratinotsüütides väiksem. See kinnitab, et *S. epidermidis* on võimeline põletikku vähendama.

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

Antud töö eesmärgiks on välja selgitada kuidas mõjutab *Staphylococcus aureuse* ja *Staphylococcus epidermidise* kuumtöödeldud rakumaterjal ning *Staphylococcus aureuse* bakteri rakukesta komponent LTA (lipoteichoic acid) inimese primaarsete keratinotsüütide rakuvastust TSLP ekspressioonis. Lisaks oli ülesandeks võrrelda nende mõju kahes erinevas söötmesüsteemis.

2.2. Materjal ja meetodika

2.2.1. Inimese primaarsete keratinotsüütide koekultuur

Uuringu jaoks kasutatud normaalseid inimese epidermaalseid keratinotsüüte (NHEK, *normal human epidermal keratinocytes*) kasvatati söötmes Keratinocyte-SFM (*Keratinocyte serum-free medium*), millele lisati 5 ng/ml inimese rekombinantset epidermaalset kasvufaktorit (rEGF, *human recombinant epidermal growth factor*), 50 ng/ml ajuripatsi ekstrakti (BPE, *bovine pituitary extract*) ja penitsilliini ja streptomütsiini segu (5 U/ml penitsilliini ja 5 µg/ml streptomütsiini, Gibco™) Võrdluseks kasutati teist söötmesüsteemi KGM3 (*Keratinocyte Growth Medium 3*, PromoCell) mille täpset koostist tootja ei avalda. Sellele lisati 5 U/ml penitsilliini ja 5 µg/ml streptomütsiini. Rakke kasvatati T75 rakumadratsites 37°C juures 5% CO₂ kontsentratsioonil veeauruga küllastunud inkubaatoris. Söödet vahetati igal teisel päeval. Rakkude passeerimise jaoks pesti rakke esmalt PBSiga (*phosphate buffered saline*) ja kasutati 2 ml trüpsiin-EDTA (*Trypsin-EDTA, no phenol red*, Gibco™), mille järel neid inkubeeriti 5 kuni 6 minutit 37°C inkubaatoris. Peale seda peatati reaktsioon 4 ml trüpsiini neutraliseerijaga (*Trypsin Neutralizer Solution*, Gibco™, USA). Pärast 7 minutilist tsentrifuugimist ruumitemperatuuril ja 260 g juures jagati rakud uutele kasvupindadele.

2.2.2. Primaarsete keratinotsüütide mõjutamine bakterirakukomponentidega ja TSLP ekspressiooni stimuleerijatega koekultuuris

Rakud jagati 12 kannusele plaadile. Kannu kohta pandi 75000 rakku ja 1 ml söödet. Järgmisel päeval vahetati sööde. Rakkude stimuleerimist kuumtöödeldud *S. aureus* (HKSA, *heat-killed Staphylococcus aureus*) (lõppkontsentratsioon söötmes 10⁷ rakke/ml, InvivoGen), kuumtöödeldud *S. epidermidis* (HKSE, *heat-killed Staphylococcus epidermidis*) (lõppkontsentratsioon söötmes 10⁷ rakke/ml, InvivoGen), *S. aureuse* LTA (Lõppkontsentratsioon söötmes 10 µg/ml), MC903 (lõppkontsentratsioon söötmes 10 µM, Merc), Poly I:C (lõppkontesnratsioon, InvivoGen) alustati 48 tundi pärast plaadile jagamist.

2.2.3 RNA eraldamine inimese primaarsetest keratinotsüütidest

RNA eraldamine tehti Total RNA Zol-Out kiti (A&A Biotechnology, Poola) modifitseeritud protokoll järgi. Selleks võeti eelnevalt TRIzol™ lüüsilahuses (Life Technologies, USA) lüüsitud keratinotsüüdid -80°C kapist, sulatati toatemperatuurile ja segati vorteksil. Pärast seda lisati QIAzol lüsaadile kloroformi suhtega 5:1, segati vorteksil ja inkubeeriti 2-3 minutit toatemperatuuril. Peale seda tsentrifugiti rakke 15 min 12000 g ja 4°C juures. Peale seda lisati segule 1:1 isopropanooli, segati vorteksil, kanti mikrokolonidele ja tsentrifugiti 1 min 12.000 g. Seejärel pesti kolonne kaks korda 700ul Zol-Out kiti A1 pesulahusega ja ühe korra 200ul A1 lahusega. RNAd elueeriti 40ul veega. Lõpuks mõõdeti RNA kontsentratsioone NanoDropiga ja proovid pandi -80°C kappi.

2.2.4. RT-qPCR mRNA ekspressiooni tuvastamiseks

RT-qPCRi teostamiseks tehti eelnevalt DNaasiga töödeldud RNAle komplementaarne DNA (cDNA). DNaasi töötamiseks kasutati DNase I, Rnase-free komplekti (DNase I, RNase-free EN0521, Thermo Scientific, USA). Selleks segati 400ng RNAd reaktsioonipuhvrit, DNaasi, Ribolocki ja milliQ vett tootja juhiste järgi nii kokku, et reaktsiooni lõppmaht oleks 10,5 ul. Proovid inkubeeriti 30 minutit 37°C juures. DNaasi reaktsiooni peatamiseks kasutati tootja EDTA lahust ning inkubeeriti proove 10 minutit 60°C juures.

cDNA tegemiseks lisati igale proovile 96-kannusel plaadil 1 ul 100uM oligo dT või *random hexamer* praimerit ja 2 ul 10 mM nukleotiidide segu (dNTP). Esmalt teostati 5 minuti 65°C inkubeerimine praimerit paremaks seondumiseks. Siis lisati proovidele RT puhvrit, RT ensüümi ja RNaasi inhibiitori segu (Thermo Scientific, USA). Seejärel teostati cDNA süntees järgneva programmiga: 25°C 5 min (ainult *random hexamer praimerit* puhul), 42°C 1h, 75°C 10 min ja lõpuks 4°C kuni plaadi eemaldamiseni masinast. cDNA proove hoiustati -20°C külmkapis.

RT-qPCR viidi läbi 384 kannuse plaadile kantud proovidega 12K Flex Real-Time PCR masinas (QuantStudio™). 6 ul 18ng ja 7ng eelnevalt tehtud cDNAd kasutati üheks reaktsiooniks. Sellele lisati 6 ul reaktsioonisegu, mis koosnes 2,4 ul 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR segust (Solis Biodyne, Eesti), 2,6 ul milliQ veest ja 1 ul 4 uM praimerit segust. Igal proovil oli RT-qPCRis kolm tehnilist kordust. RT-qPCRi programm oli järgmine: esimene etapp kaks minutit 50°C, 15 minutit 95°C, seejärel 40 kordusega 15 sekundit 95°C ja 1 minut 60°C. Teostati dissotsiatsioonianalüüs (*melt curve analysis*). RT-QPCRist saadud CT-väärtuste abil arvutati suhtelisi ekspressiooni muutusi kasutades Delta Delta CT meetodit (Livak & Schmittgen, 2001) ja väärtused normaliseeriti sihtmärgi EEF1A1 abil.

2.2.5. Statistiline analüüs

Andmete statistiline analüüs ja graafikute tegemine viidi läbi GraphPad Prism 8.0.1 programmiga. Statistiline analüüs tehti ühesuunalise ANOVA testiga (one-way ANOVA) ja andmete omavaheliseks korrigeeritud võrdluseks kasutati Tukey testi (Tukey's multiple comparison test). Ainult tulemused, mille väärtus oli alla $P=0,05$ arvestati statistiliselt oluliseks.

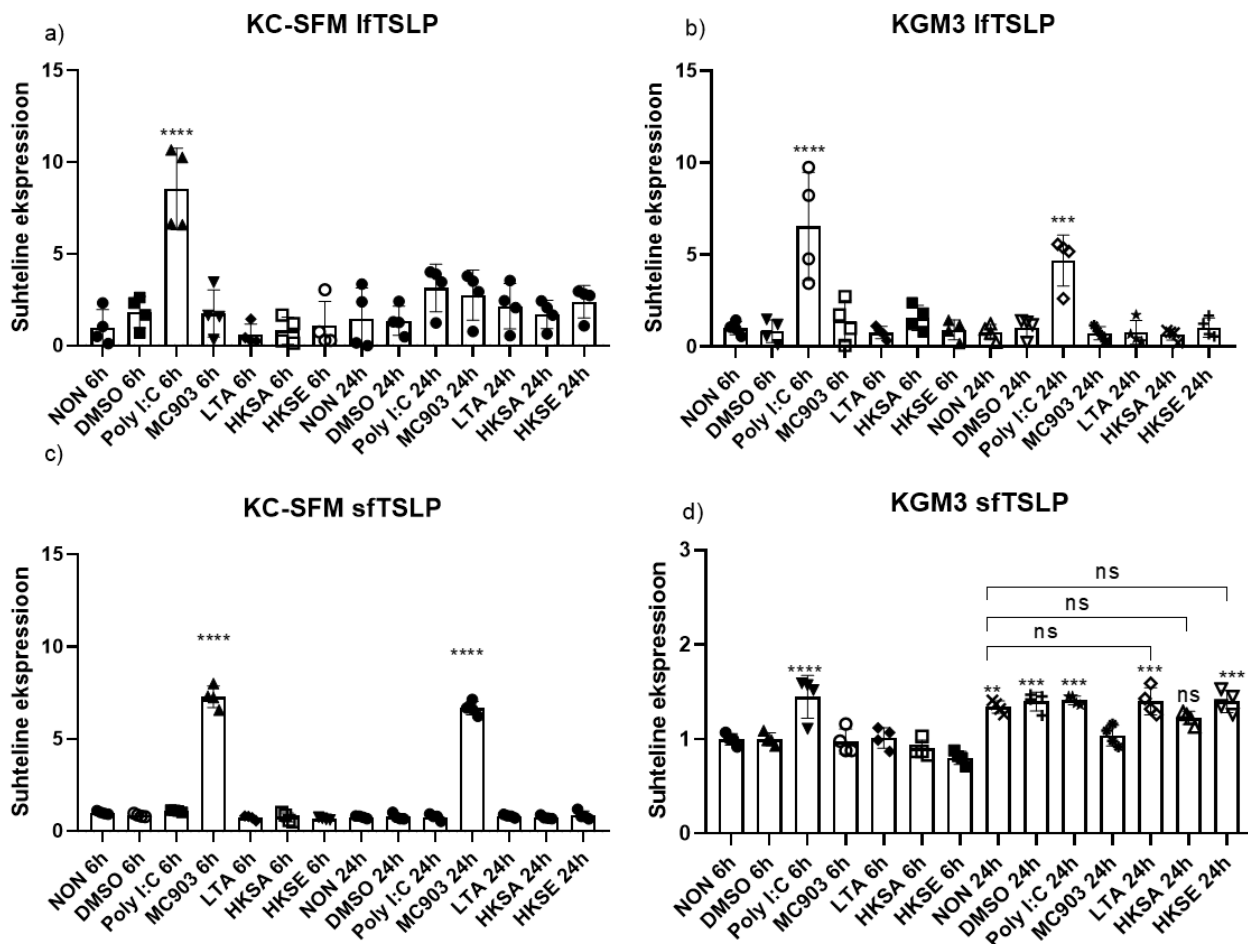
2.3. Tulemused

2.3.1 Kuumtöödeldud *Staphylococcus aureuse*, *Staphylococcus epidermidise* ja *Staphylococcus aureuse* LTA mõju TSLP ekspressioonile inimese primaarsetes keratinotsüütides

