

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

TARTU ÜLIKOOL  
ARSTITEADUSKOND  
BIO- JA SIIRDEMEDITSIINI INSTITUUT

Siiri Sarv

**Immuunsüsteemiga seotud mikroRNAde ekspressioon  
vitiliigohaigete perifeerse vere mononukleaarsetes rakkudes**

Magistritöö biomeditsiini erialal

Juhendajad: PhD, Ene Reimann

PhD, Riho Teras

Tartu 2014

## Sisukord

Lühendid .....	3
Sissejuhatus .....	5
<b>1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....</b>	<b>6</b>
1.1. Immuunsüsteem .....	6
1.2. Perifeerse vere mononukleaarsed rakud (PBMC-d) .....	7
1.2.1. Lümfotsüüdid.....	7
1.2.2. Monotsüüdid, makrofaagid ja dendriittrakud.....	8
1.3. Immuunsüsteemi regulatsioon.....	10
1.4. Immuunsüsteemi regulatsioon miRNA-dega .....	11
1.5. Vitiliigo.....	16
1.5.1. Vitiliigo epidemioloogia.....	16
1.5.2. Patogenees .....	17
1.5.3. Vitiliigo ja miRNA-d .....	20
<b>2. EKSPERIMENTAALOSA .....</b>	<b>21</b>
2.1. Töö eesmärgid .....	21
2.2. Materjal ja meetodika .....	22
2.2.1. Töös uuritud indiviidid .....	22
2.2.2. qRT-PCR-ga analüüsitavad miRNA-d.....	23
2.2.3. Vereproovide kogumine, mononukleaarsete rakkude eraldamine koguverest ja totaalse RNA eraldamine .....	23
2.2.4. cDNA süntees .....	24
2.2.5. Kvantitatiivne reaalaaja PCR (qRT-PCR) .....	25
2.2.6. Ekspressioonitulemuste statistiline ja funktsionaalne analüüs .....	26
2.3. Tulemused.....	27
2.4. Arutelu .....	33
<b>KOKKUVÕTE .....</b>	<b>37</b>
<b>TÄNUAVALDUSED .....</b>	<b>40</b>
<b>LIHTLITSENTS.....</b>	<b>54</b>

## Lühendid

APC-d – antigeeni esitlevad rakud (*antigen presenting cells*)

BCR – B-raku retseptor (*B-cell receptor*)

CD – (*cluster of differentiation*)

DC – dendriittrakud – (*dendritic cells*)

Exp-5 – eksportiin-5 (*exportin-5*)

FDR – olulisusnivoo (*false discovery rate*)

GZMB – gransüüm B (*granzyme B*)

GWAS – genoomiulene assotsiatsiooniuuring (*Genome Wide Association Study*)

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – vesinikperoksiid

h3TA2 – (*human TIL-derived Tyrosinase TCR transgenic on HLA-A2*)

HLA-A – inimese koesobivuskompleks (*human leucocyte antigen*)

IFN- $\gamma$  – interferoon- $\gamma$

Ig – immuunglobuliin, antikeha (*immunoglobuline*)

IL – interleukiin

IL-2R – interleukiin-2 retseptor

miRNA – mikroRNA (*microRNA*)

NK rakud – loomulikud tappurakud (*natural killer cells*)

NKT-rakud – (*Natural killer T-cells*)

MIF – (*Macrophage migration inhibitory factor*)

PAMPs – (*pathogen associated molecular patterns*)

PBMCD – perifeerse vere mononukleaarsed rakud (*peripheral blood mononuclear cells*)

PTEN – (*Phosphatase and tensin homolog*)

qRT-PCR – kvantitatiivne reaalaaja polümeraasi ahelreaktsioon (*quantitative real time polymerase chain reaction*)

RISC – (*RNA-induced silencing complex*)

STAT – (*signal transducers and activator of transcription protein*)

T-reg – reguletoorsed T-rakud (*regulatory T-cells*)

Tc-rakud – tsütotoksilised T-lümfotsüüdid (*cytotoxic T-lymphocytes*)

Th-rakud – abistaja T-rakud (*helper T- cells*)

TCR - T-raku retseptor (*T-cell receptor*)

TNF- $\alpha$  – (*tumor necrosis factor- $\alpha$* )

TRP-1/2 – (*tyrosinase related protein 1 and 2*)

TYR – türosinaas (*tyrosinase*)

UV-kiirgus – ultraviolettkiirgus (*ultraviolet radiation*)

WT RNA-Seq – kogu transkriptoomi RNA sekveneerimine (*Whole transcriptome RNA-seq*)

WT – metsiktüüp (*wild type*)

## Sissejuhatus

Vitiliigo ehk laikipigmentatsioon on haigus, mille korral hävivad melanotsüüdid ja seetõttu tekivad kahjustatud nahapiirkondadesse valged, pigmentita laigud. Vitiliigo etioloogia on seni veel välja selgitamata. Haigus võib areneda sõltumata soost ja igas vanuses ning on üks enim psühholoogiliselt laostavaid nahahaiguseid. Vitiliigohaigetel esineb raskusi sotsiaalsetes suhetes, kuna kannatavad diskrimineerimise tõttu madala enesehinnangu, depressiooni all. Lisaks esineb vitiliigo sageli koos autoimmuunhaigustega, nagu Addisoni tõbi, hüpötüreoidism, süsteemne erütematoosluupus ja põletikuline soolehaigus. Kahjustunud nahapiirkondadest on leitud immuunrakke, mille kohalolek viitab põletikureaktsioonile. Kõik see viitab immuunsüsteemi rollile vitiliigo patogeneesis.

MikroRNA-d (miRNA-d) on väikesed mittekodeerivad RNA-d, mis reguleerivad geenivaigistamist transkriptsiooni tasemel, kontrollides rakkude apoptoosi, diferentseerumist või migratsiooni. Muutused miRNA-de ekspressioonis põhjustavad patoloogiaid, sealhulgas rakkude kontrollimatut kasvu, mille tagajärjeks on erinevate kasvujate teke (Lu jt, 2005; Makunin jt, 2007) või autoantigeenide äratundmist ja hävitamist, viimane viib autoimmuunhaiguse tekkega (Pauley jt, 2009). Kuna miRNA-d on hõlpsasti analüüsitavad, võiks neid tulevikus kasutada ka vitiliigo biomarkeritena.

MiRNA-de olulisust vitiliigo väljakujunemisel on väga vähe uuritud ning käesoleva töö eesmärgiks on leida lisainformatsiooni miRNA-dest, mis võiksid osaleda vitiliigo patogeneesis. Selleks analüüsisime miRNA-de ekspressioonimustrit vitiliigohaigete ja kontrollrühma vere mononukleaarsetes rakkudes.

Käesolev uuring viidi läbi Tartu Ülikooli arstiteaduskonna bio- ja siirdemeditsiini instituudi patofüsioloogia osakonna uurimisgrupis.

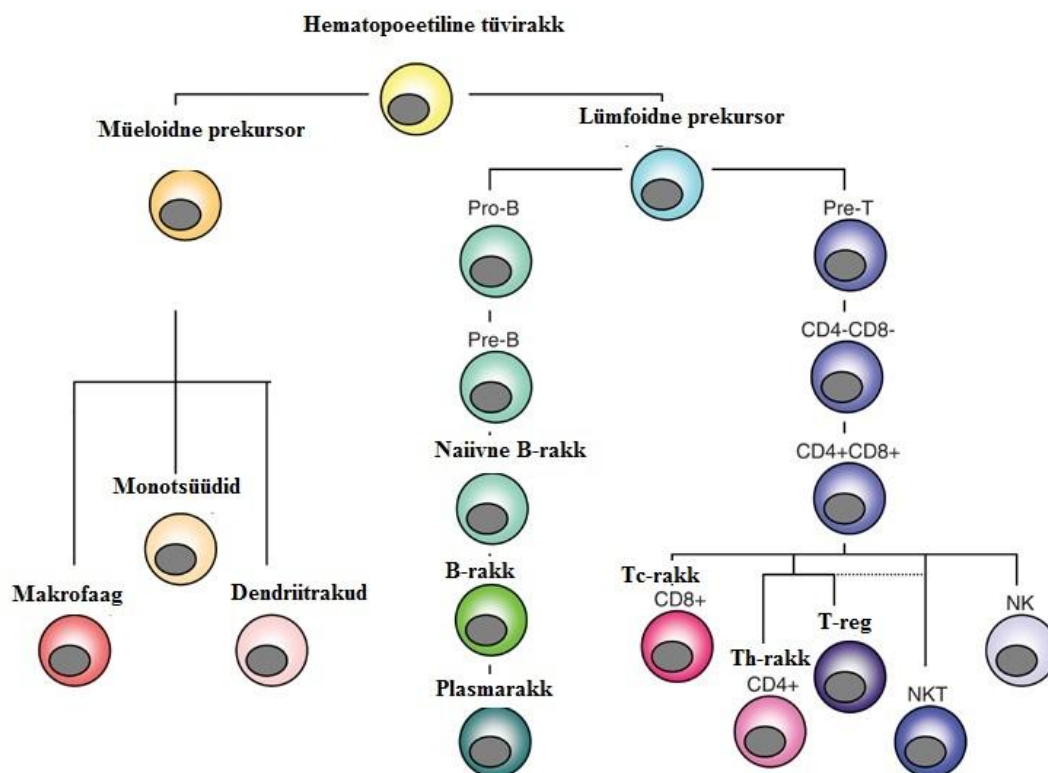
vitiliigo, mikroRNA, biomarker, immuunsüsteem, PBMCd

## 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

### 1.1. Immuunsüsteem

Immuunsüsteem jaguneb kaasasündinud ning omandatud immuunsuseks. Kaasasündinud immuunsus on esimene kaitse patogeenide vastu, mille peamisteks komponentideks on: (1) füüsilised ja keemilised tõkked, nagu epiteel ning selle poolt sekreteeritud antimikroobsed ühendid, (2) fagotsüteerivad, dendriit- ning loomulikud tapjarakud (ingl k *natural killer cells* – NK-rakud), (3) verevalgud, nagu komplemendisüsteem, ning (4) tsütokiinid ehk efektormolekulid, mis suunavad immuunsüsteemirakke põletiku korral. Omandatud immuunsus on teisene kaitse võõrmolekulide vastu ja koosneb kahes osast: esimene on B-rakkude ja nende sekreteeritud antikehadega loodud kaitse – humoraalne immuunsus –, teine T-rakkude alampopulatsioonide poolne kaitse – rakuline immuunsus (Abbas jt, 2012).

Vereloomine on protsess, kus iseuuev multipotentne hematopoeetiline tüvirakk ehk hematotsütoblast diferentseerub individuaalsetes radades, et luua erinevate vererakkude liinid. Eristatakse trombo-, erütro- ja leukopoeesi, vastavalt vereliistakute (trombotsüütide), punaste (erütrotsüütide) ja valgete vereliblede (leukotsüütide) arengut. Leukotsüüdid jagunevad granulotsüütideks ja agranulotsüütideks. Agranulotsüüdid ehk perifeerse vere mononukleaarsed rakud (ingl k *peripheral blood mononuclear cells* – PBMC-d) jagunevad monotsüütideks, makrofaagideks, dendriitrakkudeks (*dendritic cells* – DC) ja lümfotsüütideks (joonis 1, lk 7) (Abbas jt, 2012).



**Joonis 1.** Perifeerse vere mononukleaarsed rakud (PBMCd). Muudetud (Bottero jt., 2006)

## 1.2. Perifeerse vere mononukleaarsed rakud (PBMC-d)

### 1.2.1. Lümfootsüüdid

Lümfootsüüdid on immuunrakud, mis jagunevad kaheks suureks alamüksuseks: B- ja T-rakkudeks. B-rakud valmivad luuüdis, kuid diferentseeruvad põrnas (Hardy, 2006). T-rakud valmivad ning diferentseeruvad luuüdis naiivseteks rakkudeks (Boyman jt, 2009). Naiivsed lümfootsüüdid retsirkuleerivad lümfi- ja vereringluse vahel, kuni leiavad ja tuvastavad antigeeni. Selleks ekspresseerivad rakud spetsiifilisi retseptoreid, vastavalt T-raku retseptorid (ingl k *T-cell receptor* – TCR) ja B-raku retseptorid (ingl k *B-cell receptor* – BCR) (Hardy, 2006; Von Andrian ja Mackay, 2000). Antigeenid on näiteks valgud, nende kompleksid, pärilikkusaine jt. Need võivad olla endogeensed (raku ainevahetuse kõrvalproduktid) või autogeensed (kehaomane valk, mille immuunsüsteemi rakud tunnevad ära kui võõra). Kokkupuutel antigeeniga muutuvad lümfootsüüdid efektorrakkudeks, mille ülesandeks on immuunvastuse tekitamine ning sihtmärkraku eemaldamine (Jenkins jt, 2010). Antigeeni äratundmiseks on lisaks TCR-ile vaja ko-retseptorit. Th-rakkudel (ingl k *T-helper cells*) on selleks glükoproteiin CD4 (Germain, 1994) ja Tc-rakkudel (ingl k *cytotoxic T-cells*)

glükoproteiin CD8. Vähesel määral leidub ka mälu- ehk pikaealiste rakkudena eristuvaid lümfotsüüte, mis tagavad sama antigeeniga kokku puutudes tugevama immuunvastuse (Boyman jt, 2009; Wan ja Flavell, 2009; Murphy ja Reiner, 2002; Sallusto jt, 2004).

Antigeeni äratundmisel sekreteerivad Th-rakud tsütokiine ehk signaalmolekule, mis aktiveerivad või stimuleerivad teisi immuunrakke (Tc-rakke, B-rakke, makrofaage ja teisi leukotsüüte) (Ouyang jt, 2008). Samas indutseerivad Tc-rakud tsütotoksiliste graanulite (gransüüm B) ja efektorvalkude (perforiin) vahendusel sihtmärkraku apoptoosi (Catalfamo ja Henkart, 2003; Bossi ja Griffiths, 2005; Gadhamsetty jt, 2014). Infektsiooni lõppedes inhibeerivad regulatoorsed T-rakud (ingl k *regulatory T-cells* – T-regid) teiste T- ja B-rakkude vahendatud immuunvastuse. Kuna enam pole suure hulga efektorrakkude vajadust, takistavad T-rakud nende paljunemist ning suunavad apoptoosi (Jameson, 2002; Izcue jt, 2006).

B-rakud sekreteerivad antikehi, põhjustades antikeha poolt vahendatud sihtmärkraku apoptoosi, mikroobide fagotsüteerimist ja nende toksiinide neutraliseerimist (Goodnow jt, 2010). Iga mälu B-rakk sekreteerib ainult ühe kindla spetsiifikaga antikehi ehk immuunoglobuliine (ingl k *immunoglobuline* – Ig), milleks on enamasti IgG, IgE ja IgA (McHeyzer-Williams ja McHeyzer-Williams, 2005). Efektorrakkude antikehad on peamiselt IgM ja IgD (Goodnow jt, 2010; Abbas jt, 2012).

### **1.2.2. Monotsüüdid, makrofaagid ja dendriitrakud**

Monotsüüdid jagunevad vähemalt kaheks populatsiooniks: esimesed on kudedes resideeruvad makrofaagide ja DC-de eellasrakud ning teised tsirkuleerivad veres ja osalevad kiires põletikuvastases reaktsioonis (Auffray jt, 2009). Põletiku korral diferentseeruvad monotsüüdid makrofaagideks ning DC-deks, kuid kudede uuenemisel üksnes makrofaagideks (Serbina jt, 2008).

Makrofaagid on lümfoidses ja mittelümfoidses koes asuvad antigeeni esitlevad rakud (ingl k *antigen presenting cells* - APC-d) (Gordon jt, 2002; Geissmann jt, 2010). Nad hävitavad võõraid või apoptootilisi rakke (surnud rakud, neutrofiilid) ning sekreteerivad teiste immuunrakkude suunamiseks tsütokiine (kemotaksis) (Auffray jt, 2009; Geissmann jt, 2010; Abbas jt, 2012).

DC-d esinevad nii lümfoidses kudedes, limaskestas epiteelis kui ka organite parenhüümis, nende iseloomulikuks tunnuseks on pikad membraanijätked (Geissman jt, 2010). Sarnaselt

makrofaagidele hävitavad DC-d võõraid rakke ning esitlevad neid lümfotsüütidele (Mellman ja Steinman, 2001; Liu, 2010).