Antud töö peaesmärgiks oli uurida, kuidas mõjutavad kuumtöödeldud *Staphylococcus aureuse* ja võrdluseks *Staphylococcus epidermidise* rakukomponendid TSLP transkriptide ekspressiooni primaarsetes keratinotsüütides. Katse jaoks töödeldi keratinotsüütide rakukultuure *S. aureuse* LTA (lipoteikoonhape), ja kuumtöödeldud *S. aureuse* ja *S. epidermidise* rakukomponentidega ning analüüsiti rakke pärast 6h ja 24h töötlust. Positiivsete kontrollidena lftTSLP ja sftTSLP transkriptide indutseerimiseks kasutati vastavalt Poly I:C ja MC903 töötlust. DMSO töötlust kasutati negatiivse kontrollina, sest MC903 kontsentratsioon oli lahustatud DMSOs.

Selleks, et tuvastada TSLP ekspressiooni RT-qPCRi meetodil kasutati kahte erinevat praimerite paari, eristamaks pikka lftTSLP isovormi ja lühikest sftTSLP isovormi. Saadud tulemused näitavad ootuspäraselt lftTSLP indutseerimiseks kasutatud Poly I:C mõju lftTSLP ekspressiooni tõusuna 6h ajapunktil kuid mitte 24h ajapunktil KC-SFM söötmesüsteemis (Joonis 3a). KGM3 söötmesüsteemis aga oli lftTSLP ekspressioon suurenenud mõlemas ajapunktis (Joonis 3b). Mõlema söötmesüsteemi puhul LTA, HKSE ja HKSA ei suurendanud lftTSLP ekspressiooni vaadeldud ajapunktidel (Joonis 3a, b). SftTSLP ekspressiooni suurendas KC-SFMi söötmesüsteemis ootuspäraselt sftTSLP kontroll-indutseerijana kasutatud MC903 nii 6h kui ka 24h punktil (Joonis 3c). Ülejäänud stiimulid ei põhjustanud selle söötme korral olulisi muutusi sftTSLP ekspressioonil vaadeldud ajapunktides (Joonis 3c). KGM3 söötme korral ei olnud võimalik tuvastada MC903 poolt põhjustatavat sftTSLP ekspressiooni indutseerimist (Joonis 3d) kuigi MC903 mõju hindamiseks kasutatud CYP24A1 ekspressioon oli mõjutuse korral ootuspäraselt suurenenud (Lisa1, Joonis 1). Vähene ekspressiooni suurenemine oli KGM3 söötme puhul tuvastatav hoopis Poly I:C töötluste korral (Joonis 3d) Võrreldes 6h ajapunktidega, oli näha vähest kuid statistiliselt olulist sftTSLP ekspressiooni tõusu peaaegu kõigis 24h proovides välja arvatud HKSA ja MC903 puhul (Joonis 3d). Analüüsid

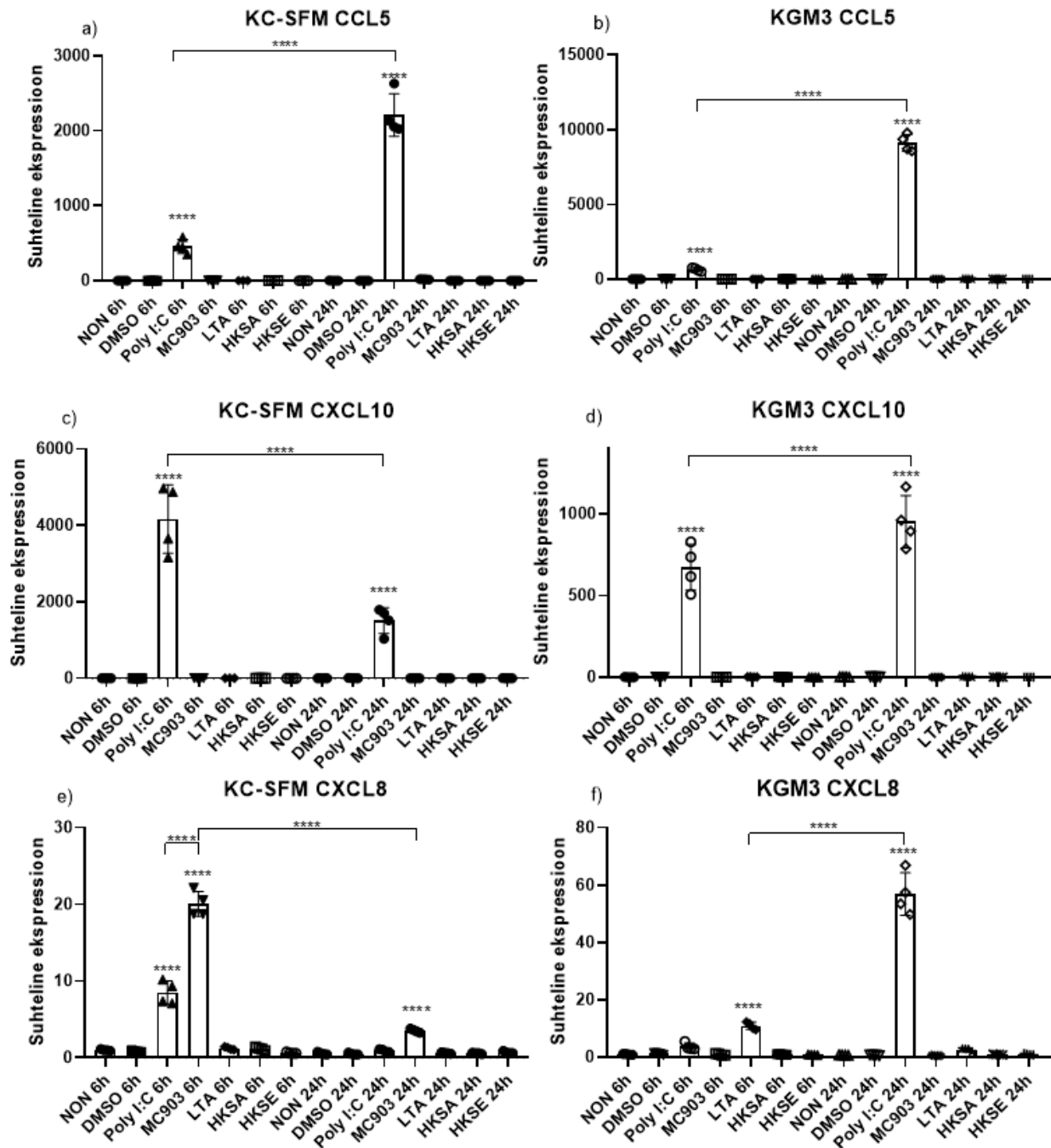
mõlema ajapunkti tulemusi eraldi, leiti, et 24h ajapunkti puhul esineb statistiliselt oluline muutus vaid MC903 töötlemise puhul, kus sfTSLP ekspressioon on vähenenud võrreldes 24h tunni töötlemata rakkudega (Lisa 3, Joonis 1)



Joonis 3. lftTSLP (a, b) ja sfTSLP (c, d) ekspressioon inimese primaarsetes keratinotsüütides pärast nende 6h ja 24h HKSE, HKSA ja *S. aureuse* LTA töötlemist söötmesüsteemides KC-SFM (a, c) ja KGM3 (b, d). Inimese primaarseid keratinotsüüte stimuleeriti 6h ja 24h kuumtöödeldud materjalidega bakteritest *S. aureus* ja *S. epidermidis* ja *S. aureuse* LTaga. Negatiivseteks kontrollideks on töötlemata proov ja DMSOga töödeldud proov (MC903 lahusti). Positiivseteks kontrollideks lftTSLP ja sfTSLP indutseerimises olid vastavalt Poly I:C ja MC903ga töödeldud proovid. lftTSLP ja sfTSLP ekspressiooni mõõdeti RT-qPCRi abil. Sellest saadud CT-väärtused normaliseeriti koduhoidjaga *EEF1A1* ja 6h ajapunkti töötlemata prooviga. Statistiline analüüs viidi läbi ühesuunalise ANOVA testiga ja omavahelisi korrigeeritud võrdlusi tehti Tukey testiga. N=4; ** P<0,01; * P<0,001; **** P<0,0001**

Sarnaselt eelnevale teostati ka qPCR analüüs proinflammatoorsete tsütokiinide CCL5, CXCL10 ja CXCL8 suhtes. Ootuspäraselt näitavad statistilise analüüsi tulemused, et CCL5 ekspressioon

suureneb Poly I:C töötuse korral. See mõju on 24h ajapunktil oluliselt suurem võrreldes 6h ajapunktiga ja mõlemates söötmesüsteemides sarnane (Joonis 4a,b). Ka siin on LTA, HKSE ja HKSA mõju mõlemates söötmesüsteemides statistiliselt mitte olulised (Joonis 4a,b). CXCL10 geeniekspressiooni analüüsid näitavad, et Poly I:C on ainus mõjur. Poly I:C suurendas KC-SFMI söötmes keratinotsüütide CXCL10 ekspressiooni 6h ajapunktis. 24h ajapunktis Poly I:C indutseeritud CXCL10 ekspressioon on võrreldes 6h ajapunkti tulemusega oluliselt väiksem. Muud stiimulid ei põhjustanud mõlemates ajapunktides olulisi muutusi (Joonis 4c). KGM3 söötmes kasvatatud keratinotsüüdid näitasid sarnaseid tulemusi ekspressiooni suurenemisel, kuid erinevus oli see, et Poly I:C poolt indutseeritud CXCL10 ekspressioon on 24h punktis oluliselt suurem, kui 6h punktis (Joonis 4d). CXCL8 ekspressioon on KC-SFMI söötmesüsteemis suurenenud 6h jooksul Poly I:C ja MC903 poolt, kuid MC903 põhjustatud CXCL8 ekspressiooni tõus on võrreldes Poly I:C mõjuga oluliselt suurem (Joonis 4e). Analüüsid korrigeeritud 6h ja 24h ajapunkti proove, näitasid 24h ajapunkti võetud proovid ainult MC903 põhjustatud statistiliselt olulist muutust, kuid CXCL8 ekspressiooni tõus on väiksem võrreldes 6h ajapunktiga (Joonis 4e). Analüüsid mõlema ajapunkti tulemusi eraldi, oli vähene ekspressiooni tõus tuvastatav ka 24h Poly I:C töötuse korral (Lisa 2, Joonis 1a). CXCL8 ekspressioon KC-SFM söötmesüsteemis ei ole mõjutatud HKSA, HKSE ja LTA poolt (Joonis 4e). Analüüsid kõiki ajapunkte korrigeeritud on KGM3 söötmesüsteemis Poly I:C mõju statistiliselt oluline ainult 24h proovis (Joonis 4f), kuid analüüsid ajapunkte eraldi, on ekspressiooni tõus oluline ka 6h korral (Lisa 2, Joonis 1c). Huvitav on see, et erinevalt KC-SFM söötimest on CXCL8 ekspressioon KGM3 söötmesüsteemis 6h ajapunktis LTA poolt oluliselt suurenenud (Joonis 4f). Vastupidiselt KC-SFM söötmesüsteemile ei ole KGM3 söötme puhul MC903 indutseeritud CXCL8 ekspressioon tuvastatav (Joonis 4f), kuid CYP24A1 ekspressiooni analüüsiga näidati, et MC903 mõju on olemas (Lisa 1, Joonis 1).



Joonis 4. Tütokiinide CCL5, CXCL10 ja CXCL8 ekspressioon inimese primaarsetes keratinotsüütides pärast nende 6h ja 24h HKSE, HKSA ja *S. aureuse* LTA töötlemist KC-SFMi (a, c, e) ja KGM3 (b, d, f, g) söötmesüsteemis. Inimese primaarseid keratinotsüüte stimuleeriti 6h ja 24h kuumtöödeldud materjalidega bakteritest *S. aureus* ja *S. epidermidis* ja *S. aureuse* LTAg. Negatiivseteks kontrollideks on töötlemata proov ja DMSOga (MC903 lahusti) töödeldud proov. Positiivseteks kontrollideks olid Poly I:C ja MC903ga töödeldud proovid. CCL5, CXCL10 ja IL8 ekspressiooni mõõdeti RT-qPCRi abil. Sellest saadud CT-väärtused normaliseeriti koduhoidjaga *EEF1A1* ja 6h või 24h ajapunkti töötlemata prooviga. Statistiline analüüs viidi läbi ühesuunalise ANOVA testiga ja omavahelisi võrdlusi tehti Tukey testiga. N=4; ** P<0,0001**

2.3. Arutelu

AD on haigus, milles TSLP mängib olulist rolli selle tekkimisel ja haiguse ägenemisel (Sano et al., 2013). LfTSLP, mille ülesanne on põletikuvastuse teke on keratinotsüütides AD puhul rohkem ekspresseeritud ja sfTSLP, millel arvatakse homöostaasi tagamise ülesanne nahas on AD puhul keratinotsüütides vähem ekspresseeritud (Fornasa et al., 2015; Varricchi et al., 2018). Bakterid *Staphylococcus aureus* ja *Staphylococcus epidermidis* on olulised AD patsientide kahjustatud naha koloniseerijad. Varasemates uuringutes on näidatud, et *S. aureuse* LTA põhjustab otsese kontaktiga hiire nahas TSLP ekspressiooni suurendamist (Brauweiler et al., 2020). Kuid kas see kehtib ka inimesete keratinotsüütidele, pole täpsustatud. Eelnevalt on näidatud ka kuumtöödeldud *S. aureuse* rakumaterjali mõju suurendamiseks TSLP ekspressiooni inimese keratinotsüütide koekultuuris (Vu et al., 2010), ent pole teada täpselt millise isovormiga on tegemist. Sellest tulenevalt oli käesoleva bakalaureuse töö eesmärk uurida *S. aureuse* LTA ja kuumtöödeldud materjali mõju erinevate TSLP transkriptide ekspressioonile inimese primaarsetes keratinotsüütides ning võrrelda seda ka kommensaali *S. epidermidise* kuumtöödeldud rakumaterjali mõjuga. TSLP isovormide eristamine on tähtis, kuna nende ülesanded on erinevad ja eristamata TSLP transkriptide ülesamplifitseerimine ei võimalda teha selgeid järeldusi.

Varasemalt on bio- ja siirdemeditsiini instituudis RNA bioloogia töörühmas kasutatud keratinotsüütide koekultuuris kasvatamiseks söödet Keratinocyte-Seerum Free Meedium (KC-SFM). Kuid viimati mindi üle uuele söötmesüsteemile, kus kasutatakse nende kasvatamiseks söödet Keratinocyte Growth Medium 3 (KGM3). Et teada saada, kas söötme muutus võiks mõjutada kasutatavate stimulantide mõju keratinotsüütides, oli praktiline vajadus võrrelda vana ja uut söötmesüsteemi. Oma töös teostasins katsed KC-SFM söötmesüsteemis ning minu juhendaja Martin Pook viis samasugused katsed läbi KGM3 söötmesüsteemis, misjärel teostasins kõikide katsete võrdluseks qPCR analüüsi.

Varem on näidatud, et LTA on üks tähtis immuunogeenseid komponente, mis aktiveerib põletikku soodustavaid tsütokiine ja aktiveerib neutrofiile inimese veres (Kang et al., 2018). Selle signaalsüsteem toimub läbi TLR2/TLR6 ja algatab põletikuga seotud protsessidega NF- κ B signaaliraja (Pietrocola et al., 2011). NF- κ B signaaliraja puhul, mis käivitub läbi TLR2 on näidatud TSLP ekspressiooni suurenemist inimese bronhi epiteelrakkudes (Lee & Ziegler, 2007). See viitab võimalusele, et LTA indutseerib ka epiteeli rakkudes TSLP ekspressiooni. Liaks on näidatud *S. aureuse* LTA mõju hiire nahas TSLP ekspressiooni suurendamisel (Brauweiler et al., 2020). Selle

bakalaureusetöö tulemused näitasid aga, et LTA ei mõjuta TSLP isovormide ekspressiooni. Sarnased tulemused TSLP ekspressiooni kohta saadi nii KC-SFM, kui ka KGM3 söötmesüsteemi puhul. SfTSLP ekspressioon ei ole LTA poolt indutseeritud KC-SFM söötmes, kuid KGM3 söötmes kasvatatud keratinotsüütide sfTSLP ekspressioon on 24h punktis võrreldes töötlemata rakkude 6h ajapunktiga suurenenud. Tuleb aga tähele panna, et ka 24h töötlemata proovi sfTSLP on samaväärselt indutseeritud. Võrreldes sellega ei ole 24h LTA mõju statistiliselt oluline. Sama fenomen sfTSLP ekspressioonis esines ka teiste 24h punkti stiimulitega: DMSO, Poly(I:C) ja HKSE. See võib olla põhjustatud sellest, et sfTSLP on tervetes keratinotsüütides konstantselt ekspresseeritud (Bjerkkan et al., 2015) ning rakkude arvu kasvuga 24h jooksul võib kaasneda ka suurem sfTSLP ekspressioon. Et KC-SFM söötme puhul sarnast tulemust ei täheldatud, viitab see söötmete mõju erinevusele keratinotsüütidele, sest katsetes kasutatud keratinotsüüdid olid pärit samast algallikast. KGM3 söötme koostist tootja aga kahjuks ei avalda ning ei seetõttu pole võimalik teada saada, mis on erinev võrreldes KC-SFM söötmega. KGM3 söötmesüsteemi ajapunktide eraldi tehtud normaliseerimisest ja analüüsimisest selgus, et MC903 puhul on sfTSLP ekspressioonile huvitaval kombel inhibeeriv mõju, mis täiesti vastupidine KC-SFM söötmele, kus MC903 oli kasutuses poitiivse kontrollina sfTSLP ekspressiooni indutseerijana ja oli tuvastatav ka sfTSLP ekspressiooni tõus mõlemas ajapunktis. Võrreldes erinevaid söötmeid on näha ka CXCL10 ja CXCL8 korral ekspressioonides vastupidist muutust Poly I:C puhul, samas kui CCL5 ekspressioon sarnaneb mõlemas söötmesüsteemis. On ootamatu, et erinevalt KC-SFM söötmesüsteemist MC903 ei indutseerinud KGM3 söötme korral lisaks sfTSLPle ka vastust CXCL8 ekspressioonis, samas kui eelnevalt on laboris tehtud katsetega alati sellekohane rakuvastus tuvastatud.

Staphylococcus aureus on tuntud nahka koloniseeriv patogeen, mis võib lookuse Agr kaudu reguleeritud PSMide abil põletiku sümptomeid suurendada (Nakamura et al., 2013). *S. aureuse* nahal koloniseerimisega on leitud korrelatsioon naha barjääri funktsiooni kaotusega (Jinnestål et al., 2014). Ka lftTSLP näitab korrelatsioone naha kuivusega ja barjääri funktsiooni puudulikkusega (Sano et al., 2013). Antud bakalaureusetöö tulemustest selgus, et kuumtöödeldud *S. aureuse* raku materjal ei indutseeri lftTSLP ekspressiooni keratinotsüütide koekultuuris ning selles osas polnud erinevusi ka söötmesüsteemides. See tulemus erineb eelnevalt publitseeritud (Vu et al., 2010), kus TSLP ekspressiooni suurenemist tuvastati, ent selles töös kasutati keratinotsüütide kasvatamist FBS (*fetal bovine serum*) juuresolekul ning see viitab asjaolule, et sealses katses võisid keratinotsüüdid olla rohkem diferentseerunud. Antud bakalaureusetöö katsetes kasutatud söötmesüsteemid aga peaksid eelkõige soodustama diferentseerumata keratinotsüütide kasvu. Edasistes katsetes

oleks vaja võrrelda keratinotsüütide rakuvastuseid indutseerides neis rakkudes erineval määral diferentseerumist, mis võimaldaks teada saada, kas muu hulgas ka sTSLP ekspressioon on seotud keratinotsüütide diferentseerumismääraga. Varasemad uuringud näitasid, et TSLP lühikese isovormi ekspressioon on patogeensete bakterite mõjul keratinotsüütides vähenenud, kuid mittepatogeensed bakterid sellist mõju ei avalda (Fornasa et al., 2015). SftTSLP ekspressioon ei ole aga käesoleva bakalaureusetöö katsetes HKSA poolt mõlemates söötmesüsteemides indutseeritud või vähendatud. Siinkohal võivad erinevused tuleneda eelkõige sellest, et elusatel bakteritel on teistsugune mõju keratinotsüütidele kui antud bakalaureusetöös kasutatud kuumtöödeldud bakteriraku materjalil.