### 1.3. Immuunsüsteemi regulatsioon

Fagotsüteerivad rakud (õgirakud) omavad spetsiifilisi pinnaretseptoreid (ingl k *pattern recognition receptors* – PRR), mis tunnevad ära kahjustunud või surnud rakkude eritatud DAMP-d (ingl k *damage-associated molecular patterns*) (Jeannin jt, 2008) ja PAMP-d (ingl k *pathogen associated molecular patterns*) (Janeway jt, 2002; Akira jt, 2006). DAMP-deks on rakust sekreteeritud valgud, mis vabanevad rakukahjustuse käigus või mida transporditakse eksosoomide abil (Jeannin jt, 2008). Eksosoomid on väikesed mikrovesiikulid, mis vahendavad rakkudevahelist signalisatsiooni (Théry jt, 2002; Bang jt, 2012). Fagotsüteerivad rakud eemaldavad kahjustunud ja surnud rakud ning soodustavad kahjustunud koe paranemist (Jeannin jt, 2008). PAMP-ide äratundmisel reageerivad õgirakud kahel viisil. Esimesel juhul tekitavad nad vastavas piirkonnas põletiku, kuna sekreteerivad põletikku soodustavaid tsütokiine. Teisel juhul esitlevad nad T-rakkudele patogeeni antigeeni ning aktiveerivad omandatud immuunsüsteemi (Takeuchi ja Akira, 2010).

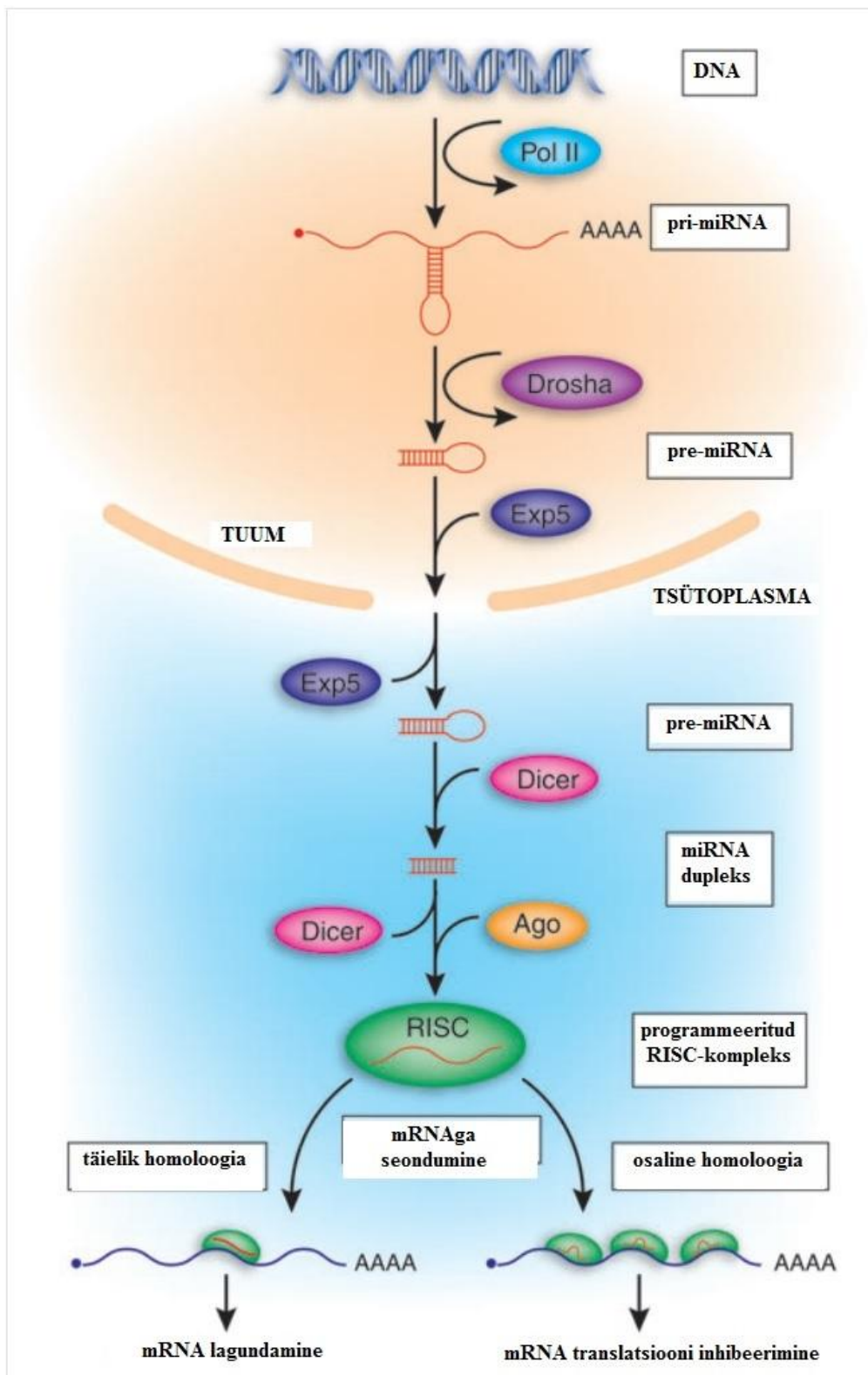
Tsütokiinid on erinevate immuunrakkude sekreteeritud efektormolekulid ning üks molekul võib põhjustada mitu muutust korraga. Nende ülesandeks on vahendada ja reguleerida kaasasündinud ning omandatud immuunsüsteemi. Näiteks suurendavad nad verevoolu kahjustatud või nakatunud koe läheduses, et vajalikud immuunrakud jõuaksid põletikukoldesse (Schluns ja Lefrançois, 2003).

Immuunsüsteemi regulatsioonis on olulisel kohal tolerantsuse teke autoantigeenide suhtes. Esmalt toimub negatiivne selektsioon tüümuses, kus eemaldatakse need lümfotsüüdid, mis reageerivad autoantigeenidele. Seejärel migreeruvad kontrolli läbinud lümfotsüüdid perifeersetesse lümfoidorganitesse, kus neil on uuesti valida, kas reageerida autoantigeenidele või mitte. Kui perifeerses lümfoidorganism toimub reagerimine, eemaldatakse need rakud enamasti T-regide poolt (Levitsky, 2011; Schwartz, 2012). Kui T-regide funktsioonis esineb häireid, satuvad autoreaktiivsed lümfotsüüdid vere- ja lümfiringesse, olles autoimmuunhaiguste põhjustajaks (Chi jt, 2008; Antiga jt, 2010; Bernard jt, 2010).

#### 1.4. Immuunsüsteemi regulatsioon miRNA-dega

MikroRNA-d (miRNA-d) on üheaheelalised, lühikesed (20–24 nt) mittekodeerivad RNA molekulid. MiRNA-d reguleerivad posttranskriptsiooniliselt valke kodeerivate geenide ekspressiooni hulkrakses organismis (Guo jt, 2010). Nad seonduvad mRNA 3' mittetransleeriva regiooniga, mille tagajärjel mRNA kas lagundatakse või peatatakse mRNA-lt valgu süntees (Bartel, 2004).

RNA polümeraas II (Pol II) transkribeerib rakutuumas miRNA-d (joonis 2, lk 11). Esmane transkript, primaarne miRNA (pri-miRNA), võib olla väga pikk, ulatudes kuni 100 kb-ni (Cai jt, 2004; Lee jt, 2004). Ribonukleas III (RNAas III) Drosha viib läbi pri-miRNA-de lõikamist ning juuksenõelastruktuuriga prekursor miRNA (pre-miRNA) suuruseks jääb umbes 70 aluspaari (Lee jt, 2003; Denli jt, 2004; Gregory jt, 2004; Han jt, 2004; Landthaler jt, 2004). Järgnevalt viib eksportiin-5 pre-miRNA tuumast välja tsütoplasmasse (Yi jt, 2003; Bohnsack jt, 2004; Lund jt, 2004; Zeng ja Cullen, 2004). RNAas III Dicer lõikab pre-miRNA umbes 22-aluspaariliseks kaheaheelaliseks miRNA:miRNA\* dupleksiks, millest miRNA\* on *antisense*-ahel (Ketting jt, 2001; Hutvagner jt, 2001; Chendrimada jt, 2005; Forstemann jt, 2005; Jiang jt, 2005; Saito jt, 2005). Argonautvalgud seovad miRNA RNA poolt indutseeritud geenivaigistamise kompleksi (ingl k RISC – *RNA-induced silencing complex*) ning tavaliselt miRNA\* lagundatakse (Khvorova jt, 2003; Schwarz jt, 2003) (joonis 2, lk 11).



**Joonis 2.** Pol II transkribeerib rakutuumas miRNA, tekib primaarne miRNA (pri-miRNA). Seejärel töötleb valk Drosha pri-miRNA-d, alles jääb juuksenõelastruktuuriga pre-miRNA, mis viiakse ekspordiin-5 (Exp-5) abil tuumast tsütoplasmasse. MiRNA kaksikahelast (dupleks) seotakse põhiahel Argonautvalkudega (AGO2) RISC-kompleksi, mis juhib erinevate mRNA-de vaigistamist (Cullen, 2006).

2014. aasta maiks on miRBase andmebaasist võimalik leida üle 2000 miRNA järjestuse, kusjuures esimene miRNA-d kirjeldati 1993 aastal (Lee jt, 1993; Wightman jt, 1993) ning järgmine kirjeldati 2000 aastal *C. elegans*-i arengu reguleerijana (Reinhart jt, 2000). Praeguseks on leitud teatud koe- või eludkonnaspetsiifilisi, nagu näiteks vereloome või immuunsüsteemi, spetsiifilised miRNA-d (Monticelli jt, 2005; Ramkissoon jt, 2006; Neilson jt, 2007) Võivad osaleda erinevates bioloogilistes protsessides, näiteks apoptoosis (Xu jt, 2004), kudede diferentseerumisel (Chen jt, 2004), rakutsükli (proliferatsioonis) (Cheng jt, 2005) ja immuunfunktsioonides (Griffiths-Jones, 2004; Griffiths-Jones, 2006). Nende roll autoimmuunsuses on veel täpselt välja selgitamata, kuid järjest enam selgub, kuidas miRNA-d reguleerivad geenivaigistamist ning on seotud immuunvastuse tekkimisega (Pauley jt, 2009). (Lee jt, 1993; Reinhart jt, 2000; Wightman jt, 1993)

MiRNA-de osatähtsuse uurimiseks immuunrakkudes on hiire rakuliinides (pärit nii lümfotsütidest kui ka tüümusest) välja lülitatud miRNA-de biogeneesis osalev valk Dicer või Drosha (Zhou jt, 2011). Dicerita hiireline pole võimalik uurida, kuna need hiired pole eluvõimelised (Bernstein jt, 2003). On tõestatud, et Diceri puudumisel rakkudest jääb seisma B-rakkude areng (Koralov jt, 2008). B-rakkude uurimisel leiti miR-17-92 klaster, millesse kuuluvad perekonnad miR-17, miR-18, miR-19 ja miR-92. Defektse miR-17-92 geeniga hiirte uurimisel esines sama efekt, mis rakkudes, kus puudub Dicer – tekkisid B-rakkude arenguhäired (Ventura jt, 2008). MiR-17-92 vaigistab pro-apoptoosilisi faktoreid, näiteks BIM, millega soodustab B-rakkude proliferatsiooni (Xiao jt, 2008; Ventura jt, 2008; Mu jt, 2009). Seda toetab ka uuring, kus miR-17-92 üleekspressioon rakus viis B-lümfotsütaarse lümfoomi tekkeni (He jt, 2005). MiR-17 ja miR-19b on peamised Th-rakkude bioloogiliste protsesside koordinaatorid, kuna need soodustavad proliferatsiooni ja IFN- $\gamma$  sekreteerimist ning takistavad rakkude apoptoosi (Jiang jt, 2011). Varem on näidatud, et klasteri miR-17-92 üleekspressioonil on suurenenud autoreaktiivsete Th-rakkude arv, mis viitab perifeerse tolerantsuse defektile (Xiao jt, 2008). Lisaks miR-17-92 klasteri miRNA-de ekspressiooni blokeerimisel T-reg-ides, väheneb nende T-reg-ide hulk, mis sekreteerivad põletikku vähendavat interleukiin-10 (IL-10) (de Kouchkovsky jt, 2013).

MiR-19 perekonda kuuluvad kolm liiget: miR-19a, miR-19b1 ja miR-19b2. Varasemalt on leitud, et klasteri miR-17-92 eemaldamisel on vähenenud antiapoptoosilise transkriptsioonifaktori cMYC indutseeritud onkogenees. Kui miR-19 perekond aktiveeriti, taastus ka onkogeensus (Mu jt, 2009; Olive jt, 2009). PI3K signaalsüsteem ja selle allavoolu regulaatorid on peamisteks miRNA-de sihtmärkideks, kuna need kontrollivad T-

rakkude arengut ja aktivatsiooni. Seda rada reguleerivad teiste seas ka miR-17, miR-19, miR-181 ja miR-21 (Hena-Meija jt, 2013; Xiao jt, 2008).

MiR181 perekond koosneb kuuest paraloogsest miRNA-st, mis asuvad genoomis kolmes eri kohas (Ji jt, 2009). MiR-181a on luuüdis B-rakkude varase arengu positiivne regulaator, tema üleekspressioonil *in vitro* katses suurenes B-rakkude arv kahekordselt (Chen jt, 2004; Shivdasani jt, 2006; Kuchen jt, 2010). MiR-181a puudusel jääb seisma B-rakkude varane areng (Hena-Meija jt, 2013).

MiR-181a osaleb T-rakkude alapopulatsiooni NKT-rakkude (ingl k *Natural killer T-cells*) varases arengus tuumuses, kontrollides PI3K signaali rada, mille inhibeerimisel viiakse rakud apoptoosi. Üheks miR-181a märklaudgeeniks PI3K rajal on *PTEN* (fosfataasi ja tensiini homoloog, PI3K raja negatiivne regulaator), mille ekspressioon oli miR-181a defektsetes hiirerakkudes 65% kõrgem kui metsik tüüpi (ingl k *WT –wild type*) rakkudes (Hena-Meija jt, 2013). See on arvatavasti põhjus, miks miR-181a-defektsete NKT-rakkude esinemise sagedus, hulk ja proliferatsioon olid võrreldes WT T-rakkudega tuumuses vähenenud. MiR-181a märklaudgeenideks on veel *BCL2* ja *TCR*, mis vastutavad T-rakkude positiivse selektsiooni eest (Chen jt, 2004; Neilson jt, 2007). MiR-181a inhibeerimisel tuumuse T-rakkudes leiti, et suureneb autoantigeene äratundvate T-rakkude hulk (Li jt, 2007; Ebert jt, 2009). Psoriaasahaigetel on miR-181a ekspressioon maha reguleeritud. Arvatakse, et see võib olla tingitud immuunrakkude migreerumisest põletikukoldesse (Sonolky jt, 2008, Pivarcsi jt, 2013).

Vastupidiselt miR-181a-le, suureneb miR-150 ekspressioon B- ja T-rakkude hilises arengus (Monticelli jt, 2005). MiR-150 üleekspressioon hematopoeetilistes tüvirakkudes viis täiskasvanud B-rakkude hulga vähenemisele nii põrnas, lümfisõlmedes kui ka vereringes, samas ei mõjutanud see T-rakkude ega müeloidsete rakkude arengut. Selgus, et miR-150 inhibeerib varajast pro-B-rakkude arenemist pre-B-rakkudeks (Zhou jt, 2007). Xiao jt (2007) näitasid hiirkatsetes, et lümfopoesis oluline transkriptsiooni-aktivaator MYB on miR-150 sihtmärkgeeniks. B-rakkude aktiveerimisel IgM antikehade, CpG-d sisaldava DNA või lipopolüsahhariididega väheneb miR-150 ekspressioon kiirelt. Lisaks suurenes miR-150 deletsioonil hiirtes antikehade sekretsioon (Xiao jt, 2007). NK-rakud sekreteerivad põletikuolukorras perforiin-1 ning miR-150 on vastava valgu post-transkriptsiooniline regulaator. Seetõttu toodetakse miR-150 puudusel tsütotoksilist perforiin-1-te (Kim jt, 2014).

Diceri puudumisel T-reg-ides on häiritud nii rakkude areng, funktsioon kui ka homöostaasi säilitamine, mis viib spontaansete põletike ja autoimmuunsuse tekkeni (Chong jt, 2008;

Liston jt, 2008; Zhou jt, 2008; Zhao jt, 2011). MiR-146a on oluline T-reg-ide arengul ning õige funktsiooni säilitamisel, kuna miR-146a puudusel suureneb põletikku soodustava tsütokiini IFN- $\gamma$  ning T-reg-ide poolt kontrollitud Th-rakkude hulk (Lu jt, 2010; Yang jt, 2012; Huffaker jt, 2012, Rusca jt, 2012). Lisaks mõjutavad endotoksiinid miR-146a. Katses näidati, kuidas monotsüütide töötlemisel endotoksiini lipopolüsahhariidiga (mimikeeriti bakteriaalset infektsiooni) suurenes miR-146a hulk märgatavalt (Taganov jt, 2006). Lisaks on miR-146a Th-rakkudes IL-2 sekretsiooni negatiivne regulaator (Curtale jt, 2010).

MiR-29a-d ekspresseeritakse pigem naiivsetes Th- ja Tc-rakkudes kui efektor-T-rakkudes (Wu jt, 2007, Landgraf jt, 2007). MiR-29 sihtmärgiks on IFN- $\gamma$  – efektorrakud, kus miR-29 ekspressioon on maha surutud, sekreteerivad rohkem IFN- $\gamma$  kui naiivsed T-rakud. Veel on teada, et miR-29 ekspressioon on patogeeni infektsiooni korral alla reguleeritud ning T-rakud sekreteerivad immuunsüsteemi aktiveerimiseks efektormolekuli IFN- $\gamma$  (Ma jt, 2011). MiR-29a ekspressioon on sklerodermia patsientide vereseerumis maha reguleeritud. Arvatakse, see on tingitud kahjustunud koe parandamise tõttu suurenenud kollageeni tootmisest, kuna miR-29a kontrollib kollageeni tootmist post-transkriptsiooniliselt (Maurer jt, 2010; Li jt, 2012; Li jt, 2013).

MiR-223 on oluline granulotsüütide funktsiooni juhtimisel. Katsed hiirtega näitavad, et *mir-223* geeni väljalülitamisel suureneb nende granulotsüütide hulk, millel esinesid morfoloogilised häired ning mis aktiveerusid kergemini kui peaksid. Arvatavasti on see seotud tema märklaudgeeniga *MEF2C*, mis reguleerib müeloidse eellasraku diferentseerumist (Johnnidis jt, 2008). Lisaks on leitud, et miR-223 soodustab monotsüütide diferentseerumist makrofaagideks (Fazi jt, 2005) ning mälu B-rakkude proliferatsiooni (Malumbres jt, 2009). Oluline roll on sellel ka akuutses müeloidses leukeemias, kus miR-223 ekspressioon on alla reguleeritud. Granulotsüütide diferentseerumine taastus alles siis, kui taastati miR-223 ekspressioon (Fazi jt, 2005).

## 1.5. Vitiliigo

### 1.5.1. Vitiliigo epidemioloogia

Vitiliigo ehk naha laikpigmentatsioon on haigus, mille korral pigmentirakkude ehk melanotsüütide osalisel või täielikul kadumisel esinevad nahal ja/või limaskestadel depigmenteerunud laigud (Gauthier, 2003).

Vitiliigot võib esineda erinevates populatsioonides, olenemata geograafilisest asukohast või etnilisest grupist, ning selle esinemissagedus varieerub 0,5–2% vahel (Alikhan jt, 2011). Haigusjuhte esineb võrdselt nii meestel kui ka naistel ning pooltel juhtudel avaldub see enne 18. eluaastat (Alikhan jt, 2011; Taieb jt, 2013). Haiguse klassifitseerimisel jaguneb vitiliigo kolmeks grupiks: vitiliigo (ingl k *generalized vitiligo*), segmenteerunud vitiliigo (SV – *segmental vitiligo*), määratlemata (ingl k *unclassified, undetermined*) vitiliigo. Vitiliigo jaotatakse alagruppideks vastavalt depigmenteerunud laikude asukohale kehal (Ezzedine jt, 2012).

Valgeid laike esineb sagedamini näopiirkonnas, kätel, kaenlaalustes ja nabapiirkonnas (Huggins jt, 2005). Lisaks nahale võivad ka vastavate piirkondade karvad olla pigmentita (Taieb ja Picardo, 2009; Picardo ja Taieb, 2010). Kuna nahapigment kaitseb indiviide mitmete kahjulike keskkonnamõjude eest, suurendab pigmendi puudumine naha enneaegse vananemise ning vähi tekke riski (Gilchrest jt, 1979; Boissy ja Manga, 2004). Lisaks põhjustab see nii psühholoogilisi kui ka sotsiaalseid probleeme, mis mõjutavad enesehinnangu kujunemist ning suhteid kaasinimestega (Porter jt, 1990; Kostopoulou jt, 2009). Oluliseks faktoriks on ka see, et haigus esineb varases eas, kus pannakse erilist rõhku välimusele ja patsiendid tunnevad piinlikkust ning häbi oma väljanägemise pärast, mistõttu on vitiliigot seostatud madala enesehinnangu, diskrimineerimise, sotsiaalse mittelävimise ning depressiooniga (Kostopoulou jt, 2009; Mashayekhi jt, 2010; Wang jt, 2010).

Vitiliigol puudub otsene ravi, kuid on olemas erinevad meetmed naha repigmenteerumiseks, nagu kortikosteroidid, valgusteraapia puhastatud psoraleenidega ehk PUVA, samuti kirurgiline sekkumine, kus depigmenteerunud aladele transplanteeritakse terved melanotsüüdid, mis hakkavad taas pigmenti tootma ning taastavad nahatooni (Gawkrode jt, 2008; Taieb jt, 2013).

### 1.5.2. Patogenees

Naha hüpopigmentatsioon tähendab seda, et nahale tekkivad valged laigud on põhjustatud kas melanotsüütide või melaniini puudumisest. Vitiliigo korral on tegemist melanotsüütide hävimisega epidermisest, mistõttu ei toodeta ka pigmenti (Ortonne jt, 1993).

Täpselt pole teada, miks melanotsüüdid hävivad, kuid arvatakse, et see võib olla tingitud nii väliste keskkonnatingimuste, geneetiliste faktorite, immuunsüsteemi häirete kui ka melanotsüütide sisemiste faktorite koosmõjust (Kemp jt, 2001; Ongenae jt, 2003; Schallreuter jt, 2008; Alikhan jt, 2011; Oyarbide-Valencia jt, 2006). Kõige varasema ja enim pooldatud hüpoteesi järgi on vitiliigo autoimmuunhaigus. Patsientidel, kellel esineb mõni autoimmuunhaigus, näiteks diabeet, Addisoni tõbi, kilpnäärme üle- või alatalitus, luupus, reumatoidartriit või psoriaas, esineb sageli ka vitiliigo (Kemp jt, 2001; Alikhan jt, 2011; Selva-O'Callaghan jt, 2006; Coelho jt, 1996). Sageli on täheldatud haiguskolletes nii immuunrakkude kui ka kemokiinide hulga kasvu, mis viitab põletikureaktsioonile (Zhou jt, 2012; Ben Ahmed jt, 2012; Klarquist jt, 2010).

Praeguseks on leitud erinevate GWAS-i (*Genome Wide Association Study*) uuringute kaudu 36 lookust, mis on seotud vitiliigo patogeneesiga. Umbes 90% nendest geenidest kodeerivad immuunsüsteemiga seotud valke. 10% geenidest kodeerivad melanotsüütide valke. Viimased käituvad kui autoantigeenid, stimuleerides kaasasündinud immuunsüsteemi rakuvastust melanotsüütidele või olles sihtmärkideks omandatud immuunsüsteemi rakkudele, mis hävitavad pigmendirakke (Spritz, 2013). Lisaks on leitud seos nende 10% geenide ja pahaloomulise melanoomi vahel. Tc-rakud, mis on suunatud melanoomi rakkude vastu, omavad vitiliigos samu sihtmärke – kasvaja antigeene ja melanosoomi valke (Sakai jt, 1997; Yee jt, 2000; Mehrotra jt, 2012; Jin jt, 2012) –, sellest järeldati, et vitiliigo on melanoomivastase immuunjärevalve normaalne protsess.

Arvatakse, et üks osa vitiliigo patogeneesist on seotud melaniini sünteesil tekkivate reaktiivsete hapnikuühenditega (ingl k ROS – *reactive oxygen species*), sealhulgas vesinikperoksiidiga (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Kuhjuvad jääkproduktid tekitavad melanotsüütis oksüdatiivset stressi ning inhibeerivad melanogeneesi (Shallreuter jt, 1999; Meyskens jt, 2001; Koca jt, 2004; Shalbaf jt, 2008). Lisaks indutseerivad nad kahjustunud rakkude apoptoosi (Takashi jt, 2004), mis on omakorda immuunvastuse põhjuseks (Mahoney ja Rosen, 2005). Ka on täheldatud nii katalaasi kui ka glutatiooni peroksüdaasi aktiivsuse vähenemist (Shallreuter jt, 2008).

Vitiliigo tekkel on suur roll keskkonnafaktoritel, nagu kemikaalid, stress, UV-kiirguse tekitatud põletus ja füüsiline/mehaaniline trauma, mis on võimelised stimuleerima melanogeneesi (Jean jt, 2001; Kippenberger jt, 1999; Boissy ja Manga, 2004). Katsed fenoolsete ja katehoolsete ühenditega on näidanud, et kokkupuutel kemikaalidega suureneb ROS-ide ja valesti pakitud valkude osakaal, mis viib UPR-i (ingl k *unfolded protein response*) vastuseni (van den Boorn jt, 2011; Toosi jt, 2012). UPR-il on kaks võimalikku suunda. Valestipakitud valgud lagundatakse ja aktiveeritakse chaperon-valkude tootmine, mis vastutavad valkude pakkimise eest. Sünteesitakse uued valgud, mis pakitakse õigesti. Kui teatud ajavahemikul ei suudeta probleemi lahendada, suunatakse rakk apoptoosi (Haynes ja Ron, 2010; Pellegrino jt, 2013). Lisaks kemikaalidele, on nahk eksponeeritud ultraviolettkiirgusele, mis suurendab samuti rakusiseste ROS-ide hulka (Meyskens jt, 2001).

Arvatakse, et stressis melanotsüüdid aktiveerivad kaasasündinud immuunsüsteemi rakud, kui need puutuvad kokku melanotsüütidele spetsiifiliste valkudega (kindlaks tehtud GWAS-i uuringutes) (Spritz, 2013). Nendeks on teiste seas HLA-A (ingl k *human-leucocyte-associated antigen – A*), mis kodeerib HLA I klassi rakuretseptorit, see omakorda aktiveerib Tc-rakud. Lisaks, melanosoomides melaniini sünteesi eest vastutav ensüüm türosinaas (TYR) (Jin jt, 2012) ja türosinaasiga seotud valgud 1 ja 2 (TRP-1 ja TRP-2) (Tachesi jt, 1996). APC-d peavad neid peptiide DAMP-ideks ning esitlevad neid naiivsetele T-rakkudele ehk aktiveerivad omandatud immuunsüsteemi rakud (Schallreuter jt, 2008a). Seda hüpoteesi toetab makrofaagide, DCde ja NK-rakkude leidmine vitiliigo patsientide haiguskollete infiltraadist (Van der Wijngaard jt, 2000; Mosenson jt, 2013). ning tõik, et vitiliigo haiguskoldeid ümbritseva naha histoloogiliste ja immunohistokeemiliste uuringute ning perifeerse vere analüüside tulemusena on leitud suurenenud Th- ja Tc-rakkude hulk (Le Poole jt, 1996; van den Wijngaard jt, 2000; Steitz jt, 2004; van den Boorn jt, 2009). Eelnevalt kirjeldatud leiud viitavad põletikureaktsioonile, mille tagajärjel hävitatakse melanotsüüdid, mille üheks võimalikuks meetodiks on Tc-rakkude vahendatud rakusurm (Ogg jt, 1998; van den Wijngaard jt, 2000; van den Boorn jt, 2009). Kui naiivstele T-rakkudele esitletakse autoantigeene, ekspresseerivad ja sekreteerivad nad vastusena IL-2, mis seondub nende pinnal oleva IL-2 retseptoriga (IL-2R). Selle järel saavad neist Tc-rakud, mis ekspresseerivad spetsiifilisi antigeene äratundvaid TCR-e ja sekreteerivad gransüümi Bd (Mouchacca jt, 2013).

Lisaks IL-2 eksperssioonile on täheldatud erinevate tsütokiinide hulga suurenemist nii haiguskollete lähiümbruses kui ka perifeerses veres. Sellisteks tsütokiinideks on näiteks IFN- $\gamma$ , mis on vajalik antigeeni esitlemiseks, rakkude migratsiooniks põletikukoldesse ja

aktiveerimiseks (Harris jt, 2012; Gregg jt, 2010), põletikureaktsiooni soodustavad IL6 ja IL8 (Toosi jt, 2012; Miniati jt, 2014) ning IL-17 ja IL-22 (Rätsep jt, 2008; Elela jt, 2013). Tsütokiinide ebaregulaarne hulk epidermises häirib melanotsüütide normaalset paljunemist ning funktsiooni (Moretti jt, 2002; Grimes jt, 2004). Samuti esineb korrelatsiooni haiguse aktiivsuse ja IL-2R hulga suurenemise vahel, kus IL-2R on vajalik T-rakkude aktiveerimiseks ning immuunvastuses osalemiseks (Caixia jt, 1999).

Vitiliigo patogeneesis on suur roll ka T-reg-idel, kuna need vastutavad perifeerse tolerantsi eest. Autoimmuunse vastuse vältimiseks eemaldavad nad autoreaktiivsed T-rakud vere- ja lümfiringest (Baecher-Allan ja Hafler, 2006). Mitmetes autoimmuunhaigustes on ära märgitud, et T-reg-idel esinevad funktsionaalsed defektid, mis võivad olla patogeneesi põhjus (Cvetanovich ja Hafler, 2010). Varem on leitud, et vitiliigohaigetel on T-reg-ide hulk vähenenud (Klarquist jt, 2010). T-reg-ide rolli uurimiseks vitiliigo patogeneesis kasutati spetsiaalselt vitiliigo uurimiseks loodud hiireliini h3TA2 (*human TIL-derived Tyrosinase TCR transgenic on HLA-A2*) (Mehrotra jt, 2012). Leiti, et IFN- $\gamma$  defektsetes h3TA2 hiirtes taastus pigmentatsioon täielikult ning see oli tingitud T-reg-i populatsiooni suurenemisest. Lisaks näidati, et T-reg-ide puudusel suureneb põletikku soodustavate interleukiinide, sealhulgas IL-22, IL-17, IL-6, IL-2, sekretsioon (Chatterjee jt, 2013), mis on ka vitiliigohaigetel suurenenud (Singh jt, 2012).

Vitiliigohaigete vereringest on leitud melanotsüütidevastaseid antikehi, mis viitab ka humoraalse immuunsuse aktiivsusele. Neid antikehi ei esine tervetel inimestel ega ka indiviididel, kellel esineb mõni muu nahahaigus (Naughton jt, 1983; Farrokhi jt, 2005, Harning jt, 1991). Antikehade vahendatud melanotsüütide tsütotoksilisust on leitud vastusena autoantigeenidele *TYR*, *TRP-1* ja *TRP-2* (Tachesi jt, 1996). Ka on näidatud, et passiivse immuniseerimise käigus hiirtesse viidud TRP-1 monoklonaarsed antikehad tekitasid vitiliigo-sarnase depigmenteerumise (Hara jt, 1995). Arvatakse, et humoraalsel immuunsusel on teisene roll vitiliigo patogeneesis ning pigem oletatakse rakulise immuunsuse hävitavat mõju melanotsüütidele (Kemp jt, 2001).

Autoimmuunteooriat toetab fakt, et repigmenteerumine toimub tingimustes, kus immuunsüsteem on maha surutud, näiteks ravimisel ultraviolettkiirguse või steroididega. Valgusteraapia järel on märgatud nii T-rakkude, tsütokiinide kui ka teiste efektormolekulide vähenemist nahas ning pigmendi taastumist. Steroidid on efektiivsed põletikualandajad, vähendades nii immuunrakkude kui ka immuunrakkude sekreteeritavate ühendite kogust.

Mõlemal juhul on langenud antikehadest sõltuv tsütotoksilisus melanotsüütide vastu (Hann ja Nordlund, 2000).

### **1.5.3. Vitiliigo ja miRNA-d**

Varem on analüüsitud kas vitiliigohaigete põletikukoldest eraldatud nahabiopsia rakkude või PBMC-de miRNA-de ekspressioonimustrit. PBMC-d on head uurimisallikad, kuna on peamised põletikuprotsessis osalejad (Sonkoly jt, 2008; Shi jt, 2013). Vere immuunrakkudest eraldatud miRNA-d on väga stabiilsed, mis teeb nad headeks biomarkeriteks vitiliigo tekkemehhanismide mõistmiseks (Weiland jt, 2012).