Staphylococcus epidermidis on kirjeldatud varem kui naha kommensaali, kuid ka see bakter võib kahjustada nahabarjääri (Cau et al., 2021). Barjääri kahjustav aine on *S. epidermidise* Agr polt reguleeritud EcpA, mis on AD patsientide naha pinnal (Cau et al., 2021). See viitab sellele, et ka *S. epidermidis* võib kahjustada sobival tingimusel nahabarjääri ja see sobiv tingimus on AD puhul kahjustatud nahk. Fornasa ja teised (2015) näitasid, et patogeensed bakterid on võimelised epiteelirakkude lftTSLP ekspressiooni suurendama ning sTSLP ekspressiooni vähendama. Minu töö tulemused aga ei näidanud mingit olulist vastust nii pika kui ka lühikese TSLP isovormi puhul. Erinevusi ei leia ka võrreldes KC-SFMis ja KGM3 söötmesüsteemides kasvatatud keratinotsüüte. *S. epidermidis* on ainult spetsiifilistes tingimustes patogeenne ja EcpA tootmine sõltub teistest koagulaas-negatiivsetest bakteritest (Cau et al., 2021). Seega võib tulemusi muu hulgas sellega seletada, et kuumtöödeldud bakterid neid tingimusi ei täida.

CXCL8 (IL8) on põletikuga seotud tsütokiin, mille ekspressioon nahas korreleerub tugevalt AD raskusastmega (Andersson et al., 2022; J. Li et al., 1996). Erinevalt TSLP isovormidele leiti KGM3 söötmesüsteemis kasvatatud keratinotsüütides LTA poolt suurendatud CXCL8 ekspressiooni 6h ajapunktis. See viitab sellele, et *S. aureuse* LTA tekitab vaid teatud tingimustel rakukultuuris kasvatatud keratinotsüütides rakuvastuse. Seega oleks edaspidistes töodes vaja rohkem tähelepanu pöörata erinevatele keratinotsüütide söötmesüsteemidele jälgimaks kuidas nende komponendid võivad mõjutada rakuvastust.

Selles bakalaureusetöös leiti erinevusi KC-SFMis ja KGM3 kasvatatud keratinotsüütides nende tsütokiinide ekspressioonis. Üheks võimalikuks põhjuseks võib olla söötmete võimelisus või võimetus hoida keratinotsüüte dedifferentseerunud olekus. Kuna kuumtöödeldud *S. aureus* ja *S.*

epidermidis ei põhjustanud TSLP isovormide ja tsütokiinide CCL5, CXCL10 ja CXCL8 ekspresiooni, siis võiks järgmises töö etapis teha sarnaseid katseid ka elusate bakteritega.

KOKKUVÕTE

Atoopiline dermatiit (AD) on krooniline nahahaigus, mis esineb terves maailmas 15-20% lastel ja kuni 10% täiskasvanutel (Laughter et al., 2021). Haigust iseloomustavad epidermaalsed nahabarjääri häired ja Th2 tüüpi põletik (Furue et al., 2017; Weidinger et al., 2006). TSLP tuntud Th2 tüüpi põletikuga seotud tsütokiin.. *Staphylococcus aureus* on naha peal elav patogeen, mis süvendab AD sümptomeid ja on võimeline kahjustama naha barjääri (Jinnestål et al., 2014). Varasemad uuringud on näidanud, et *S. aureuse* LTA suurendab hiire nahas TSLP ekspressiooni (Brauweiler et al., 2020).

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärk oli teada saada, kuidas pikka ja lühikese TSLP isovormi transkriptid on ekspresseeritud, kui keratinotsüüte on mõjutatud 6 tundi ja 24 tundi kuumtöödeldud bakterite *S. aureuse*, *S. epidermidise* ja *S. aureuse* LTAga ning võrrelda nende mõju kahes erinevas söötmesüsteemis. Söötmesüsteemideks olid Keratinocyte-SFM ja KGM3.

Tulemused näitasid, et kuumtöödeldud *S. aureus* ja *S. epidermidis* ei mõjutanud lftTSLP ja sftTSLP ekspressiooni. Samuti ei mõjutanud LTA TSLP ekspressiooni. Katsetes läbiviidud CXCL8 ekspressiooni analüüs näitas, et KGM3 söötmes indutseerib LTA selle ekspressiooni. Kuumtöödeldud bakteriraku materjal ei indutseerinud põletikuvastusega seotud sihtmärkide CCL5, CXCL8 ja CXCL10 ekspressiooni. Bakalaureusetöö tulemustest selgus, et KC-SFMis ja KGM3 söötmes kasvatatud keratinotsüütidel on erinevusi, mille põhjusi tuleb edasistes katsetes veel välja selgitada. Kuumtöödeldud materjaliga keratinotsüütide töötlemine kasutatud söötmesüsteemides ei olnud piisav meetod, et näha kuidas nahapinna bakterid mõjutavad TSLP ekspressiooni keratinotsüütides.

***Staphylococcus aureus* as an inducer of TSLP in primary human keratinocyte cellculture**

Mart Ole Peters

Summary

Atopic dermatitis (AD) is a chronic skin disease that affects 15-20% of children and up to 10% of adults worldwide (Laughter et al., 2021). The disease is characterised by epidermal skin barrier disorders and Th2-type inflammation (Furie et al., 2017; Weidinger et al., 2006). Th2-type inflammation can be induced by the cytokine TSLP. *Staphylococcus aureus* is a pathogen found on the skin of AD patients, is known to exacerbate AD symptoms and is capable of damaging the skin barrier (Jinnestål et al., 2014). Previous studies have shown that *S. aureus* LTA increases TSLP expression in mouse skin (Brauweiler et al., 2020).

The aim of this bachelor's thesis was to find out how the long and short TSLP isoforms are expressed on transcriptional level when keratinocytes are treated for 6h and 24h with heat-killed bacteria *S. aureus*, *S. epidermidis* and *S. aureus* LTA and to compare their effects in two different medium systems. Keratinocyte-SFM and KGM3 were used as media systems.

The results showed that heat-treated *S. aureus* and *S. epidermidis* did not affect the expression of lftTSLP and sfTSLP. LTA also did not affect the expression of the short and long isoforms. Analysis of CXCL8 expression in the experiments showed that LTA induces its expression in KGM3 medium. The results of the bachelor's thesis showed that there are differences between keratinocytes cultured in KC-SFM and KGM3 medium, the reasons for which need to be examined in further experiments. Treatment with heat-killed bacteria was not a sufficient method to determine how skin surface bacteria affect TSLP expression in keratinocytes.

TÄNUSÕNAD

Täna südamest minu juhendajat PhD Martin Pooki, kes õpetas tööd laboris, juhendas suure pühendumisega eksperimentide läbiviimist ja luges kannatlikult bakalaaurusetöö korrektuuri.

Ma tänan juhendajat PhD Tõnis Orgu ja RNA bioloogia uurimisgrupi juhatajat prof. Ana Rebast.

KASUTATUD ALLIKAD

- Abdelnour, A., Arvidson, S., Bremell, T., Rydén, C., & Tarkowski, A. (1993). The accessory gene regulator (agr) controls *Staphylococcus aureus* virulence in a murine arthritis model. *Infection and Immunity*, *61*(9), 3879–3885. <https://doi.org/10.1128/iai.61.9.3879-3885.1993>
- Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, *124*(4), 783–801. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.015>
- Albanesi, C., Cavani, A., & Girolomoni, G. (1998). Interferon-gamma-stimulated human keratinocytes express the genes necessary for the production of peptide-loaded MHC class II molecules. *The Journal of Investigative Dermatology*, *110*(2), 138–142. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.1998.00098.x>
- Andersson, A. M., Sølberg, J., Koch, A., Skov, L., Jakasa, I., Kezic, S., & Thyssen, J. P. (2022). Assessment of biomarkers in pediatric atopic dermatitis by tape strips and skin biopsies. *Allergy*, *77*(5), 1499–1509. <https://doi.org/10.1111/all.15153>
- Arda, O., Göksügür, N., & Tüzün, Y. (2014). Basic histological structure and functions of facial skin. *Clinics in Dermatology*, *32*(1), 3–13. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2013.05.021>
- Auböck, J., Romani, N., Grubauer, G., & Fritsch, P. (1986). Hla-DR expression on keratinocytes is a common feature of diseased skin. *The British Journal of Dermatology*, *114*(4), 465–472. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.1986.tb02851.x>
- Baroni, A., Buommino, E., Gregorio, V. de, Ruocco, E., Ruocco, V., & Wolf, R. (2012). Structure and function of the epidermis related to barrier properties. *Clinics in Dermatology*, *30*(3), 257–262. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2011.08.007>
- Beken, B., Serttas, R., Yazicioglu, M., Turkekul, K., & Erdogan, S. (2020). Quercetin Improves Inflammation, Oxidative Stress, and Impaired Wound Healing in Atopic Dermatitis Model of Human Keratinocytes. *Pediatric Allergy, Immunology, and Pulmonology*, *33*(2), 69–79. <https://doi.org/10.1089/ped.2019.1137>
- Biancheri, P., Di Sabatino, A., Rescigno, M., Giuffrida, P., Fornasa, G., Tsilingiri, K., Pender, S. L. F., Papadia, C., Wood, E., Pasini, A., Ubezio, C., Vanoli, A., Forbes, A., MacDonald, T. T., & Corazza, G. R. (2016). Abnormal thymic stromal lymphopoietin expression in the duodenal mucosa of patients with coeliac disease. *Gut*, *65*(10), 1670–1680. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-308876>
- Bjerkan, L., Schreurs, O., Engen, S. A., Jahnsen, F. L., Baekkevold, E. S., Blix, I. J. S., & Schenck, K. (2015). The short form of TSLP is constitutively translated in human keratinocytes and has characteristics of an antimicrobial peptide. *Mucosal Immunology*, *8*(1), 49–56. <https://doi.org/10.1038/mi.2014.41>
- Bogiatzi, S. I., Fernandez, I., Bichet, J.-C., Marloie-Provost, M.-A., Volpe, E., Sastre, X., & Soumelis, V. (2007). Cutting Edge: Proinflammatory and Th2 cytokines synergize to induce thymic stromal lymphopoietin production by human skin keratinocytes. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *178*(6), 3373–3377. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.6.3373>
- Bohuslav, J., Kravchenko, V. V., Parry, G. C., Erlich, J. H., Gerondakis, S., Mackman, N., & Ulevitch, R. J. (1998). Regulation of an essential innate immune response by the p50 subunit of NF-kappaB. *The Journal of Clinical Investigation*, *102*(9), 1645–1652. <https://doi.org/10.1172/JCI3877>
- Boorsma, D. M., Flier, J., van den Brink, E. N., Sampat, S., Walg, H. L., Willemze, R., Tensen, C. P., & Stoof, T. J. (1999). IP-10 mRNA EXPRESSION IN CULTURED KERATINOCYTES IS SUPPRESSED BY INHIBITION OF PROTEIN KINASE C AND TYROSINE KINASE AND ELEVATION OF cAMP.
- Brauweiler, A. M., Goleva, E., & Leung, D. Y. M. (2020). *Staphylococcus aureus* Lipoteichoic Acid Initiates a TSLP-Basophil-IL4 Axis in the Skin. *The Journal of Investigative Dermatology*, *140*(4), 915-917.e2. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2019.09.004>
- Briot, A., Deraison, C., Lacroix, M., Bonnart, C., Robin, A., Besson, C., Dubus, P., & Hovnanian, A. (2009). Kallikrein 5 induces atopic dermatitis-like lesions through PAR2-mediated thymic stromal lymphopoietin expression in Netherton syndrome. *The Journal of Experimental Medicine*, *206*(5), 1135–1147. <https://doi.org/10.1084/jem.20082242>

- Cabanillas, B., & Novak, N. (2016). Atopic dermatitis and filaggrin. *Current Opinion in Immunology*, *42*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2016.05.002>
- Carrier, Y., Ma, H.-L., Ramon, H. E., Napierata, L., Small, C., O'Toole, M., Young, D. A., Fouser, L. A., Nickerson-Nutter, C., Collins, M., Dunussi-Joannopoulos, K., & Medley, Q. G. (2011). Inter-regulation of Th17 cytokines and the IL-36 cytokines in vitro and in vivo: Implications in psoriasis pathogenesis. *The Journal of Investigative Dermatology*, *131*(12), 2428–2437. <https://doi.org/10.1038/jid.2011.234>
- Cau, L., Williams, M. R., Butcher, A. M., Nakatsuji, T., Kavanaugh, J. S., Cheng, J. Y., Shafiq, F., Higbee, K., Hata, T. R., Horswill, A. R., & Gallo, R. L. (2021). Staphylococcus epidermidis protease EcpA can be a deleterious component of the skin microbiome in atopic dermatitis. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *147*(3), 955–966.e16. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2020.06.024>
- Chan, L. K. Y., Lau, T. S., Chung, K. Y., Tam, C., Cheung, T. H., Yim, S. F., Lee, J. H. S., Leung, R. W. T., Qin, J., Or, Y. Y. Y., Lo, K. W., & Kwong, J. (2021). Short-Form Thymic Stromal Lymphopoietin (sfTSLP) Is the Predominant Isoform Expressed by Gynaecologic Cancers and Promotes Tumour Growth. *Cancers*, *13*(5). <https://doi.org/10.3390/cancers13050980>
- Davis, C. P. (1996). Normal Flora. In S. Baron (Ed.), *Medical Microbiology* (4th ed.).
- Dong, H., Hu, Y [Yahui], Liu, L., Zou, M., Huang, C., Luo, L., Yu, C., Wan, X., Zhao, H [Haijin], Chen, J., Xie, Z., Le, Y., Zou, F., & Cai, S. (2016). Distinct roles of short and long thymic stromal lymphopoietin isoforms in house dust mite-induced asthmatic airway epithelial barrier disruption. *Scientific Reports*, *6*, 39559. <https://doi.org/10.1038/srep39559>
- Enk, A. H., & Katz, S. I. (1992). Early molecular events in the induction phase of contact sensitivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *89*(4), 1398–1402. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.4.1398>
- Findley, K., Oh, J., Yang, J., Conlan, S., Deming, C., Meyer, J. A., Schoenfeld, D., Nomicos, E., Park, M., Kong, H. H., & Segre, J. A. (2013). Topographic diversity of fungal and bacterial communities in human skin. *Nature*, *498*(7454), 367–370. <https://doi.org/10.1038/nature12171>
- Fornasa, G., Tsilingiri, K., Caprioli, F., Botti, F., Mapelli, M., Meller, S., Kislak, A., Homey, B [Bernhard], Di Sabatino, A., Sonzogni, A., Viale, G., Diaferia, G., Gori, A., Longhi, R., Penna, G., & Rescigno, M. (2015). Dichotomy of short and long thymic stromal lymphopoietin isoforms in inflammatory disorders of the bowel and skin. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *136*(2), 413–422. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.04.011>
- Friend, S. L., Hosier, S., Nelson, A., Foxworthe, D., Williams, D. E., & Farr, A. (1994). A thymic stromal cell line supports in vitro development of surface IgM+ B cells and produces a novel growth factor affecting B and T lineage cells. *Experimental Hematology*, *22*(3), 321–328.
- Fuchs, E. (1990). Epidermal differentiation: The bare essentials. *The Journal of Cell Biology*, *111*(6 Pt 2), 2807–2814. <https://doi.org/10.1083/jcb.111.6.2807>
- Furue, M., Chiba, T., Tsuji, G., Ulzii, D., Kido-Nakahara, M., Nakahara, T., & Kadono, T. (2017). Atopic dermatitis: Immune deviation, barrier dysfunction, IgE autoreactivity and new therapies. *Allergology International : Official Journal of the Japanese Society of Allergology*, *66*(3), 398–403. <https://doi.org/10.1016/j.alit.2016.12.002>
- Gao, P.-S., Rafaels, N. M., Mu, D., Hand, T., Murray, T., Boguniewicz, M., Hata, T., Schneider, L., Hanifin, J. M., Gallo, R. L., Gao, L., Beaty, T. H., Beck, L. A., Leung, D. Y. M., & Barnes, K. C. (2010). Genetic variants in thymic stromal lymphopoietin are associated with atopic dermatitis and eczema herpeticum. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *125*(6), 1403–1407.e4. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.03.016>
- Greter, M., Lelios, I., Pelczar, P., Hoeffel, G., Price, J., Leboeuf, M., Kündig, T. M., Frei, K., Ginhoux, F., Merad, M., & Becher, B. (2012). Stroma-derived interleukin-34 controls the development and maintenance of langerhans cells and the maintenance of microglia. *Immunity*, *37*(6), 1050–1060. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.11.001>

- Grice, E. A., & Segre, J. A. (2011). The skin microbiome. *Nature Reviews. Microbiology*, 9(4), 244–253. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2537>
- Han, H., Xu, W., Headley, M. B., Jessup, H. K., Lee, K. S., Omori, M., Comeau, M. R., Marshak-Rothstein, A., & Ziegler, S. F [S. F.] (2012). Thymic stromal lymphopoietin (TSLP)-mediated dermal inflammation aggravates experimental asthma. *Mucosal Immunology*, 5(3), 342–351. <https://doi.org/10.1038/mi.2012.14>
- Harada, M., Hirota, T., Jodo, A. I., Doi, S., Kameda, M., Fujita, K., Miyatake, A., Enomoto, T., Noguchi, E., Yoshihara, S., Ebisawa, M., Saito, H., Matsumoto, K., Nakamura, Y [Yusuke], Ziegler, S. F [Steven F.], & Tamari, M. (2009). Functional analysis of the thymic stromal lymphopoietin variants in human bronchial epithelial cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 40(3), 368–374. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2008-0041OC>
- Harada, M., Hirota, T., Jodo, A. I., Hitomi, Y., Sakashita, M., Tsunoda, T., Miyagawa, T., Doi, S., Kameda, M., Fujita, K., Miyatake, A., Enomoto, T., Noguchi, E., Masuko, H., Sakamoto, T., Hizawa, N., Suzuki, Y., Yoshihara, S., Adachi, M., . . . Tamari, M. (2011). Thymic stromal lymphopoietin gene promoter polymorphisms are associated with susceptibility to bronchial asthma. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 44(6), 787–793. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2009-0418OC>
- Ibrahim, H. M., El-Taieb, M. A., Hassan, M. H., Mohamed, A. A. E., Kotop, E. A., Abd-Ellah, O. H., & Hegazy, E. M. (2020). Relations between vitamin D3, total and specific IgE for house dust mites in atopic dermatitis patients. *Scientific Reports*, 10(1), 21000. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77968-1>
- Jinnestål, C. L., Belfrage, E., Bäck, O., Schmidtchen, A., & Sonesson, A. (2014). Skin barrier impairment correlates with cutaneous *Staphylococcus aureus* colonization and sensitization to skin-associated microbial antigens in adult patients with atopic dermatitis. *International Journal of Dermatology*, 53(1), 27–33. <https://doi.org/10.1111/ijd.12198>
- Kang, S.-S., Kim, S. K., Baik, J. E., Ko, E. B., Ahn, K. B., Yun, C.-H., & Han, S. H. (2018). Staphylococcal LTA antagonizes the B cell-mitogenic potential of LPS. *Scientific Reports*, 8(1), 1496. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19653-y>
- Karin, M [Michael], Yamamoto, Y., & Wang, Q. M. (2004). The IKK NF-kappa B system: A treasure trove for drug development. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 3(1), 17–26. <https://doi.org/10.1038/nrd1279>
- Katoh, N [Norito], Ohya, Y., Ikeda, M., Ebihara, T., Katayama, I., Saeki, H., Shimojo, N., Tanaka, A., Nakahara, T., Nagao, M., Hide, M., Fujita, Y., Fujisawa, T., Futamura, M., Masuda, K [Koji], Murota, H., & Yamamoto-Hanada, K. (2019). Clinical practice guidelines for the management of atopic dermatitis 2018. *The Journal of Dermatology*, 46(12), 1053–1101. <https://doi.org/10.1111/1346-8138.15090>
- Kearney, J. N., Harnby, D., Gowland, G., & Holland, K. T. (1984). The follicular distribution and abundance of resident bacteria on human skin. *Journal of General Microbiology*, 130(4), 797–801. <https://doi.org/10.1099/00221287-130-4-797>
- Kel, J. M., Girard-Madoux, M. J. H., Reizis, B., & Clausen, B. E. (2010). Tgf-beta is required to maintain the pool of immature Langerhans cells in the epidermis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 185(6), 3248–3255. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000981>
- Kim, B., Lee, Y., Kim, E., Kwak, A., Ryoo, S., Bae, S. H., Azam, T., Kim, S., & Dinarello, C. A. (2013). The Interleukin-1 α Precursor is Biologically Active and is Likely a Key Alarmin in the IL-1 Family of Cytokines. *Frontiers in Immunology*, 4, 391. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00391>
- Kitajima, M., Lee, H.-C., Nakayama, T., & Ziegler, S. F [Steven F.] (2011). Tslp enhances the function of helper type 2 cells. *European Journal of Immunology*, 41(7), 1862–1871. <https://doi.org/10.1002/eji.201041195>
- Klonowska, J., Gleń, J., Nowicki, R. J., & Trzeciak, M. (2022). Combination of FLG mutations and SNP of TSLP (rs1898671) influence on atopic dermatitis occurrence. *Postepy Dermatologii I Alergologii*, 39(1), 152–158. <https://doi.org/10.5114/ada.2021.102820>
- Kloos, W. E., & Schleifer, K. H. (1975). Isolation and Characterization of Staphylococci from Human Skin II. Descriptions of Four New Species: *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus*