Shi jt (2013) uurisid miRNA-de osalust vitiliigo patogeneesis ning leidsid, et vitiliigohaigete PBMC-des oli 31 miRNA ekspressioon ala- või ülereguleeritud võrreldes tervete kontrollrühmadega. Leiti kolm miRNA-d (miR-16, miR-19b ja miR-720), mis võivad sobida vitiliigo biomarkeriteks (Shi jt, 2013). Mitmed leitud miRNA-d on seotud immuunrakkudega (O'Connell jt, 2010). Nii miR-16 kui ka miR-146a ekspressioon olid vitiliigo patsientidel üles reguleeritud võrreldes kontrollrühmaga (Shi jt, 2013). Lisaks uurisid Shi jt miRNA-de osalust vitiliigo patogeneesis, kuid seekord kasutati vitiliigoga hiire mudelit (Muranski jt, 2008). Leiti kolm miRNA-d, mille ekspressioon oli vitiliigohaigetel hiirtes muutunud, nendeks olid miR-146a, miR-191 ja miR-342-3p (Shi jt, 2014). Varem on leitud reumatoidartriidi patsientide PBMC-dest miR-16 ja miR-146a ekspressiooni tõusu (Niimoto jt, 2010). Leid korreleerub haiguse aktiivsusega, mis viitab miR-16 ja miR-146a osalusele põletikureaktsioonis ja autoimmuunhaiguste patogeneesis (Pauley jt, 2008).

Läbi on viidud ka uuring vitiliigohaigete valgete laikudega nahapiirkondade ja tervete kontrollrühma liikmete naha miRNA-de ekspressiooni erinevuste leidmiseks. Leiti 38 miRNA ekspressioonimustri erinevus vitiliigohaigete nahas võrreldes tervete inimestega. Nendest 12 miRNA-d olid vitiliigohaigetel mitmekordselt üles reguleeritud, nende seas olid miR1, mis reguleerib oksüdatiivset stressi rakus, ja miR133b, mida võib seostada IL-17 ja IL-22 ekspressiooni suurenemisega (Mansuri jt, 2014).

MiRNA-de osaluse kindlakstegemine vitiliigohaigetel oleks kiire ja lihtne võimalus täpseks haiguse diagnoosimiseks ja raviks. Siiski on miRNA-de roll vitiliigo patogeneesis veel täpselt välja selgitamata, kuna teemakohaseid uuringuid on läbi viidud vaid üksikuid (Shi jt, 2013; Shi jt, 2014; Mansuri jt, 2014).

## 2. EKSPERIMENTAALOSA

### 2.1. Töö eesmärgid

Vitiliigo ehk laikpigmentituse korral tekivad melanotsüütide hävimisest nahale depigmenteerunud laigud. Haiguse etioloogia pole veel päris selge. Selleks, et vitiliigot paremini mõista, on oluline uurida seda erinevatel tasanditel (genoomi, transkriptoomi, proteoomi jt tasanditel). Käesolevas töös keskendume miRNA-de ekspressioonimustrite uuringutele vitiliigohaigete ja tervete kontrollirühma PBMC-des. Hetkel leiduvad vaid üksikud artiklid vitiliigoga seotud miRNA-dest. Antud töö tulemusena loodame tuvastada ja paremini mõista mehhanisme, mis võiksid olla osalised vitiliigo patogeneesis.

Käesoleva töö konkreetseteks eesmärkideks on:

- Leida miRNA-d, mis võiksid olla seotud immuunsüsteemi regulatsiooniga, analüüsid vitiliigohaigete ja tervete kontrollirühma PBMC-de kogu transkriptoomi sekveneerimisel (RNA-seq) saadud tulemusi (Reimann jt., 2014).
- Kindlaks teha meid enam huvitavate miRNA geenide (*miR-181a*, *miR-223*, *miR-150*, *miR-19b*, *miR-29a* ja *miR-17*) ekspressioonitasemed qRT-PCR meetodil. Lisaks pri-miRNA-de ekspressioonile, mille info saime RNA-Seq-ga, tahame vaadata ka küpsete miRNA-de ekspressiooni mustrit. Antud töös keskendume immuunsüsteemiga seotud küpsetele miRNA-dele.
- Kirjeldada põhjalikumalt qRT-PCRga analüüsitud geenide ekspressioonimustrit PBMC-des ja arutleda nende võimaliku rolli üle vitiliigo patogeneesis.

## 2.2. Materjal ja meetodika

### 2.2.1. Töös uuritud indiviidid

Tartu Ülikooli eetikakomitee kiitis heaks kõik selles töös kasutatud protokollid ja nõusolekuvormid. Kõiki uuritavaid isikuid informeeriti katse eesmärkidest ning nad kinnitasid oma allkirjaga vastaval uuringus osalemise nõusolekuvormil.

Käesolevas töös uuriti vitiliigo patsientide ja tervete vabatahtlike vereseerumeid. Katses uuritavad, nii vitiliigohaiged patsiendid kui ka terved vabatahtlikud, on europiidid ja elavad Eestis. Antud uurimusse kaasatud vitiliigohaigete veri koguti Tartu Ülikooli Kliinikumi Nahahaiguste Kliinikus. Kontrollgruppi kuulusid vabatahtlikud, kes olid terved ning kelle perekonnas pole varem vitiliigot esinenud. Katses uuritavate vanus ja sugu on välja toodud tabelites 1 ja 2..

Vitiliigo diagnoosimine patsientidel põhineb kliinilistel sümptomitel, nagu naha iseloomulik depigmenteerumine koos depigmenteerunud laikude tüüpilise paiknemisega kehaosadel, kusjuures põletikuline ala on Wood'i lambiga vaadatuna valge värvusega. Vitiliigo erinevad tüübid põhinevad depigmenteerunud naha levikumustril, ulatusel ning haiguse aktiivsusel (Kingo jt, 2006). Kõik katses osalevad vitiliigohaiged põdesid *vitiligo generalis*'t ning ükski neist polnud saanud viimase kuue kuu jooksul ravi.

**Tabel 1.** RNA-Seq-i katses uuritud indiviidid (Reimann jt., 2014).

	<b>Katses osalejate arv</b>	<b>Sugu naine/ mees</b>	<b>Keskmine iga (aastates)</b>
<b>Vitiliigohaiged</b>	4	2/2	32,5
<b>Kontrollrühma liikmed</b>	4	2/2	30,8

**Tabel 2.** qRT-PCR-i katses uuritud indiviidid

	<b>Katses osalejate arv</b>	<b>Sugu naine/ mees</b>	<b>Keskmine iga (aastates)</b>
<b>Vitiligohaiged</b>	9	6/3	40,1
<b>Kontrollrühma liikmed</b>	9	6/3	39,6

### **2.2.2. qRT-PCR-ga analüüsitavad miRNA-d**

Vitiliigohaigete ja tervete kontrollrühma liikmete PBMC-de kogu transkriptoomi ekspressioonimustrite võrdlemiseks kasutati SOLiD Systemi platvormi ja rakendust WT RNA-Seq (Reimann jt, 2014). Andmetest otsiti välja sellised miRNA geenid, mille ekspressioon oli haigetel ja tervetel statistiliselt oluliselt erinev ( $FDR \leq 0,05$ ). P-väärtused on korrigeeritud 5%-lise olulisusnivoo ( $FDR$  – *false discovery rate*) juures. RNA-Seq-i analüüsi tulemusena saadakse pri-miRNA-de (tähistus: mir-), mitte nende aktiivse ehk küpse vormi miRNA (tähistus: miR-) ekspressioonimuster vitiliigohaigetel ja tervetel.

qRT-PCR-ga analüüsimiseks valiti välja kuus miRNA geeni, mis on kirjanduse põhjal seotud immuunsüsteemiga (Ventura jt, 2008; de Kouchkovsky jt, 2013; Ebert jt, 2009) ja mille puhul on leitud varem seoseid ka vitiliigoga (Shi jt, 2013; Shi jt, 2014; Mansuri jt, 2014). qRT-PCRi tulemusena saadakse teada miRNA aktiivse vormi ekspressiooni tase. Uuritavateks miRNA-deks olid: miR-181a, miR-223, miR-150, miR-19b, miR-29a ja miR-17. Lisaks uuritavatele miRNA-dele kasutati referentsina miRNA-d miR-let7, mis on vajalik uuritavate miRNA-de ekspressioonitaseme normaliseerimiseks. Referents-miRNA valiti selle alusel, et ta osaleb vereloomes ja seetõttu on detekteeritav igas proovis (nii haigete kui ka tervete kontrollrühma liikmete proovides) ning andma kõikides proovides ka tugeva ja suhteliselt sarnase ekspressioonisignaali (Hunter jt, 2008; Mitchell jt, 2008; Wong jt, 2008; Wang jt, 2009; Liu jt, 2010).

### **2.2.3. Vereproovide kogumine, mononukleaarsete rakkude eraldamine koguverest ja totaalse RNA eraldamine**

Haigete ja tervete veri (16 ml) nii RNA-Seq-i (Reimann jt, 2014) kui ka qRT-PCR-i jaoks koguti hommikul kella 8 ja 12 vahel, et vähendada tsirkadiaanset mõju tsütokiinide tootmisele (Westendorp jt, 1997). Seejärel eraldati mononukleaarset rakud ülejäänud vererakkudest ja seerumist BD Vacutainer CPT tuubide abil (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA), tsentrifuugides neid 30 minutit (1500 g, 20 °C). Rakud pesti PBS-iga (ingl k *Phosphate Buffered Saline*), mille järel tsentrifuugiti rakke 10 (190 g, 20 °C). Supernatant eemaldati ning rakud asetati kuni RNA eraldamiseni temperatuurile –80 °C.

Totaalse RNA eraldamiseks kasutati mirVana miRNA Isolation Kit'i ja tootja protokoll (Ambion, Life Technologies Corp., Carlsbad, CA, USA). Totaalse RNA kontsentratsioon mõõdeti Qubit® 2.0 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) fluorofotomeetriga – kontsentratsioonid jäid vahemikku 5 – 90 ng/μl. RNA kvaliteedikontroll tehti, kasutades

Agilent 2100 Bioanalyzerit ning RNA 6000 Nano Kit'i (Agilent Technologies Inc. CA, USA). Kõikide proovide korral oli RIN (*RNA integrity number*) üle 9.

#### 2.2.4. cDNA süntees

Küpsete miRNA-de pöördtranskriptsiooni reaktsiooniks kasutati TaqMan<sup>®</sup> MicroRNA Reverse Transcription Kit'i ja TaqMan<sup>®</sup> mikroRNA kommertsiaalseid spetsiaalseid miRNA juuksenõelastruktuuri praimereid vastavalt tootja protokollile (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). cDNA sünteesis kasutati 6 ng RNA-d. cDNA sünteesi reagentid ja PCR-i programm on ära toodud tabelites 3 ja 4. cDNA-d hoiti kuni kasutamiseni –20 °C juures.

**Tabel 3.** cDNA sünteesi reaktsioonisegu

Reagent	µl
100 mM dNTP mix	0,023
100 µM RT ensüüm (Ferm)	0,133
10x RT puhver	0,50
RNAasi inhibiitor	0,066
H <sub>2</sub> O	1,776
5x RT praimer (Taqman)	1
RNA proov (6 ng)	2
Kogumaht	5,5

**Tabel 4.** cDNA sünteesi reaktsioonide programm

Teperatuur °C	Aeg minutites
16°C	30
42°C	30
85°C	10
4°C	∞

### 2.2.5. Kvantitatiivne reaalaaja PCR (qRT-PCR)

MiRNA-de ekspressiooni mõõtmiseks kasutati kvantitatiivset reaalaaja PCR-i (ABI Prism 7900HT, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) ja kommertsiaalseid TaqMan mikroRNA primereid ja TaqMan sondi (hsa-let-7a, hsa-miR-181a, hsa-miR-223, hsa-miR-150, hsa-miR-19b, hsa-miR-29a, hsa-miR-17) vastavalt tootja protokollile (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). 5x *HOT FIREPol*<sup>®</sup> Probe qPCR segu tuli eelnevalt lahjendada 2X ning sisaldas *HOT FIREPol*<sup>®</sup> DNA polümeraasi, 5x qPCR puhvrit, 15 mM MgCl<sub>2</sub> 1x PCR lahus – 3 mM, dNTPs, ROX värvi (Solis BioDyne, Tartu, Eesti).

Kõik reaktsioonid tehti kahes korduses (ühe reaktsiooni maht 10 µl). Negatiivse kontrollina kasutati cDNA-ta reaktsioonisegu, et tuvastada potentsiaalset saastatust. Nii qRT-PCR-i reaktsiooni segu kui ka programm on toodud tabelites 5 ja 6.

**Tabel 5.** qRT-PCR-i reaktsiooni segu

Reagenid	µl
2X Hot Firepol probe qPCR segu (ROX)	11
20xTaqMan MIR sond (20U/µl)	1
H <sub>2</sub> O	5
cDNA	5
Kogumaht	22

**Tabel 6.** qRT-PCR-i reaktsiooni programm

Temperatuur °C	Aeg	Tsüklite arv
95 °C	15 min	1
95 °C	15 sek	40
60 °C	1 min	1
4 °C		

## 2.2.6. Ekspressioonitulemuste statistiline ja funktsionaalne analüüs

Kogu transkriptoomi sekveneerimisega saadud ekspressiooniandmete diferentsiaalanalüüsis kasutati R Bioconductor meetodit edgeR (Robinson ja Smyth, 2008), mis teostab täpse statistilise meetodi ja üldise lineaarse mudeli, multigrupp või multi faktorilisel eksperimendil. Üks mitmest funktsioonist, mida edgeR täidab, on empiiriline Bayesi meetod, mis lubab hinnata geenispetsiifilist bioloogilist varieeruvust, isegi kui eksperimendis on madal bioloogilise replikatsiooni tase.

Kõikide uuritavate miRNA-de  $C_T$ -väärtuste kahe reaktsiooni keskmine arvutati referentsgeeni miR-let7 geomeetrilise keskmise  $C_T$ -väärtuste suhtes.  $C_T$  väljendab tsüklite arvu, millal uuritavat või referentsgeeni detekteeriti.  $\Delta C_T$  on vastavate väärtuste vahe.

$$\Delta C_T = C_T (\text{uuritav miRNA}) - C_T (\text{referents, miR-let7})$$

Vitiliigohaigete patsientide miRNA keskmisest  $\Delta C_t$  väärtusest lahutati kontrollrühma liikmete miRNA-de keskmine  $\Delta C_t$  väärtus, et leida  $\Delta \Delta C_t$ .

$$\Delta \Delta C_t = \Delta C_t (\text{patsient}) - \Delta C_t (\text{terve})$$

Uuritava geeni ekspressiooni kirjeldab väärtus  $2^{-\Delta \Delta C_T}$ . Sama geeni ekspressiooni erinevusi kahes võrreldavas grupis kordades väljendatakse väärtusega  $2^{-\Delta \Delta C_T}$ .

Kõikide qRT-PCR-i katseandmete analüüsimiseks kasutati arvutiprogramme MS Excel 2007 (Microsoft Software, Redmond, WA, U.S) ja GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Kuna enamiku uuritavate lookuste puhul (andmed pole esitatud) ei järginud ekspressioonitasemed normaaljaotust, kasutati statistiliseks analüüsiks Mann-Whitney U-testi.

### 2.3. Tulemused

Vitiliigohaigete ja tervete kontrollrühma liikmete PBMC-de kogu transkriptoomi ekspresioonimustrite võrdlemisel leiti 2470 erinevalt ekspresseerunud geeni ( $FDR \leq 0,05$ ), millest 75 olid miRNA-de eellasgeenid – pri-miRNA-d (Reimann jt., 2014). Erinevalt ekspresseerunud pri-miRNA-dest valisime edasiseks põhjalikumaks uurimiseks välja kuus miRNA geeni, mis on seotud immuunsüsteemiga – *mir-181a*, *mir-17*, *mir-19b*, *mir-223*, *mir-29a* ja *mir-150*. Nende kuue geeni korral kasutasime qRT-PCR-i meetodit, et uurida küpsete miRNA-de ekspressiooni vitiliigohaigete ja tervete PBMC-des.

WT RNA-Seq-i tulemustes leiti statistiliselt oluliselt erinevalt ( $FDR \leq 0,05$ ) ekspresseerunud pri-miRNA-d. Pri-miRNA-d on pikad, kuni 100 kb pikkused mittekodeerivad esmased miRNA transkriptid, mis on inaktiivsed (Cai jt, 2004; Lee jt, 2004). Kuid on näidatud, et pri-miRNA struktuur võib mõjutada vastava miRNA töötlemist küpseks miRNA-ks (Chaulk jt, 2011). Antud töös kasutati miRNA-de funktsiooni kindlakstegemiseks erinevaid allikaid, sealhulgas NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), miRBase ja TargetScan. Leiti miRNA-d, mis osalevad närvi-, maksa- ja immuunsüsteemi rakkude apoptoosis, jagunemises ja diferentseerumises (Olive jt, 2009, Shivdasani jt, 2006, Henao-Meija jt, 2013). MiRNA-d võivad käituda kui tuumor-supressorid või onkogeeninina (*oncomiR*) ehk takistada või soodustada rakkude jagunemist (Gibcus jt, 2009; He jt, 2005). Leitud tuumor-supressorite seas oli ka miR-150 ning *oncomiR*'ina käitub miR-17-92 klaster (He jt, 2005). Edasisse uuringusse valiti kuus miRNA-d, mille ekspressiooni oli varem täheldatud PBMC-des (Chen jt, 2004; Zhou jt, 2007; Xiao jt, 2008), lisaks sai oluliseks varasem seotus autoimmuunhaiguse (Dai jt, 2007) või vitiliigoga (Shi jt, 2013; Shi jt, 2014; Mansuri jt, 2014). Kuna WT RNA-Seq annab infot ainult pri-miRNA-de ekspressiooni kohta, siis valisime edasise uurigu objektideks küpsed miRNA-d. See aitab meil ühtlasi ka hinnata pri-miRNA-de ja küpsete miRNA-de ekspressiooni korreleerumist. Uuritavate miRNA-de ekspresioonimustri analüüsiks kasutati qRT-PCR-iga.

Selgus, et kuuest uuritavast miRNA-st oli ekspressioon statistiliselt erinev vaid ühel – miR-181a (graafik 1, lk 28). Teistel puudus kindel erinevus kogu tervete ja haigete grupi vahel. Selgus, et peale miR181a ekspresseerub soost sõltuvalt veel miR-150 ja miR-29a. miRNA-de eellased ja nende küpsed vormid ei pruugi korreleeruda, kuna neil on erinev vorm ning pri-miRNA-d peavad enne aktiivseks miRNA-ks saamist läbima nii Diceri kui ka Drosha töötlust.

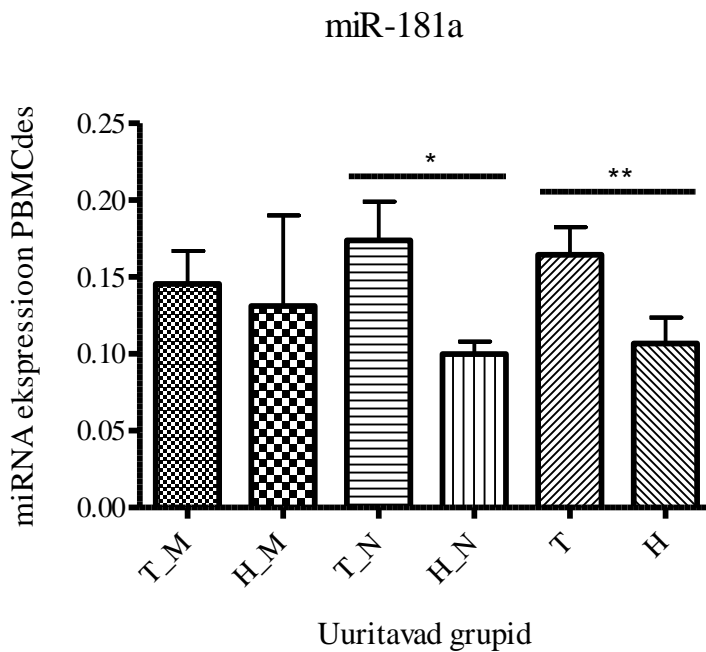
Kogu transkriptoomi uuringust selgus, et mir-181a1 ekspressioon oli haigetel 22,8 korda ( $FDR \leq 0,05$ ) madalam kui tervetel (tabel 7, lk 32). qRT-PCR analüüs näitas sarnast tulemust: vitiliigohaigetel oli miR-181a ekspressioon 1,5 ( $p \leq 0,01$ ) korda madalam kui tervetel (graafik 1, lk 28; tabel 7, lk 32).

RNA-Seq-i tulemustest selgus, et mir-223 ja mir-150 ekspressioon on haigetel vastavalt 4,5 korda ( $FDR \leq 0,05$ ) ja 3 korda ( $FDR \leq 0,05$ ) madalam kui tervetel (tabel 7, lk 32). Lisaks on mir-17, mir-19b1 ja mir-29a ekspressioon patsientidel vastavalt 8,6 korda ( $FDR \leq 0,05$ ), 10,2 korda ( $FDR \leq 0,05$ ) ja 8 korda ( $FDR \leq 0,05$ ) madalam kui tervetel. Kui võrrelda terveid ja haigeid, siis qRT-PCR-i andmed ei näidanud statistiliselt olulist erinevust WT RNA-Seq-i analüüsil leitud miRNA-de ekspressioonis (graafikud 2–6, lk 28-31).

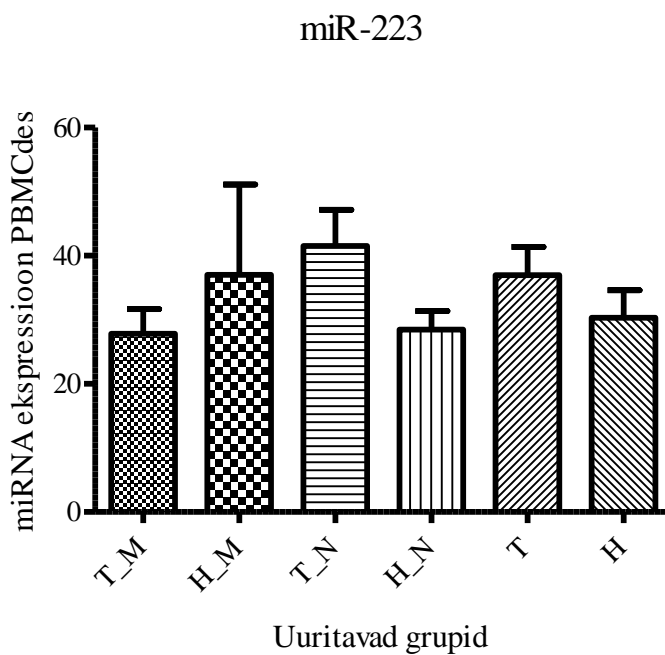
Käesolevas töös uuriti ka meeste ja naiste pri-miRNA-de ekspressiooni erinevusi RNA-Seq-i abil saadud tulemustes. Leiti, et mir-29a ekspressioon oli haigete meeste PBMC-des 13,8 korda ( $FDR \leq 0,05$ ) kõrgem kui haigetel naistel (tabel 7, lk 32). Samas qRT-PCR-i ekspressioonianalüüsi tulemusena selgus, et vitiliigohaigete naiste PBMC-des oli miR-181a, miR-29a ja miR-150 ekspressioon vastavalt 1,7 ( $p \leq 0,05$ ) (graafik 1, lk 28, tabel 7, lk 32), 1,8 ( $p \leq 0,05$ ) (graafik 5, lk 30; tabel 7, lk 32) ja 1,8 korda ( $p \leq 0,05$ ) (graafik 3, lk 29 tabel 7, lk 32) madalam kui tervete naiste PBMC-des.

Uuritavad geenid ekspresseerusid ka tervetel indiviididel erinevalt. MiR-150 ekspressioon oli tervetel naistel 1,6 korda kõrgem kui tervete meeste PBMC-des ( $p \leq 0,05$ ) (graafik 3, lk 29, tabel 7, lk 32).

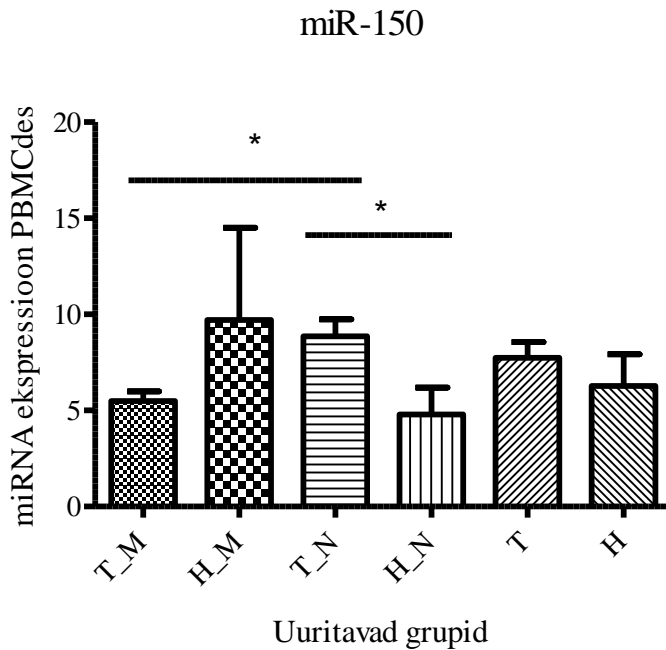
**Graafik 1.** Uuritud miRNA miR-181a  $2^{\Delta C_T}$  väärtused vitiliigohaigete ja tervete PBMC-des, milles T\_M on terved mehed, H\_M haiged mehed, T\_N terved naised, H\_N haiged naised, Terved kontrollrühma liikmed ja H vitiliigohaiged (\*\*p ≤ 0,001, \*\*p ≤ 0,01, \*p ≤ 0,05).



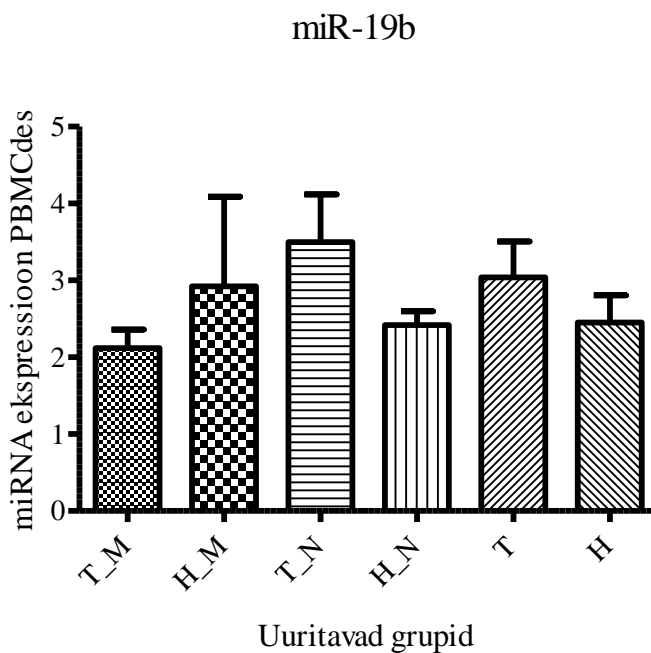
**Graafik 2.** Uuritud miRNA miR-223  $2^{\Delta C_T}$  väärtused vitiliigohaigete ja tervete PBMC-des, milles T\_M on terved mehed, H\_M haiged mehed, T\_N terved naised, H\_N haiged naised, T terved kontrollrühma liikmed ja H vitiliigohaiged (\*\*p ≤ 0,001, \*\*p ≤ 0,01, \*p ≤ 0,05).



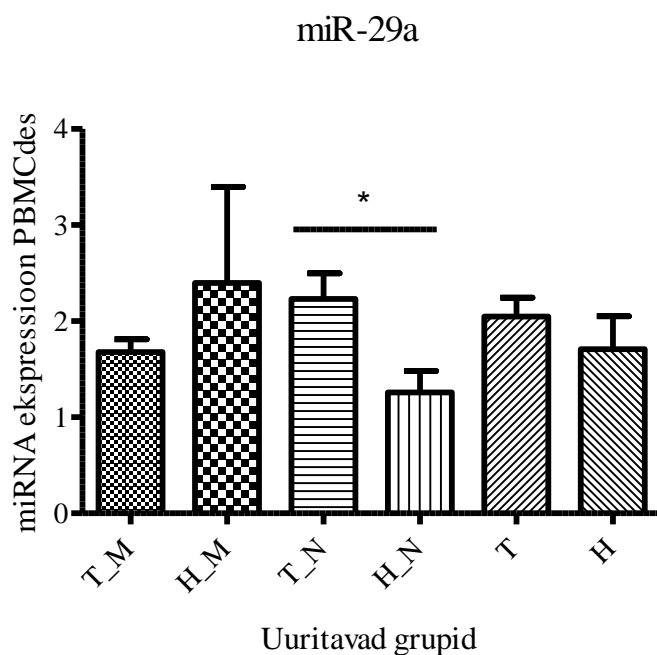
**Graafik 3.** Uuritud miRNA miR-150  $2^{\Delta C_T}$  väärtused vitiliigohaigete ja tervete PBMC-des, milles T\_M on terved mehed, H\_M haiged mehed, T\_N terved naised, H\_N haiged naised, T terved kontrollrühma liikmed ja H vitiliigohaiged (\*\* $p \leq 0,001$ , \* $p \leq 0,01$ , \* $p \leq 0,05$ ).



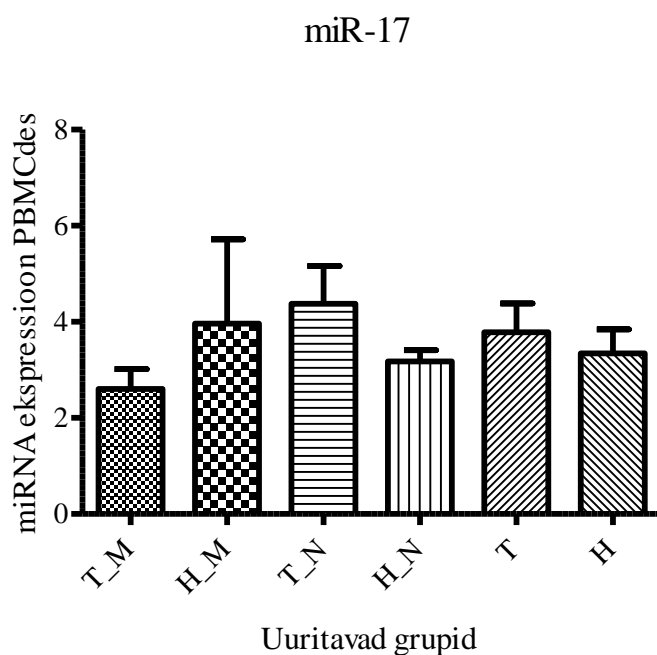
**Graafik 4.** Uuritud miRNA miR-19b  $2^{\Delta C_T}$  väärtused vitiliigohaigete ja tervete PBMC-des, m. Milles T\_M on terved mehed, H\_M on haiged mehed, T\_N on terved naised, H\_N on haiged naised, T terved kontrollid kontrollrühma liikmed ja H on vitiliigohaiged (\*\* $p \leq 0,001$ , \* $p \leq 0,01$ , \* $p \leq 0,05$ ).



**Graafik 5.** Uuritud miRNA miR-29a  $2^{\Delta C_T}$  väärtused vitiliigohaigete ja tervete PBMC-des, milles T\_M on terved mehed, H\_M haiged mehed, T\_N terved naised, H\_N haiged naised, T terved kontrollrühma liikmed ja H on vitiliigohaiged (\*\* $p \leq 0,001$ , \*\* $p \leq 0,01$ , \* $p \leq 0,05$ ).



**Graafik 6.** Uuritud miRNA miR-17  $2^{\Delta C_T}$  väärtused vitiliigohaigete ja tervete PBMC-des milles T\_M on terved mehed, H\_M haiged mehed, T\_N terved naised, H\_N haiged naised, T terved kontrollrühma liikmed ja H vitiliigohaiged (\*\* $p \leq 0,001$ , \*\* $p \leq 0,01$ , \* $p \leq 0,05$ ).



**Tabel 7.** RNA-Seq-i ja qRT-PCR-i andmetel põhinev miRNA-de ekspressiooni võrdlus gruppide vahel. Vaadeldakse järgnevaid gruppe ja alagruppe: kõik vitiliigohaiged (H), kõik terved (T), vitiliigohaiged mehed (H\_M) ja naised (H\_N), terved mehed (T\_M) ja naised (T\_N). Nool üles (↑) tähendab, et II grupi (GII) miRNA ekspressiooni tase on suurem kui I grupi (GI) oma, nool alla (↓) tähendab aga vastupidist (üles nool, ekspressioon on haigetes kasvanud ja alla noolega, haigetes kahanenud). Numbrid noolte ees väljendavad suurust  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  ehk ekspressioonitasemete erinevusi kordades. Statistiliselt olulised tulemused on välja toodud rasvases kirjas (\*\*P < 0,001, \*\*P < 0,01, \*P < 0,05).