- hominis, and *Staphylococcus simulans*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 25(1), 62–79. <https://doi.org/10.1099/00207713-25-1-62>
- Kong, F., Paterson, D. L., Coory, M., & Clements, A. C. A. (2012). A multilevel model of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* acquisition within the hierarchy of an Australian tertiary hospital. *American Journal of Infection Control*, 40(9), 787–793. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2011.10.014>
- Kroeze, K. L., Boink, M. A., Sampat-Sardjoeppersad, S. C., Waaijman, T., Scheper, R. J., & Gibbs, S. (2012). Autocrine regulation of re-epithelialization after wounding by chemokine receptors CCR1, CCR10, CXCR1, CXCR2, and CXCR3. *The Journal of Investigative Dermatology*, 132(1), 216–225. <https://doi.org/10.1038/jid.2011.245>
- Lai, Y., Di Nardo, A., Nakatsuji, T., Leichtle, A., Yang, Y., Cogen, A. L., Wu, Z.-R., Hooper, L. V., Schmidt, R. R., Aulock, S. von, Radek, K. A., Huang, C.-M., Ryan, A. F., & Gallo, R. L. (2009). Commensal bacteria regulate Toll-like receptor 3-dependent inflammation after skin injury. *Nature Medicine*, 15(12), 1377–1382. <https://doi.org/10.1038/nm.2062>
- Larouche, J., Sheoran, S., Maruyama, K., & Martino, M. M. (2018). Immune Regulation of Skin Wound Healing: Mechanisms and Novel Therapeutic Targets. *Advances in Wound Care*, 7(7), 209–231. <https://doi.org/10.1089/wound.2017.0761>
- Laughter, M. R., Maymone, M. B. C., Mashayekhi, S., Arents, B. W. M., Karimkhani, C., Langan, S. M., Dellavalle, R. P., & Flohr, C. (2021). The global burden of atopic dermatitis: Lessons from the Global Burden of Disease Study 1990-2017. *The British Journal of Dermatology*, 184(2), 304–309. <https://doi.org/10.1111/bjd.19580>
- Lawrence, T. (2009). The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1(6), a001651. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001651>
- Lebre, M. C., van der Aar, A. M. G., van Baarsen, L., van Capel, T. M. M., Schuitemaker, J. H. N., Kapsenberg, M. L., & Jong, E. C. de (2007). Human keratinocytes express functional Toll-like receptor 3, 4, 5, and 9. *The Journal of Investigative Dermatology*, 127(2), 331–341. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700530>
- Lee, H.-C., & Ziegler, S. F [Steven F.] (2007). Inducible expression of the proallergic cytokine thymic stromal lymphopoietin in airway epithelial cells is controlled by NFkappaB. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(3), 914–919. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607305104>
- Lekstrom-Himes, J. A., & Gallin, J. I. Immunodeficiency Diseases Caused by Defects in Phagocytes.
- Li, J., Ireland, G. W., Farthing, P. M., & Thornhill, M. H. (1996). Epidermal and oral keratinocytes are induced to produce RANTES and IL-8 by cytokine stimulation. *The Journal of Investigative Dermatology*, 106(4), 661–666. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12345482>
- Li, Y., Lund, C., Nervik, I., Loevenich, S., Døllner, H., Anthonsen, M. W., & Johnsen, I. B. (2018). Characterization of signaling pathways regulating the expression of pro-inflammatory long form thymic stromal lymphopoietin upon human metapneumovirus infection. *Scientific Reports*, 8(1), 883. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19225-0>
- Lin, Z.-Q., Kondo, T., Ishida, Y., Takayasu, T., & Mukaida, N. (2003). Essential involvement of IL-6 in the skin wound-healing process as evidenced by delayed wound healing in IL-6-deficient mice. *Journal of Leukocyte Biology*, 73(6), 713–721. <https://doi.org/10.1189/jlb.0802397>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Loser, K., Mehling, A., Loeser, S., Apelt, J., Kuhn, A., Grabbe, S., Schwarz, T., Penninger, J. M., & Beissert, S. (2006). Epidermal RANKL controls regulatory T-cell numbers via activation of dendritic cells. *Nature Medicine*, 12(12), 1372–1379. <https://doi.org/10.1038/nm1518>
- Moltrasio, C., Romagnuolo, M., & Marzano, A. V. (2022). Epigenetic Mechanisms of Epidermal Differentiation. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(9). <https://doi.org/10.3390/ijms23094874>

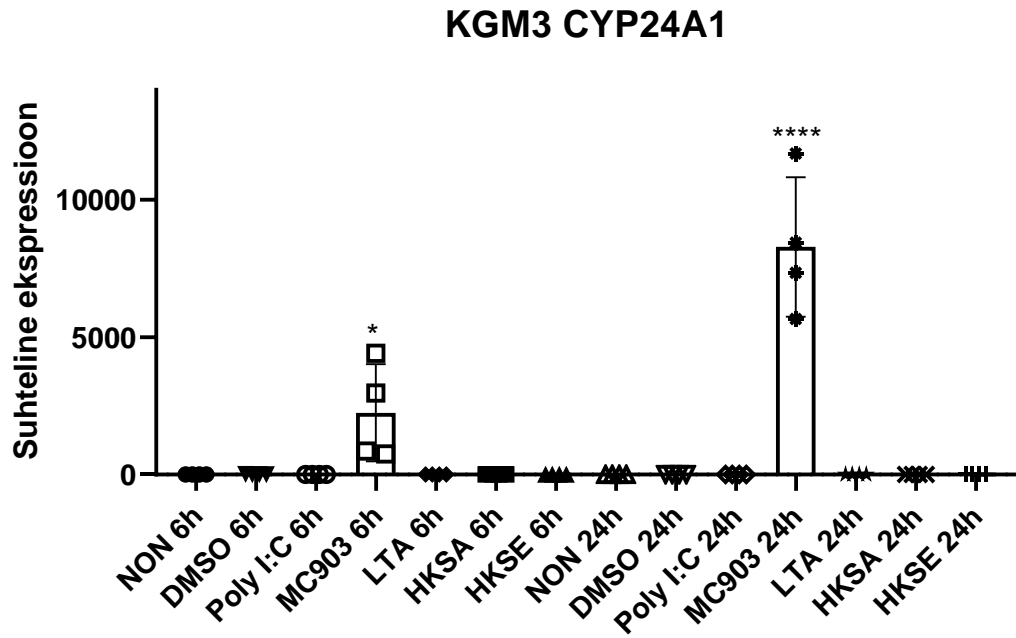
- Monaco, C., Andreakos, E., Kiriakidis, S., Mauri, C., Bicknell, C., Foxwell, B., Cheshire, N., Paleolog, E., & Feldmann, M. (2004). Canonical pathway of nuclear factor kappa B activation selectively regulates proinflammatory and prothrombotic responses in human atherosclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(15), 5634–5639. <https://doi.org/10.1073/pnas.0401060101>
- Monte, L. de, Reni, M., Tassi, E., Clavenna, D., Papa, I., Recalde, H., Braga, M., Di Carlo, V., Doglioni, C., & Protti, M. P. (2011). Intratumor T helper type 2 cell infiltrate correlates with cancer-associated fibroblast thymic stromal lymphopoietin production and reduced survival in pancreatic cancer. *The Journal of Experimental Medicine*, *208*(3), 469–478. <https://doi.org/10.1084/jem.20101876>
- Nakagawa, S., Matsumoto, M., Katayama, Y., Oguma, R., Wakabayashi, S., Nygaard, T., Saijo, S., Inohara, N., Otto, M., Matsue, H., Núñez, G., & Nakamura, Y [Yuumi] (2017). Staphylococcus aureus Virulent PSM α Peptides Induce Keratinocyte Alarmin Release to Orchestrate IL-17-Dependent Skin Inflammation. *Cell Host & Microbe*, *22*(5), 667–677.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.10.008>
- Nakamura, Y [Yuumi], Oscherwitz, J., Cease, K. B., Chan, S. M., Muñoz-Planillo, R., Hasegawa, M., Villaruz, A. E., Cheung, G. Y. C., McGavin, M. J., Travers, J. B., Otto, M., Inohara, N., & Núñez, G. (2013). Staphylococcus δ -toxin induces allergic skin disease by activating mast cells. *Nature*, *503*(7476), 397–401. <https://doi.org/10.1038/nature12655>
- Nguyen, A. H., Tahseen, A. I., Vaudreuil, A. M., Caponetti, G. C., & Huerter, C. J. (2017). Clinical features and treatment of vulvar Merkel cell carcinoma: A systematic review. *Gynecologic Oncology Research and Practice*, *4*, 2. <https://doi.org/10.1186/s40661-017-0037-x>
- Noble, W. C., Valkenburg, H. A., & Wolters, C. H. (1967). Carriage of Staphylococcus aureus in random samples of a normal population. *The Journal of Hygiene*, *65*(4), 567–573. <https://doi.org/10.1017/s002217240004609x>
- Novak, N. (2012). An update on the role of human dendritic cells in patients with atopic dermatitis. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *129*(4), 879–886. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.01.062>
- Pandey, A., Ozaki, K., Baumann, H., Levin, S. D., Puel, A., Farr, A. G., Ziegler, S. F [S. F.], Leonard, W. J [W. J.], & Lodish, H. F. (2000). Cloning of a receptor subunit required for signaling by thymic stromal lymphopoietin. *Nature Immunology*, *1*(1), 59–64. <https://doi.org/10.1038/76923>
- Park, L. S., Martin, U., Garka, K., Gliniak, B., Di Santo, J. P., Muller, W., Largaespada, D. A., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Farr, A. G., Ziegler, S. F [S. F.], Morrissey, P. J., Paxton, R., & Sims, J. E. (2000). Cloning of the murine thymic stromal lymphopoietin (TSLP) receptor: Formation of a functional heteromeric complex requires interleukin 7 receptor. *The Journal of Experimental Medicine*, *192*(5), 659–670. <https://doi.org/10.1084/jem.192.5.659>
- Pastar, I., Stojadinovic, O., Yin, N. C., Ramirez, H., Nusbaum, A. G., Sawaya, A., Patel, S. B., Khalid, L., Isseroff, R. R., & Tomic-Canic, M. (2014). Epithelialization in Wound Healing: A Comprehensive Review. *Advances in Wound Care*, *3*(7), 445–464. <https://doi.org/10.1089/wound.2013.0473>
- Pietrocola, G., Arciola, C. R., Rindi, S., Di Poto, A., Missineo, A., Montanaro, L., & Speziale, P. (2011). Toll-like receptors (TLRs) in innate immune defense against Staphylococcus aureus. *The International Journal of Artificial Organs*, *34*(9), 799–810. <https://doi.org/10.5301/ijao.5000030>
- Piipponen, M., Li, D., & Landén, N. X. (2020). The Immune Functions of Keratinocytes in Skin Wound Healing. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(22).
- Queck, S. Y., Jameson-Lee, M., Villaruz, A. E., Bach, T.-H. L., Khan, B. A., Sturdevant, D. E., Ricklefs, S. M., Li, M., & Otto, M. (2008). Rnaiiii-independent target gene control by the agr quorum-sensing system: Insight into the evolution of virulence regulation in Staphylococcus aureus. *Molecular Cell*, *32*(1), 150–158. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.08.005>
- Reardon, C., Lechmann, M., Brüstle, A., Gareau, M. G., Shuman, N., Philpott, D., Ziegler, S. F [Steven F.], & Mak, T. W. (2011). Thymic stromal lymphopoietin-induced expression of the endogenous inhibitory