Uuritav miRNA		mir-181a1	miR-181a	mir-223	miR-223	mir-150	miR-150	mir-19b1	miR-19b	mir-29a	miR-29a	mir-17	miR-17
Uurimismeetod		RNA-Seq	qRT-PCR	RNA-Seq	qRT-PCR	RNA-Seq	qRT-PCR	RNA-Seq	qRT-PCR	RNA-Seq	qRT-PCR	RNA-Seq	qRT-PCR
GI	GII												
T	H	<b>22,8</b> ↓***	1,54↓**	4,5↓***	1,2↓	<b>3</b> ↓*	1,2↓	<b>10,2</b> ↓***	1,2↓	<b>8</b> ↓***	1,2↓	<b>8,6</b> ↓***	1,1↓
T_M	H_M	117,9↓	1,24↓	3,2↓	1,2↑	5,9↓	1,5↑	20↓	1,2↑	5,3↓	1,4↑	5,5↓	1,4↑
T_N	H_N	13,9↓	<b>1,74</b> ↓*	5,2↓	1,5↑	2,2↓	<b>1,8</b> ↓*	9,1↓	1,4↓	42,9↓	1,8↓*	8,5↓	1,4↓
T_M	T_N	1,5↓	1,19↓	1,8↓	1,5↓	1,5↓	1,6↑*	2,5↑	1,7↑	1,7↓	1,3↑	1,5↑	1,7↑
H_M	H_N	5,8↑	1,17↓	1,1↑	1,2↓	1,8↑	1,8↓	5,4↑	1,0↓	<b>13,8</b> ↓**	1,9↓	1↓	1,1↓

## 2.4. Arutelu

Vitiliigo on omandatud multifaktoriaalne nahahaigus, mille etioloogiast pole veel täielikult aru saadud. Praeguseks on tehtud mitmeid uuringuid, leidmaks mehhanisme, mis on seotud vitiliigo patogeneesiga, ning uuritud, millised geenid võiksid selles protsessis osaleda (Spritz, 2013). Oletatakse, et tegemist on süsteemse haigusega, kuna haiguskolletes on leitud nii PBMC-de kui ka tsütokiinide hulga tõusu, mis viitab põletikule (Zhou jt, 2011; Zhou jt, 2012; Ben Ahmed jt, 2012; Klarquist jt, 2010). Hiljuti on avastatud, et vitiliigos on mitmete miRNAde ekspressioon muutunud (Shi jt, 2013; Shi jt, 2014; Mansuri jt, 2014) ja käesolevas töös keskendumegi neile molekulidele. Kuna miRNA-d on väga stabiilsed, siis miRNA-d võiksid olla potentsiaalsed biomarkerid, iseloomustamaks haiguse olemust ja kulgu ning määrata võimalikud ravi sihtmärgid.

Antud töö eesmärgiks oli kirjeldada miRNA-de ekspressioonimustrit PBMC-des ja nende rolli vitiliigo patogeneesis. Mitmed leitud miRNA-d on seotud rakkude arengu, eluvõime ning apoptoosiga (Xu jt., 2004), organismi vigastuste ja anomaaliate, rakkudevahelise signalisatsiooni, vereloomerakkude arengu ja funktsiooni ning immuunrakkude liikumisega (Monticelli jt., 2005, Ramkissoon jt., 2006, Neilson jt., 2007). Lisaks on miRNA-sid seostatud T-reg-ide regulatsioonihäirete, IFN- $\gamma$  sekretsiooni, Tc-rakkude autoreaktiivsuse ning erinevate autoimmuunhaigustega (Ogg jt, 1998; van den Wijngaard jt, 2000; van den Boorn jt, 2009, Harris jt, 2012; Gregg jt, 2010), mis kõik viitavad ka vitiliigo autoimmuunhaiguslikule olemusele.

Üks võimalikest põhjustest, miks T-rakkude regulatsioonis esinevad häired, on miR-181 perekonna liikmete alaekspressioon. Käesolevas töös detekteerisime mir-181a1 eellasmolekuli ja küpse miRNA miR-181a ekspressiooni languse vitiliigohaigete PBMC-des võrreldes kontrollrühma kuulujate rakkudega (graafik1, lk 29; tabel 7, lk 32). MiR-181a inhibeerimisel aktiveeritakse *PTEN* (Chen jt, 2004), mis on üheks miR-181a märklaudgeeniks. *PTEN* inhibeerib PI3k/AKT/mTOR rajas *AKT* geeni. *PTEN*-i aktiveerumisel suunatakse sihtmärkrakud mitokondriaalsele apoptoosirajale, mille peamiseks märklaudrakku elimineerivateks valkudeks on tsütokroom C ja kaspasid.

Lisaks on näidatud, et miR-181a puudusel suureneb autoantigene äratundvate T-rakkude hulk (Li jt, 2007; Ebert jt, 2009). Võimalik, et miR-181a puudusel on soodustatud protsess, mille käigus tuntakse autoreaktiivsete T-rakkude poolt ära melanotsüütide peptiidid ning pigmenti tootvad rakud eemaldatakse mitokondriaalse apoptoosiraja kaudu. Samuti on

teada, et psoriaasihaigetes on miR-181a ekspressioon maha reguleeritud, mis võib olla tingitud immuunrakkude migreerumisest põletikukoldesse (Sonolky jt, 2008). Varasemast on teada, et miR-181a on tugevalt ekspresseeritud B-rakkude varases arengus (Henao-Meija jt, 2013) ja miR-181a puudusel on see häirunud. See aga viitab asjaolule, et vigased B-rakud võivad registreerida melanotsüütide pinnavalke kui võõrantigeene, sekreteerides nendevastaseid antikehasid. Seetõttu peaks uurima edasi, mis on miR-181a täpsemad ülesanded immuunrakkudes ning millistes signaaliradades see molekul veel osaleb – miR-181a oleks üks võimalikest biomarkeritest vitiliigo patogeneesis.

Käesolevas töös uuriti ka mir-150 ekspressiooni, mis oli haigetes alla reguleeritud (tabel 7, lk 32). Kuna miR-150 inhibeerib varajast pro-B-rakkude arenemist pre-B-rakkudeks (Zhou jt, 2007), võib oletada, et naiivsete B-rakkude hulk on suurenenud. Lisaks sellele vastutab miR-150 B-rakkude küpsemise eest hilisemas faasis – pro-B-rakkude arenemist naiivseteks B-rakkudeks (Monticelli jt, 2005) ning miR-150 vaigistamine hiirtes suurendab antikehade hulka seerumis (Xiao jt, 2007). Kuna vitiliigohaigetes on mir-150 ekspressioon alla reguleeritud, siis võib see mõjutada B-rakkude küpsemist negatiivselt. On võimalik, et miR-150 alanenud ekspressioon mõjutab ka B-rakkude melanotsüütidevastaste autoantikehade tootmist.

MiR-17-92 defektsetes B-rakkudes esinevad arenguhäired (Xiao jt, 2008; Ventura jt, 2008; Mu jt, 2009), mis võib olla samuti üheks seletuseks, miks miR-17 puudusel tekivad melanotsüütidevastased antikehad. Kuna B-rakkude proliferatsioon ja areng on häiritud, mõjutab see nende võimet toota melanotsüütide peptiididevastaseid antikehi. Lisaks on miR-17 ja miR-19b peamised Th-rakkude bioloogiliste protsesside koordinaatorid, inhibeerides pro-apoptoosilisi valke kodeerivate geenide *PTEN* ja *BIM* ekspressiooni. Sellega soodustavad nad Th-rakkude proliferatsiooni ja IFN- $\gamma$  sekreteerimist, takistades rakkude apoptoosi ja indutseeritavate T-reg-ide (iT-reg) diferentseerumist (Jiang jt, 2011). Käesolevas uurimustöös tuvastati miR-17 ja miR-19b eellas- ja küpsete miRNA-de alaekspressioon vitiliigohaigetel (tabel 7, lk 32), mis võib olla seotud defektsete Th-rakkudega. Kuna Th-rakud vastutavad B-rakkude antikehade klassi vahetuse (ingl k *class switching*), Tc-rakkude aktivatsiooni ja kasvu ning fagotsüütide aktiveerimise eest (Abbas jt, 2012), on vitiliigohaigetel defektsete Th-rakkude tõttu negatiivselt mõjutatud ka teised immuunrakud. Seega miR-17 ja miR-19b ekspressiooni vähenemine haigete PBMC-des annab alust arvata, et häirunud Th-rakud soodustavad melanotsüütidevastast põletikureaktsiooni.

IFN- $\gamma$  on põletikku soodustav tsütokiin, mida sekreteeritakse NK- ja NKT-rakkude poolt kaasasündinud immuunvastusena ning T-rakkude poolt antigeenspetsiifilise immuunvastusena. Peamiseks sihtmärgiks on makrofaagid: IFN- $\gamma$  soodustab MHC I ja II (ingl k *Major histocompatibility complex I and II*) klassi molekulide ekspressiooni raku pinnal, antigeeni protsessimist ning esitlemist T-rakkudele (Abbas jt, 2012). Lisaks mõjutab IFN- $\gamma$  Th-rakkude proliferatsiooni. Varasemalt on leitud, et vitiliigohaigetel on IFN- $\gamma$  sekretsioon suurenenud (Reimann jt, 2012; van den Boorn jt, 2009). RNA-Seq tulemused näitasid, et miR-29a eellasmolekul on haiguste korral alla reguleeritud ning qRT-PCR kohaselt on ka küpse miRNA ekspressioonil tendents haige organismis langeda (tabel 7, lk 32). Varasematest katsetest on selgunud, et miR-29a sihtmärkgeeniks on IFN- $\gamma$  (Ma jt, 2011) ning miR-29a puudusel suureneb IFN- $\gamma$  sekretsioon, millega soodustatakse põletikku ning aktiveeritakse immuunsüsteemi rakud. See näitab, et meie praeguse töö tulemused on kooskõlas meie varasemate uuringutega.

Antud töö tulemused toetavad ka teisi varasemaid uuringuid, kus IFN- $\gamma$  sekretsiooni suurenemist seostatakse vitiliigo patogeneesiga (Gregg jt, 2010; Harris jt, 2012; Chatterjee jt, 2013). Harris jt katsetes hiirtega leiti, et depigmenteerumine väheneb, kui IFN- $\gamma$  neutraliseeritakse (Harris jt, 2012). Gregg jt (2010) töös hiirtega näidati, et IFN- $\gamma$  soodustab autoreaktiivsete T-rakkude kemokiinireseptorite ekspressiooni ning reguleerib sellega nende akumulereerumist naha põletikupiirkonda. IFN- $\gamma$  puudus vähendas hiirtel depigmenteerumist (Gregg jt, 2010). Nendes katsetest ja antud töö tulemusest võib järeldada, et nii IFN- $\gamma$  kui ka miR-29a omavad olulist rolli vitiliigo patogeneesis. Tulevikus võiks miR-29a uurimisele suuremat tähelepanu pöörata, et selgitada, kuidas see immuunrakke reguleerib, saamaks parema ülevaate selle rollist vitiligo patogeneesis.

Varasemalt on näidatud, et makrofaagi aktiveerumisel väheneb miR-223 hulk oluliselt (Li jt, 2010). Samas esinevad ka vastandlikud andmed miR-223 ekspressioonimustri kohta. On leitud, et miR-223 soodustab monotsüütide diferentseerumist makrofaagideks ning selle täielikul puudumisel suureneb morfoloogiliselt ja funktsionaalselt häirunud rakkude hulk, mis on keskkonnastiimulitele tundlikumad (Johnnidis jt, 2008). Lisaks on näidatud, et vitiliigohaigetel on tõusnud MIF (ingl k *Macrophage migration inhibitory factor*) – proapoptootiline lümfokiin, mis soodustab makrofaagide migratsiooni põletikukoldesse (Ma jt, 2013). Seda demonstreeris ka meie varasem WT RNA-seq uuring (Reimann jt, 2012). Käesolev töö näitas, et miR-223 on alla reguleeritud (tabel 7, lk 32), mis omakorda

viitab monotsüütide diferentseerumisele makrofaagideks ning MIF-i sekretsiooni tõus vitiliigohagetel viitab makrofaagide osalusele vitiliigo patogeneesis.

Lisaks patsientide ja kontrollrühmale vaadeldi käesolevas töös mehi ja naisi eraldi. Haigetel naistel olid miR-181a, miR-29a ja miR-150 ekspressioon võrreldes tervetega alla reguleeritud (graafik1, lk 28; graafik 5, lk 31; graafik 3, lk 29; tabel 7, lk 32. Kuna nende kolme miRNA ekspressiooni vähenemine on varem seostatud nii immuun- kui ka naharakkudega (Sonolky jt, 2008; Honda jt, 2013), siis võib antud tulemus viidata põletikureaktsioonile nahas. Sealjuures selgus ka see, et miR-150 ekspressioon PBMCdes oli tervetel naistel kõrgem kui tervetel meestel (graafik 3, lk 29; tabel 7, lk 32). Mir-29a ekspressioon PBMCdes on oli haigetel naistel madalam kui haigetel meestel. Nii miR-29a kui ka miR-150 madalat ekspressiooni on seostatud autoimmuunse haigusega (Honda jt, 2013) ning loomupäraselt on naistes nende ekspressioon kõrgem. Siis on võimalik, et mingil määral on naised tundlikumad selle muutuse ja võib-olla ka vitiliigo suhtes. Varasemalt on näidatud, kuidas meestel ja naistel esineb erinev miRNA-de ekspressioon näiteks rinnavähis (Pinto jt, 2013). Samas meie uuringus süviti vaadeldud geenide korral oli üldine tendents mõlemal sool sarnane.

Käesolevas töös kasutatud miRNA-d reguleerivad immuunrakke, samuti näitasid Shi jt, et miR-29a, miR-19b, miR-223 ning miR-150 ekspressioon on vitiliigohaigete PBMCdes erinev võrreldes tervetega (Shi jt, 2013). Nende tulemustest selgus, et nii miR-29a, miR-19b kui ka miR-223 on vitiliigohaigetes rohkem ekspresseerunud kui tervetes. Samas meie tulemustest selgus vastupidine efekt. Siiski nende järeldustest selgub, et miR-17-92 klaster aktiveerumisel suureneb IFN- $\gamma$  sekretsioon, mida meiegi järeldasime, kuid teise miR-29a alaekspressioonist. Varasemast kirjandusest on leitud, et miR-223 roll immuunrakkudele varieerub, näiteks põhjustab tema puudus nii leukeemiat kui ka makrofaagide aktivatsiooni (Fazi jt, 2005). Samas miR-150 ekspressioon on nii Shi jt (2013) kui ka käesoleva töö katses vitiliigohaigetes madalam võrreldes tervetega. Vasturääkivusi esineb, kuid miRNA-d on alles hiljuti avastatud molekulid ning kui üks miRNA mõjutab mitut geeni, siis mitu faktorit põhjustavad muutusi miRNA-de geenide ekspressioonis. Käesolevat uuringut tulemusi võiks valideerida mõne teise meetodiga, näiteks miRNA-Seq-ga samuti analüüsida täpsemalt lokaalset miRNA-de ekspressioonimustrit vitiliigohaigete nahas.

## KOKKUVÕTE

Käesolevas magistritöös analüüsiti vitiliigohaigete ja tervete indiviidide kontrollrühmas perifeerse vere mononukleaarsete rakkude miRNA-de ekspressioonis erinevusi. Kogu transkriptoomi RNA-Seq uuringus osales neli haiget ja kontrollrühmana neli tervet ning qRT-PCR uuringus üheksa haiget ning kontrollrühmana üheksa tervet. RNA-Seq-i tulemusena valiti 75 erinevalt ekspresseerunud pri-miRNA-st välja kuus immuunsüsteemi regulatsiooniga seotud geeni – *mir-181a*, *mir-223*, *mir-150*, *mir-19b*, *mir-29a* ja *mir-17*. Nende geenide küpsete miRNA molekulide ekspressioonimustrit uuriti qRT-PCR-ga.

Kõikidel uuritavatel pri-miRNA-del esineb statistiliselt oluline erinevus vitiliigohaigete ja tervete vahel. Võrreldes tervetega on haigetel kõik need kuus miRNA-d alla reguleeritud. Uuritud miRNA-de alaregulatsiooni seostatakse T- ja B-rakkude ning makrofaagide arengudefektide ning funktsiooni häirumisega. Uuritavad rakud on muutunud tundlikumaks erinevatele stiimulitele (nt autoantigeenid) ning reageerivad neile tugevamalt kui peaks. Lisaks immuunrakkude regulatsioonihäiretele leiti efektormolekulide sekretsiooni seos erinevate miRNA-dega, näiteks IFN- $\gamma$  ja miR-29a vahel. Haigetel on IFN- $\gamma$  sekretsioon suurenenud ning viitab aktiivsele põletikule. Samuti on miR-181a tase madalam, mis on sarnane psoriaasile ning viitab samuti immuunsüsteemi aktiivsusele. Saadud tulemused viitavad vitiliigo kui süsteemse haiguse olemusele.

Lisaks uuriti nende miRNA-de soost sõltuvat ekspressiooni. Leiti, et haigetel naistel oli miR-181a, miR-29a ja miR-150 ekspressioon tunduvalt madalam kui tervetel. MiR-150 oli tervetel naistel võrreldes tervete meestega üleekspresseerunud ning mir-29a alaekspresseerunud. Kuid üldiselt esines sarnane ekspressioon mõlemal, nii meestel kui ka naistel, mis toetab ka varasemaid uuringuid, kus on leitud, et meestel ja naistel esineb vitiliigo võrdse sagedusega (Alikhan jt, 2011).

Haiguste biomarkerid pakuvad efektiivsemaid ravivõimalusi ning võimalusel ka teadmisi haiguste ennetamiseks. Käesoleva töö põhjal tasub uuringuid jätkata miR-181a-ga. Selleks, et täpsemalt leida vitiliigo patogeneesil osalevaid miRNA-sid, tuleks lisaks PBMCdele uurida ka kahjustunud nahapiirkonnas olevate miRNA-de ekspressioonimustrit.

# **Immunesystem associated microRNA expression profile in vitiligo patients peripheral blood mononuclear cells**

Siiri Sarv

## **Summary**

Vitiligo is an acquired depigmentary skin disorder of unknown etiology. It occurs worldwide with an estimate prevalence of 0,5-2 % in most populations. Vitiligo can appear at any time, and it impairs the patients' quality of life. It has been associated with several and different diseases, including autoimmune psoriasis, systemic lupus erythematosus, Addison's disease and many more.

The aim of this study was to detect the potential microRNAs from PBMCs involved in the pathogenesis vitiligo and serve as novel biomarkers. For that the transcriptome of PBMCs of 4 vitiligo patients and 4 control subjects were analysed using the SOLiD System platform and whole transcriptome RNA sequencing application. We found 75 differently expressed pri-miRNA genes, from which we chose 6 for further analyzing – *mir-181a*, *mir-223*, *mir-150*, *mir-19b*, *mir-29a* and *mir-17*. We investigated mature microRNA expression in PBMCs of 9 vitiligo patients and 9 control subjects using quantitative real-time PCR.

RNA-Seq results – pri-miRNAs expression showed statistically significant downregulation in patient's groups PBMCs compared to normal group. Also, qRT-PCR analysis showed, that miR-181a regulates immune cells and downregulation of this microRNA may be involved with T -, B-cell and macrophages defects in maturation and function. All of which are involved in hypersensitivity to different stimuli such as autoantigens. These result indicates miR-181a possible involvement in vitiligo pathogenesis and could serve as a promising biomarker, it should be further analysed.

In this current research, we also investigated miRNA expression in different sex. It was shown that miR-181a, miR-29a, miR-150 was downregulated in vitiligo women compared to healthy female controls. MiR-150 was upregulated in healthy female compared to healthy men and mir-29a was downregulated in healthy female compared to vitiligo men. But the overall tendency showed no insignificant difference between sexes. To further

investigate the possible involvement of miRNAs in vitiligo pathogenesis, the next possible step would be to analyse the miRNA expression locally in skin samples.

In conclusion, current master's thesis demonstrated that some of our detected microRNAs are deregulated in PBMCs of vitiligo patients and with further analysis, may give knowledge on which mechanisms are involved in the vitiligo pathogenesis.

## **TÄNUAVALDUSED**

Kõige enam sooviksin tänada oma juhendajaid Ene Reimanni ja Riho Terast hea juhendamise eest. Soovin tänada dr. Külli Kingot Tartu Ülikooli Nahakliinikust, kes aitas koguda uuringus kasutatud vitiliigohaigete vere ja samuti vabatahtlikke. Lisaks tahan tänu avaldada õppetooli inimestele abivalmiduse eest ning kõigile teistele heade nõuannete, suure toetuse ja igakülgse abi eest.

## KASUTATUD KIRJANDUS

- Abbas, A.K. ja Lichtman, A.H. (2003). Cellular and Molecular Immunology 5th Edition.
- Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 124(4):783-801.
- Alikhan, A., Felsten, L.M., Daly, M., Petronic-Rosic, V. (2011). Vitiligo: a comprehensive overview Part I. Introduction, epidemiology, quality of life, diagnosis, differential diagnosis, associations, histopathology, etiology, and work-up. *J Am Acad Dermatol*. 65(3):473-491.
- Antiga, E., Quaglino, P., Bellandi, S. jt. (2010). Regulatory T cells in the skin lesions and blood of patients with systemic sclerosis and morphea. *Br J Dermatol*. 162:1056–1063.
- Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*. 115:199-208.
- Auffray, C., Sieweke, M.H., Geissmann, F. (2009). Blood Monocytes: Development, Heterogeneity, and Relationship with Dendritic Cells. *Annual Review of Immunology*. 27: 669–692.
- Baecher-Allan, C., Hafler, D.A. (2006). Human regulatory T cells and their role in autoimmune disease. *Immunol Rev*. 212:203-16.
- Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 116:281–297.
- Ben Ahmed, M., Zaraa, I., Rekik, R., Elbeldi-Ferchiou, A., Kourda, N., Belhadj Hmida, N., Abdeladhim, M., Karoui, O., Ben Osman, A., Mokni, M., Louzir, H. (2012). Functional defects of peripheral regulatory T lymphocytes in patients with progressive vitiligo. *Pigment Cell Melanoma Res*. 25(1):99-109.
- Bernard, F., Romano, A., Granel, B. (2010). Regulatory T cells and systemic autoimmune diseases: systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, primary Sjogren's syndrome. *Rev Med Interne*. 31:116–127.
- Boissy, R.E. ja Manga, P. (2004). On the etiology of contact/occupational vitiligo. *Pigment Cell Res*. 17(3):208-214.
- Bossi, G. ja Griffiths, G.M. (2005). CTL secretory lysosomes: biogenesis and secretion of a harmful organelle. *Seminars in Immunology*. 17:87-94.
- Bottero, V., Withoff, S., Verma, I.M. (2006). NF-kappaB and the regulation of hematopoiesis. *Cell Death Differ*. 13(5):785-97.
- Boyman, O., Letourneau, S., Krieg, C., Sprent, J. (2009). Homeostatic proliferation and survival of naive and memory T cells. *European Journal of Immunology*. 39:2088-2094.
- Cai, X., Hagedorn, C.H., Cullen, B.R. (2004). Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA*. 10:1957–1966.

- Caixia, T., Hongwen, F., Xiran, L. (1999). Levels of soluble interleukin-2 receptor in the sera and skin tissue fluids of patients with vitiligo. *J Dermatol Sci.* 21:59–62.
- Catalfamo, M. ja Henkart P.A. (2003). Perforin and the granule exocytosis cytotoxicity pathway. *Current Opinion in Immunology.* 15:522-527.
- Chatterjee, S., Eby, J.M., Al-Khami, A.A., Soloshchenko, M., Kang, H.K., Kaur, N., Naga, O.S., Murali, A., Nishimura, M.I., Le Poole, I.C., Mehrotra, S. (2014). A quantitative increase in regulatory T cells controls development of vitiligo. *J Invest Dermatol.* 134(5):1285-94.
- Chaulk, S.G., Thede, G.L., Kent, O.A., Xu, Z., Gesner, E.M., Veldhoen, R.A., Khanna, S.K., Goping, I.S., MacMillan, A.M., Mendell, J.T., Young, H.S., Fahlman, R.P., Glover, J.N. (2011). Role of pri-miRNA tertiary structure in miR-17~92 miRNA biogenesis. *RNA Biol.* 8(6):1105-1114.
- Chen, C.Z., Li, L., Lodish, H.F., Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science.* 303:83–86.
- Chendrimada, T.P., Gregory, R.I., Kumaraswamy, E., Norman, J., Cooch, N. jt. (2005). TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature.* 436:740–744.
- Cheng, A.M., Byrom, M.W., Shelton, J., Ford, L.P. (2005). Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis. *Nucleic Acids Res.* 33:1290-1297.
- Chi, L.J., Wang, H.B., Wang, W.Z. (2008). Impairment of circulating CD4+ CD25+ regulatory T cells in patients with chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *J Peripher Nerv Syst.* 13:54–63.
- Chong, M.M., Rasmussen, J.P., Rudensky, A.Y., Littman, D.R. (2008). The RNaseIII enzyme Drosha is critical in T cells for preventing lethal inflammatory disease. *J Exp Med.* 205(9):2005-2017.
- Coelho, P.C., Morgado, F., Reis, P., De Queiroz, M.V. (1996). Facioscapulohumeral dystrophy with myositis associated with rheumatoid arthritis. *Clin. Rheumatol.* 15: 185–188.
- Cullen, B.R. (2006). Viruses and microRNAs. *Nat Genet.* 38(1): S25–30.
- Curtale, G., Curtale, G., Citarella, F., Carissimi, C., Goldoni, M., Carucci, N., jt. (2010). An emerging player in the adaptive immune response: microRNA-146a is a modulator of IL-2 expression and activation-induced cell death in T lymphocytes. *Blood.* 115:265–273.
- Cvetanovich, G.L., Hafler, D.A. (2012). Human regulatory T cells in autoimmune diseases *Curr Opin Immunol.* 22(6):753-60.
- Dai, Y., Huang, Y.S., Tang, M., Lv, T.Y., Hu, C.X., Tan, Y.H., Xu, Z.M., Yin, Y.B. (2007). Microarray analysis of microRNA expression in peripheral blood cells of systemic lupus erythematosus patients. *Lupus.* 16(12):939-946.

- de Kouchkovsky, D., Esensten, J. H., Rosenthal, W. L., Morar, M. M., Blueston, J. A., Jeker, L. T. (2013). miR-17~92 regulates interleukin-10 production by Tregs and control of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 191(4):1594-1605.
- Denli, A.M., Tops, B.B., Plasterk, R.H., Ketting, R.F., Hannon, G.J. (2004). Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature.* 432:231–235.
- Ebert, P.J., Jiang, S., Xie, J., Li, Q.J., Davis, M.M. (2009). An endogenous positively selecting peptide enhances mature T cell responses and becomes an autoantigen in the absence of microRNA miR-181a. *Nature Immunol.* 10:1162–1169.
- Ezzedine, K., Lim, H.W., Suzuki, T., Katayama, I., Hamzavi, I., Lan, C.C., Goh, B.K., Anbar, T., Silva de Castro, C., Lee, A.Y., Parsad, D., Van Geel, N., Le Poole, I.C., Oiso, N., Benzekri, L., Spritz, R., Gauthier, Y., Hann, S.K., Picardo, M., Taieb, A. (2012). Revised classification/nomenclature of vitiligo and related issues: the Vitiligo Global Issues Consensus Conference. *Pigment Cell Melanoma Res.* 25(3):E1-13
- Farrokhi, S., Farsangi-Hojjat, M., Noohpishch, M.K., Tahmasbi, R., Rezaei, N. (2005). Assessment of the immune system in 55 Iranian patients with vitiligo. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 19:706–711.
- Fazi, F., Rosa, A., Fatica, A., Gelmetti, V., De Marchis, M. L., Nervi, C. Bozzoni, I. (2005). A minicircuitry comprised of microRNA-223 and transcription factors NFI-A and C/EBP $\alpha$  regulates human granulopoiesis. *Cell.* 123:819–831.
- Forstemann, K., Tomari, Y., Du, T., Vagin, V.V., Denli, A.M. jt. (2005). Normal microRNA maturation and germ-line stem cell maintenance requires Loquacious, a double-stranded RNA-binding domain protein. *PLoS Biol.* 3:e236.
- Gadhamsetty, S., Marée, A.F., Beltman, J.B., de Boer, R.J. (2014). A general functional response of cytotoxic T lymphocyte-mediated killing of target cells. *Biophys J.* 106(8):1780-1791.
- Gauthier, Y., Cario André, M., Taieb, A. (2003). A critical appraisal of vitiligo etiologic theories: is melanocyte loss a melanocytorrhagy. *Pigment Cell Res.* 16:322-332.
- Gawkrodger, D.J., Ormerod, A.L., Shaw, L., Mauri-Sole, I., Whitton, M.E., Watts, M.J., Anstey, A.V., Ingham, J., Young, K. (2008). Guideline for the diagnosis and management of vitiligo. *Br J Dermatol.* 159:1051–1076.
- Geissmann, F., Manz, M.G., Jung, S., Sieweke, M.H., Merad, M., Ley, K. (2010). Development of Monocytes, Macrophages, and Dendritic Cells. *Science.* 327:656-661.
- Germain, R.N. (1994). MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell.* 76:287–299.
- Gibcus, J.H., Tan, L.P., Harms, G., Schakel, R.N., de Jong, D., Blokzijl, T., Moller, P., Poppema, S., Kroesen, B.J., van den Berg, A. (2009). Hodgkin lymphoma cell lines are characterized by a specific miRNA expression profile. *Neoplasia.* 11(2):167-176.
- Gilchrist, B.A., Blog, F.B., Szabo, G. (1979). Effects of aging and chronic sun exposure on melanocytes in human skin. *J Invest Dermatol.* 73:141–143.

- Goodnow, C.C., Vinuesa, C.G., Randall, K.L., Mackay, F., Brink, R. (2010). Control systems and decision making for antibody production. *Nature Immunology*. 11:681-688.
- Gordon, S. (2002). Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell*. 111(7):927-930.
- Gregg, R.K., Nichols, L., Chen, Y., Lu, B., Engelhard, V.H. (2010). Mechanisms of spatial and temporal development of autoimmune vitiligo in tyrosinase-specific TCR transgenic mice. *J Immunol*. 184(4):1909-17.
- Gregory, R.I., Yan, K.P., Amuthan, G., Chendrimada, T., Doratotaj, B. jt. (2004). The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*. 432:235–240.
- Griffiths-Jones, S. (2004). The microRNA Registry. *Nucleic Acids Res*. 32:D109–111.
- Griffiths-Jones, S. (2006). miRBase: the microRNA sequence database. *Methods Mol Biol*. 342:129–138.
- Grimes, P.E., Morris, R., Avaniss-Aghajani, E., Soriano, T., Meraz, M., Metzger, A. (2004). Topical tacrolimus therapy for vitiligo: Therapeutic responses and skin mes- senger RNA expression of proinflammatory cytokines. *J Am Acad Dermatol*. 51:52–61.
- Guo, H., Ingolia, N.T., Weissman, J.S., Bartel, D.P. (2010). Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature*. 466(7308):835-40.
- Hann, S.K. ja Nordlund, J.J. (2000). Clinical features of generalized vitiligo. In: Hann, S.K., Nordlund, J.J., eds. *Vitiligo*. Oxford: Blackwell Science Ltd. 35–48.
- Hara, I., Takechi, Y., Houghton, A.N. (1995). Implicating a role for immunorecognition of self in tumor rejection: passive immunization against the brown locus protein. *J Exp Med*. 182:1609–1614.
- Hardy, R.R. (2006). B-1 B cell development. *Journal of Immunology*. 176:2749-2754.
- Harning, R., Cui, J., Bystry, J.C. (1991). Relation between the incidence and level of pigment cell antibodies and disease activity in vitiligo. *J Invest Dermatol*. 97(6):1078-1080.
- Harris, J.E., Harris, T.H., Weninger, W., Wherry, E.J., Hunter, C.A., Turka, L.A. (2012). A mouse model of vitiligo with focused epidermal depigmentation requires IFN- $\gamma$  for autoreactive CD8<sup>+</sup> T-cell accumulation in the skin. *J Invest Dermatol*. 132(7):1869-76.
- Haynes, C.M. ja Ron, D., (2010). The mitochondrial UPR — protecting organelle proteiin homeostasis. *J Cell Sci*. 123:3849–3855.
- He, L., Thomson, J.M., Hemann, M.T., Hernando-Monge, E., Mu, D., Goodson, S., Powers, S., Cordon-Cardo, C., Lowe, S.W., Hannon, G.J., and Hammond, S.M. (2005). A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature*. 435:828–833.
- Henao-Mejia, J., Williams, A., Goff, L.A., Staron, M., Licona-Limón, P., Kaech, S. M. jt. (2013). The MicroRNA miR-181 Is a Critical Cellular Metabolic Rheostat Essential for

NKT Cell Ontogenesis and Lymphocyte Development and Homeostasis. *Immunity*. 38:984–997.

Honda, N., Jinnin, M., Kira-Etoh, T., Makino, K., Kajihara, I., Makino, T., Fukushima, S., Inoue, Y., jt. (2013). miR-150 down-regulation contributes to the constitutive type I collagen overexpression in scleroderma dermal fibroblasts via the induction of integrin  $\beta$ 3. *Am J Pathol*. 182(1):206-16.