- enzyme SLPI mediates recovery from colonic inflammation. *Immunity*, 35(2), 223–235.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.05.015>
- Rimoldi, M., Chieppa, M., Salucci, V., Avogadri, F., Sonzogni, A., Sampietro, G. M., Nespoli, A., Viale, G., Allavena, P., & Rescigno, M. (2005). Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells. *Nature Immunology*, 6(5), 507–514. <https://doi.org/10.1038/ni1192>
- Rochman, Y., Kashyap, M., Robinson, G. W., Sakamoto, K., Gomez-Rodriguez, J., Wagner, K.-U., & Leonard, W. J [Warren J.] (2010). Thymic stromal lymphopoietin-mediated STAT5 phosphorylation via kinases JAK1 and JAK2 reveals a key difference from IL-7-induced signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(45), 19455–19460.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1008271107>
- Sano, Y., Masuda, K [K.], Tamagawa-Mineoka, R [R.], Matsunaka, H., Murakami, Y., Yamashita, R., Morita, E., & Katoh, N [N.] (2013). Thymic stromal lymphopoietin expression is increased in the horny layer of patients with atopic dermatitis. *Clinical and Experimental Immunology*, 171(3), 330–337.
<https://doi.org/10.1111/cei.12021>
- Sanz-Gómez, N., Freije, A., & Gandarillas, A. (2020). Keratinocyte Differentiation by Flow Cytometry. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2109, 83–92. https://doi.org/10.1007/7651_2019_237
- Senftleben, U., Cao, Y., Xiao, G., Greten, F. R., Krähn, G., Bonizzi, G., Chen, Y., Hu, Y [Y.], Fong, A., Sun, S. C., & Karin, M [M.] (2001). Activation by IKK α of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. *Science (New York, N.Y.)*, 293(5534), 1495–1499.
<https://doi.org/10.1126/science.1062677>
- Shopsin, B., Drlica-Wagner, A., Mathema, B., Adhikari, R. P., Kreiswirth, B. N., & Novick, R. P. (2008). Prevalence of agr dysfunction among colonizing *Staphylococcus aureus* strains. *The Journal of Infectious Diseases*, 198(8), 1171–1174. <https://doi.org/10.1086/592051>
- Silverberg, J. I., Gelfand, J. M., Margolis, D. J., Boguniewicz, M., Fonacier, L., Grayson, M. H., Simpson, E. L., Ong, P. Y., & Chiesa Fuxench, Z. C. (2018). Association of atopic dermatitis with allergic, autoimmune, and cardiovascular comorbidities in US adults. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology : Official Publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*, 121(5), 604-612.e3.
<https://doi.org/10.1016/j.anai.2018.07.042>
- Soumelis, V., Reche, P. A., Kanzler, H., Yuan, W., Edward, G., Homey, B [Bernhart], Gilliet, M., Ho, S., Antonenko, S., Lauerma, A., Smith, K., Gorman, D., Zurawski, S., Abrams, J., Menon, S., McClanahan, T., Waal-Malefyt Rd, R. de, Bazan, F., Kastelein, R. A., & Liu, Y.-J. (2002). Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nature Immunology*, 3(7), 673–680.
<https://doi.org/10.1038/ni805>
- Zandi, E., Rothwarf, D. M., Delhase, M., Hayakawa, M., & Karin, M [M.] (1997). The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKK α and IKK β , necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation. *Cell*, 91(2), 243–252. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80406-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80406-7)
- Zeller, S., Rhyner, C., Meyer, N., Schmid-Grendelmeier, P., Akdis, C. A., & Cramer, R. (2009). Exploring the repertoire of IgE-binding self-antigens associated with atopic eczema. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 124(2), 278-85, 285.e1-7. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.05.015>
- Ziegler, S. F [Steven F.], & Artis, D. (2010). Sensing the outside world: Tslp regulates barrier immunity. *Nature Immunology*, 11(4), 289–293. <https://doi.org/10.1038/ni.1852>
- Takahashi, N., Sugaya, M., Suga, H., Oka, T., Kawaguchi, M., Miyagaki, T., Fujita, H., & Sato, S. (2016). Thymic Stromal Chemokine TSLP Acts through Th2 Cytokine Production to Induce Cutaneous T-cell Lymphoma. *Cancer Research*, 76(21), 6241–6252. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-0992>
- Tamagawa-Mineoka, R [Risa], & Katoh, N [Norito] (2020). Atopic Dermatitis: Identification and Management of Complicating Factors. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(8).
<https://doi.org/10.3390/ijms21082671>

- Tatsuno, K., Fujiyama, T., Yamaguchi, H., Waki, M., & Tokura, Y. (2015). Tslp Directly Interacts with Skin-Homing Th2 Cells Highly Expressing its Receptor to Enhance IL-4 Production in Atopic Dermatitis. *The Journal of Investigative Dermatology*, *135*(12), 3017–3024. <https://doi.org/10.1038/jid.2015.318>
- Torres, T., Ferreira, E. O., Gonçalo, M., Mendes-Bastos, P., Selores, M., & Filipe, P. (2019). Update on Atopic Dermatitis. *Acta Medica Portuguesa*, *32*(9), 606–613. <https://doi.org/10.20344/amp.11963>
- Traidl, S., Roesner, L., Zeitvogel, J., & Werfel, T. (2021). Eczema herpeticum in atopic dermatitis. *Allergy*, *76*(10), 3017–3027. <https://doi.org/10.1111/all.14853>
- Tsilingiri, K., Fornasa, G., & Rescigno, M. (2017). Thymic Stromal Lymphopoietin: To Cut a Long Story Short. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, *3*(2), 174–182. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2017.01.005>
- Wang, Y., Cao, Z., Zhao, H [He], & Gu, Z. (2022). Nonylphenol exacerbates ovalbumin-induced allergic rhinitis via the TSLP-TSLPR/IL-7R pathway and JAK1/2-STAT3 signaling in a mouse model. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *243*, 114005. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.114005>
- Varricchi, G., Pecoraro, A., Marone, G [Giancarlo], Criscuolo, G., Spadaro, G., Genovese, A., & Marone, G [Gianni] (2018). Thymic Stromal Lymphopoietin Isoforms, Inflammatory Disorders, and Cancer. *Frontiers in Immunology*, *9*, 1595. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01595>
- Weidinger, S., Illig, T., Baurecht, H., Irvine, A. D., Rodriguez, E., Diaz-Lacava, A., Klopp, N., Wagenpfeil, S., Zhao, Y., Liao, H., Lee, S. P., Palmer, C. N. A., Jenneck, C., Maintz, L., Hagemann, T., Behrendt, H., Ring, J., Nothen, M. M., McLean, W. H. I., & Novak, N. (2006). Loss-of-function variations within the filaggrin gene predispose for atopic dermatitis with allergic sensitizations. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *118*(1), 214–219. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2006.05.004>
- Weidinger, S., & Novak, N. (2016). Atopic dermatitis. *Lancet (London, England)*, *387*(10023), 1109–1122. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00149-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00149-X)
- Wickett, R. R., & Visscher, M. O. (2006). Structure and function of the epidermal barrier. *American Journal of Infection Control*, *34*(10), S98-S110. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2006.05.295>
- Vu, A. T., Baba, T., Chen, X., Le, T. A., Kinoshita, H., Xie, Y., Kamijo, S., Hiramatsu, K., Ikeda, S., Ogawa, H., Okumura, K., & Takai, T. (2010). Staphylococcus aureus membrane and diacylated lipopeptide induce thymic stromal lymphopoietin in keratinocytes through the Toll-like receptor 2-Toll-like receptor 6 pathway. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *126*(5), 985-93, 993.e1-3. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.09.002>
- Yousef, H., Alhadj, M., & Sharma, S. (2024). Anatomy, Skin (Integument), Epidermis. In *StatPearls*.

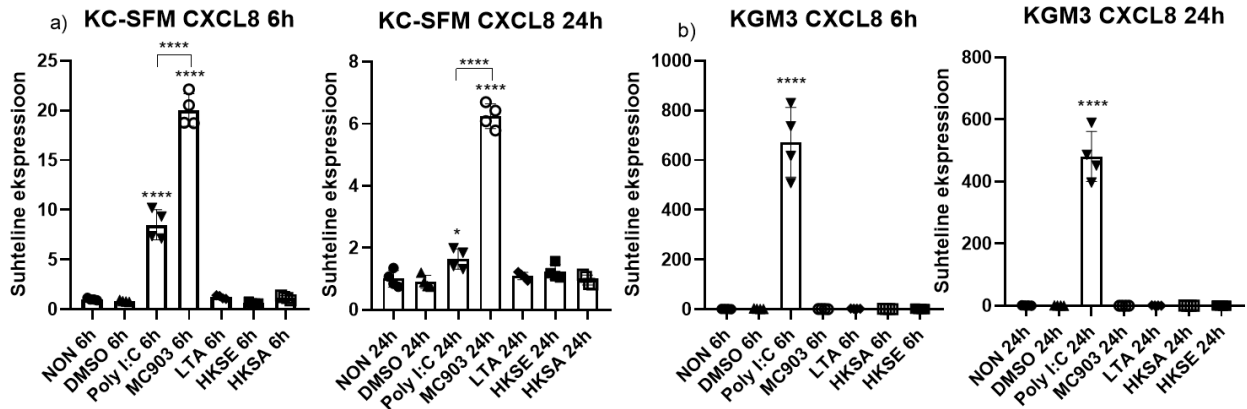
LISAD

Lisa 1

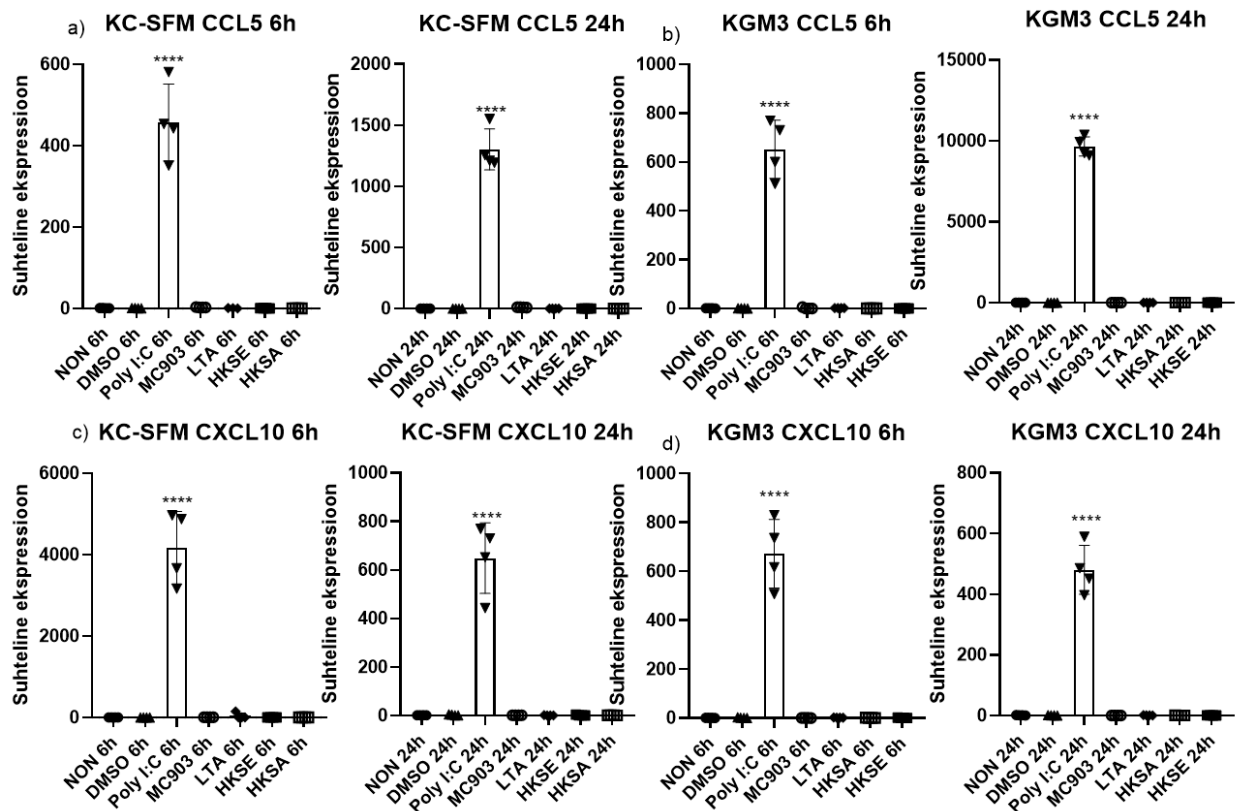


Joonis 1. CYP24A1 ekspressioon inimese primaarsetes keratinotsüütides pärast nende 6h ja 24h HKSE, HKSA ja *S. aureuse* LTA töötlemist KGM3 söötmesüsteemis. Inimese primaarseid keratinotsüüte stimuleeriti 6h ja 24h kuuntöödeldud materjalidega bakteritest *S. aureus* ja *S. epidermidis* ja *S. aureuse* LTAga. Negatiivseteks kontrollideks on töötlemata proov ja DMSOga töödeldud proov (MC903 lahusti). CYP24A1 ekspressiooni mõõdeti RT-qPCRi abil. Sellest saadud CT-väärtused normaliseeriti koduhoidjaga *EEF1A1* ja 6h ajapunkti töötlemata prooviga. Statistiline analüüs viidi läbi ühesuunalise ANOVA testiga ja omavahelisi korrigeeritud võrdlusi tehti Tukey testiga. N=4; ** P<0,01; **** P<0,0001

Lisa 2

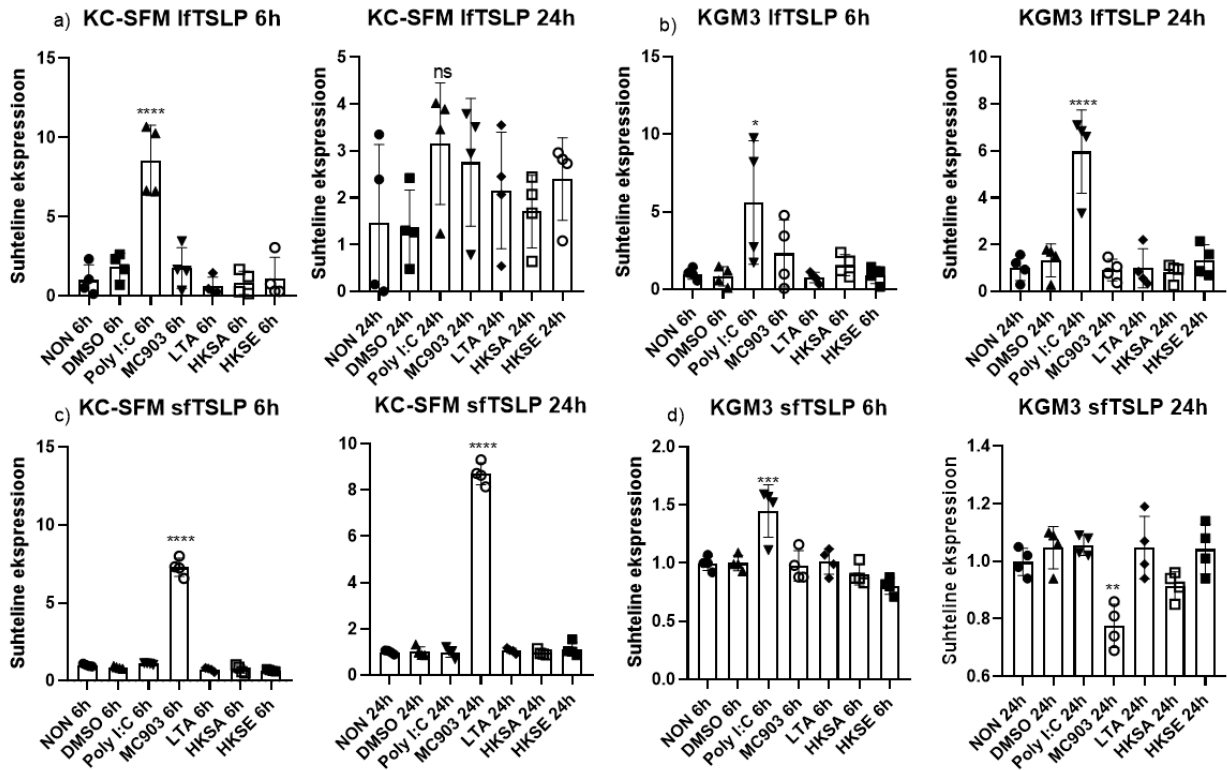


Joonis 1. CXCL8 ekspressioon inimese primaarsetes keratinotsüütides 6h või 24hpärast selle töötlemist HKSE, HKSA ja *S. aureuse* LTAga KC-SFM ja KGM3 söötmesüsteemis. Inimese primaarseid keratinotsüüte stimuleeriti 6h (a) ja 24h (b) kuumtöödeldud materjalidega bakteritest *S. aureus* ja *S. epidermidis* ja *S. aureuse* LTAga. Negatiivseteks kontrollideks on töötlemata proov ja DMSOga töödeldud proov. CXCL8 ekspressiooni mõõdeti RT-qPCRi abil. Sellest saadud CT-väärtused normaliseeriti koduhoidjaga EEF1A1 ja 6h ajapunkti töötlemata prooviga. Statistiline analüüs viidi läbi ühesuunalise ANOVA testiga ja omavahelisi võrdlusi tehti Tukey testiga. N=4; * P<0,05; **** P<0,0001



Joonis 2. CCL5 ja CXCL10 ekspressioon inimese primaarsetes keratinotsüütides 6h või 24h pärast selle töötlemist HKSE, HKSA ja *S. aureuse* LTAgaga KC-SFM ja KGM3 söötmesüsteemis. Inimese primaarseid keratinotsüüte stimuleeriti 6h (a) ja 24h (b) kuumtöödeldud materjalidega bakteritest *S. aureus* ja *S. epidermidis* ja *S. aureuse* LTAgaga. Negatiivseteks kontrollideks on töötlemata proov ja DMSOga töödeldud proov. CCL5 ja CXCL10 ekspressiooni mõõdeti RT-qPCRi abil. Sellest saadud CT-väärtused normaliseeriti koduhoidjaga EEF1A1 ja 6h ajapunkti töötlemata prooviga. Statistiline analüüs viidi läbi ühesuunalise ANOVA testiga ja omavahelisi võrdlusi tehti Tukey testiga. N=4; **** P<0,0001

Lisa 3



Joonis 1. lftTSLP (a, b) ja sftTSLP (c, d) ekspressioon inimese primaarsetes keratinotsüütides pärast nende 6h ja 24h HKSE, HKSA ja *S. aureuse* LTA töötlemist söötmesüsteemides KC-SFM (a, c) ja KGM3 (b, d). Inimese primaarseid keratinotsüüte stimuleeriti 6h ja 24h kuumtöödeldud materjalidega bakteritest *S. aureus* ja *S. epidermidis* ja *S. aureuse* LTAga. Negatiivseteks kontrollideks on töötlemata proov ja DMSOga töödeldud proov (MC903 lahusti). Positiivseteks kontrollideks lftTSLP ja sftTSLP indutseerimises olid vastavalt Poly I:C ja MC903ga töödeldud proovid. lftTSLP ja sftTSLP ekspressiooni mõõdeti RT-qPCRi abil. Sellest saadud CT-väärtused normaliseeriti koduhoidjaga EEF1A1 ja 6h ajapunkti ning 24h ajapunkti töötlemata prooviga eraldi. Statistiline analüüs viidi läbi ühesuunalise ANOVA testiga ja omavahelisi korrigeeritud võrdlusi tehti Tukey testiga. N=4; * P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001; **** P<0,0001

LIHTLITSENTS

Mina, Mart Ole Peters,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose
„*Staphylococcus aureus* TSLP ekspressiooni indutseerijana inimese primaarsete kerati-
notsüütide koekultuuris“,

mille juhendajad on Martin Pook ja Tõnis Org

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

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

Mart Ole Peters

26.05.2024