Huffaker, T.B., Hu, R., Runtsch, M.C., Bake, E., Chen, X., Zhao, J., Round, J.L., Baltimore, D., O'Connell, R.M. (2012). Epistasis between MicroRNAs 155 and 146a during T Cell-Mediated Antitumor Immunity. *Cell Rep*. 2:1697–1709.

Huggins, R.H., Schwartz, R.A. ja Janniger, C.K. (2005). Vitiligo. *Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat*. 14(4):137-142, 144-145.

Izcue, A., Coombes, J.L., Powrie, F. (2006). Regulatory T cells suppress systemic and mucosal immune activation to control intestinal inflammation. *Immunol Rev*. 212:256–271.

Jameson, C.S. (2002). Maintaining the norm: T-cell homeostasis. *Nat Rev Immunol*. 2:547–556.

Janeway, C.A.Jr., Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*. 20:197-216.

Jean, S., Bideau, C., Bellon, L., Halimi, G., De Meo, M., Orsiere, T., Dumenil, G., Berge-Lefranc, J.-L., Botta, A. (2001). TH expression of genes induced in melanocytes by exposure to 365-nm UVA: Study by cDNA arrays and real-time quantitative RT-PCR. *Biochim Biophys Acta*. 1522:89–96.

Jeannin, P., Jaillon, S., Delneste, Y. (2008). Pattern recognition receptors in the immune response against dying cells. *Curr Opin Immunol*. 20(5):530-537.

Jenkins, M.K., Chu, H.H, McLachlan, J.B., Moon, J.J. (2010). On the composition of the pre-immune repertoire of T cells specific for peptide-major histocompatibility complex ligands. *Annual Review of Immunology*. 28:275-294.

Ji, J., Yamashita, T., Budhu, A., Forgues, M., Jia, H.L., Li, C., Deng, C., Wauthier, E., Reid, L.M., Ye, Q.H., Qin, L.X., Yang, W., Wang, H.Y., Tang, Z.Y., Croce, C.M., Wang, X.W. (2009). Identification of microRNA-181 by genome-wide screening as a critical player in EpCAM-positive hepatic cancer stem cells. *Hepatology*. 50(2):472-480.

Jiang, S., Li, C., Olive, V., Lykken, E., Feng, F., Sevilla, J., Wan, Y., He, L., Li, Q.J. (2011) Molecular dissection of the miR-17-92 cluster's critical dual roles in promoting Th1 responses and preventing inducible Treg differentiation. *Blood*. 118(20):5487-97.

Jin, Y., Birlea, S.A., Fain, P.R., Ferrara, T.M., Ben, S., Riccardi, S.L., Cole, J.B., Gowan, K., Holland, P.J., Bennett, D.C., jt. (2012). Genome-wide association analyses identify 13 new susceptibility loci for generalized vitiligo. *Nat Genet*. 44: 676–680.

Johnnidis, J. B. jt. (2008). Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by microRNA-223. *Nature*. 451:1125–1129.

- Kemp, E.H., Waterman, E.A., Weetman, A.P. (2001). Autoimmune aspects of vitiligo. *Autoimmunity*. 34(1):65-77.
- Khvorova, A., Reynolds, A., Jayasena, S.D. (2003). Functional siRNAs and miRNAs
- Kim, N., Kim, M., Yun, S., Doh, J., Greenberg, P.D., Kim, T.D., Choi, I. (2014). MicroRNA-150 regulates the cytotoxicity of natural killers by targeting perforin-1. *J Allergy Clin Immunol*.
- Kim, V.N. (2004). MicroRNA precursors in motion: exportin-5 mediates their nuclear
- Kim, V.N., Han, J., Siomi, M.C. (2009). Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 10(2):126–139.
- Kingo, K., Philipisa, M. A., Aunin, E., Luuka, H., Karelson, M., Rätsep, R., Silm, H., Vasar, E., Kõks. (2006). MYG1, novel melanocyte related gene, has elevated expression in vitiligo. *Journal of Dermatological Science*. 44, 119-122.
- Kippenberger, S., Bernd, A., Loitsch, S., Muller, J., Guschel, M., Kaufmann, R. (1999). Cyclic stretch up-regulates proliferation and heat shock protein 90 expression in human melanocytes. *Pigment Cell Res*. 12:246–251.
- Klarquist, J., Denman, C.J., Hernandez, C., Wainwright, D.A., Strickland, F.M., Overbeck, A., Mehrotra, S., Nishimura, M.I., Le Poole, I.C. (2010). Reduced skin homing by functional Treg in vitiligo. *Pigment Cell Melanoma Res*. 23(2):276-86.
- Koca, R., Armutcu, F., Altinyazar, H.C., Gürel, A. (2004). Oxidant-antioxidant enzymes and lipid peroxidation in generalized vitiligo. *Clin. Exp. Dermatol*. 29(4):406-9.
- Kostopoulou, P., Jouary, T., Quintard, B., Ezzedine, K., Marques, S., Boutchnei, S., Taieb, A. (2009). Objective vs. subjective factors in the psychological impact of vitiligo: the experience from a French referral centre. *Br J Dermatol*. 1(1):128-133
- Kuchen, S., Resch, W., Yamane, A., Kuo, N., Li, Z., Chakraborty, T., Wei, L., Laurence, A., Yasuda, T., Peng, S., Hu-Li, J., Lu, K., Dubois, W., Kitamura, Y., Charles, N., Sun, H.W., Muljo, S., Schwartzberg, P.L., Paul, W.E., O'Shea, J., Rajewsky, K., Casellas, R. (2010) Regulation of microRNA expression and abundance during lymphopoiesis. *Immunity*. 32(6):828-39.
- Landthaler, M., Yalcin, A., Tuschl, T. (2004). The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and its *D. melanogaster* homolog are required for miRNA biogenesis. *Curr Biol*. 14:2162–2167.
- Le Poole, I.C., Van den Wijngaard, R.M., Westerhof, W., Das, P.K. (1996). Presence of T cells and macrophages in inflammatory vitiligo skin par- allels melanocyte disappearance. *Am J Pathol*. 148:1219–1228.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L., Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell*. 75:843-854.

- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Rådmark, O., Kim, S. ja Kim, V.N. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*. 425:415-419.
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.-H., Lee, S., Baek, S.H., Kim, V.N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*. 23:4051-4060.
- Levitsky, J. (2011). Operational tolerance: past lessons and future prospects. *Liver Transpl*. 17(3):222-232.
- Li, H., Yang, R., Fan, X., Gu, T., Zhao, Z., Chang, D. (2012). MicroRNA array analysis of microRNAs related to systemic scleroderma. *J Clin Immunol*. 32:514-522.
- Li, Q.J., jt. (2007). miR-181a Is an Intrinsic Modulator of T Cell Sensitivity and Selection. *Cell*. 129:147–161.
- Liston, A., Lu, L.F., O’Carroll, D., Tarakhovsky, A., Rudensky, A.Y. (2008). Dicer-dependent microRNA pathway safeguards regulatory T cell function. *J Exp Med*. 205: 1993–2004.
- Liu, K. ja Nussenzweig, M.C. (2010). Origin and Development of Dendritic Cells. *Immunological Reviews*. 234:45–54.
- Lu, J., Getz, G., Miska, E.A. jt. (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*. 435:834–838.
- Lu, L.F., Boldin, M.P., Chaudhry, A., Lin, L.L., Taganov, K.D., Hanada, T. jt. (2010). Function of miR- 146a in controlling Treg cell-mediated regulation of Th1 responses. *Cell*. 142:914–929.
- Lu, L.F., Thai, T.H., Calado, D.P., Chaudhry, A., Kubo, M., Tanaka, K. jt. (2009). Foxp3-dependent microRNA155 confers competitive fitness to regulatory T cells by targeting SOCS1 protein. *Immunity*. 30:80–91.
- Lu, T.X., Munitz, A., Rothenberg, M.E. (2009). MicroRNA-21 is up-regulated in allergic airway inflammation and regulates IL-12p35 expression. *J Immunol*. 182:4994–5002.
- Ma, F., Xu, S., Liu, X., Zhang, Q., Xu, X., Liu, M., Hua M., Li, N., Yao, H., Cao, X. (2011). The microRNA miR-29 controls innate and adaptive immune responses to intracellular bacterial infection by targeting interferon- $\gamma$ . *Nat Immunol*. 12(9):861-869.
- Mahoney, J.A., Rosen, A. (2005). Apoptosis and autoimmunity. *Curr Opin Immunol*. 17:583-588.
- Makunin, I.V., Pheasant, M., Simons, C., Mattick, J.S. (2007). Orthologous microRNA genes are located in cancer-associated genomic regions in human and mouse. *PLoS ONE*. 2:e1133.
- Malumbres, R., Sarosiek, K.A., Cubedo E. jt. (2009). Differentiation stage-specific expression of microRNAs in B lymphocytes and diffuse large B-cell lymphomas. *Blood*. 113(16):3754–3764.

- Mansuri, M.S. jt. (2014). miRNA profiling revealed differentially expressed miRNA signatures from skin of non-segmental vitiligo patients. *Br J Dermatol...*
- Mashayekhi, V., Javidi, Z., Kiafar, B., Manteghi, A.A., Saadatian, V., Esmaeili, H.A., Hosseinalizadeh, S. (2010). Quality of life in patients with vitiligo: a descriptive study on 83 patients attending a PUVA therapy unit in Imam Reza Hospital, Mashad. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 76(5):592.
- Maurer, B., Stanczyk, J., Jüngel, A., Akhmetshina, A., Trenkmann, M., Brock, M., Kowal-Bielecka, O., Gay, R.E., Michel, B.A., Distler, J.H., Gay, S., Distler, O. (2010). MicroRNA-29, a key regulator of collagen expression in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 62(6):1733-1743.
- McHeyzer-Williams, L.J. ja McHeyzer-Williams, M.G. (2005). Antigen-specific memory B cell development. *Annual Review of Immunology.* 23:487-513.
- Mehrotra, S., Al-Khami, A.A., Klarquist, J., Husain, S., Naga, O., Eby, J.M., Murali, A.K., Lyons, G.E., Li, M., Spivey, N.D., Norell, H., Martins da Palma, T., Onicescu, G., Diaz-Montero, C.M., Garrett-Mayer, E., Cole, D.J., Le Poole, I.C., Nishimura, M.I. (2012). A coreceptor-independent transgenic human TCR mediates anti-tumor and anti-self immunity in mice. *J Immunol.* 189(4):1627-1638.
- Mellman, I. ja Steinman, R. M. (2001). Dendritic Cells: Specialized and Regulated Antigen Processing Machines. *Cell.* 106:255–258
- Meyskens, F.L. Jr., McNulty, S.E., Buckmeier, J.A., Tohidian, N.B., Spillane, T.J., Kahlon, R.S., Gonzalez, R.I. (2001). Aberrant redox regulation in human metastatic melanoma cells compared to normal melanocytes. *Free Radic Biol Med.* 31(6):799-808.
- Monticelli, S., Ansel, K.M., Xiao, C., Socci, N.D., Krichevsky, A.M., Thai, T.H., Rajewsky, N., Marks, D.S., Sander, C., Rajewsky, K., Rao, A., Kosik, K.S. (2005). MicroRNA profiling of the murine hematopoietic system. *Genome Biol.* 6(8):R71.
- Moretti, S., (2002). New insights into the pathogenesis of vitiligo: imbalance of epidermal cytokines at sites of lesions. *Pigment Cell Res.* 15(2):87-92.
- Mosenson, J.A., Eby, J.M., Hernandez, C., Le Poole, I.C.(2013). A central role for inducible heat-shock protein 70 in autoimmune vitiligo. *Exp Dermatol.* 22(9):566-9.
- Mouchacca, P., Schmitt-Verhulst, A.M., Boyer, C. (2013). Visualization of cytolytic T cell differentiation and granule exocytosis with T cells from mice expressing active fluorescent granzyme B. *PLoS One.* 8(6):e67239.
- Mu, P., Han, Y.C., Betel, C., Yao, E., Squatrito, M., Ogdowski, P., de Stanchina, E., jt. (2009). Genetic dissection of the miR-17~92 cluster of microRNAs in Myc-induced B-cell lymphomas. *Genes and Development.* 23(24):2806–2811.,
- Murphy, K.M., Reiner, S.L. (2002). The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol.* 2(12):933-44.

- Naughton, G.K., Eisinger, M., Bystryn, J.C. (1983). Antibodies to normal human melanocytes in vitiligo. *J Exp Med.* 158:246–251.
- Neilson, J.R., Zheng, G.X., Burge, C.B., Sharp, P.A. (2007). Dynamic regulation of miRNA expression in ordered stages of cellular development. *Genes Dev.* 21(5):578-89.
- Niimoto, T., Nakasa, T., Ishikawa, M., Okuhara, A., Izumi, B., Deie, M., Suzuki, O., Adachi, N., Ochi, M. (2010). MicroRNA-146a expresses in interleukin-17 producing T cells in rheumatoid arthritis patients. *BMC Musculoskelet Disord.* 11:209.
- O'Connell, R.M., Rao, D.S., Chaudhuri, A.A., Baltimore, D. (2010). Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. *Nat Rev Immunol.* 10(2):111-22.
- Ogg, G.S., Rod Dunbar, P., Romero, P., Chen, J.L., Cerundolo, V. (1998). High frequency of skin-homing melanocyte-specific cytotoxic T lymphocytes in autoimmune vitiligo. *J Exp Med.* 188: 1203–1208.
- Olive, V., Bennett, M.J., Walker, J.C. Ma, C., Jiang, I., Cordon-Cardo, C., Li, Q.J., jt. (2009). miR-19 is a key oncogenic component of mir-17-92. *Genes and Development.* 23(24):2839–2849.
- Ongenaes, K., Van Geel, N., Naeyaert, J.M. (2003). Evidence for an autoimmune pathogenesis of vitiligo. *Pigment Cell Res.* 16(2):90-100.
- Ortonne, J.-P., Bose, S.K. (1993). Vitiligo: where do we stand? *Pigment Cell Res.* 6:61–72.
- Ouyang, W., Kolls, J.K., Zheng, Y. (2008). The Biological Functions of T Helper 17 Cell Effector Cytokines in Inflammation. *Immunity.* 28(4):454-467.
- Oyarbide-Valencia, K., van den Boorn, J.G., Denman, C.J. jt. (2006). Therapeutic implications of autoimmune vitiligo T cells. *Autoimmun Rev.* 5:486–492.
- Pauley, K.M., Cha, S., Chan, E.K. (2009). MicroRNA in autoimmunity and autoimmune diseases. *J Autoimmun.* 32(3-4):189-194.
- Pauley, K.M., Chan, E.K. (2008). MicroRNAs and their emerging roles in immunology. *Ann N Y Acad Sci.* 1143:226-239.
- Pellegrino, M.W., Nargund, A.M., Haynes, C.M. (2013). Signaling the mitochondrial unfolded protein response. *Biochim Biophys Acta.* 1833:410–416.
- Picardo, M. ja Taieb, A. (2010). Vitiligo. 1st ed, Heidelberg: Springer. 486.
- Pinto, R., Pilato, B., Ottini, L., Lambo, R., Simone, G., Paradiso, A., Tommasi, S. (2013). Different methylation and microRNA expression pattern in male and female familial breast cancer. *J Cell Physiol.* 228(6):1264-9.
- Pivarcsi, A., Meisgen, F., Xu, N., Stahle, M., Sonkoly, E. (2013). Changes in the level of serum microRNAs in patients with psoriasis after antitumour necrosis factor- a therapy. *Br J Dermatol.* 169:563–570.

- Porter, J.R., Beuf, A.H., Lerner, A.B., Nordlund, J.J. (1990). The effect of vitiligo on sexual relationship. *J Am Acad Dermatol.* 22:221–222.
- Ramkisson, S.H., Mainwaring, L.A., Ogasawara, Y., Keyvanfar, K., McCoy, J.P. Jr., Sloand, E.M., Kajigaya, S., Young, N.S. (2006) Hematopoietic-specific microRNA expression in human cells. *Leuk. Res.* (5):643-7.
- Reimann, E., Kingo, K., Karelson, M., Reemann, P., Loite, U., Sulakatko, H., Keermann, M., Raud, K., Abram, K., Vasar, E., Silm, H., Kõks, S. (2012). The mRNA expression profile of cytokines connected to the regulation of melanocyte functioning in vitiligo skin biopsy samples and peripheral blood mononuclear cells. *Hum Immunol.* 73(4):393-8.
- Reimann, E., Kingo, K., Karelson, M., Reemann, P., Vasar, E., Silm, H., Kõks S. (2014). Whole Transcriptome Analysis (RNA Sequencing) of Peripheral Blood Mononuclear Cells of Vitiligo Patients. *Dermatopath.* 1:11–23.
- Reinhart, B.J., Slack, F.J., Basson, M., Pasquinelli, A.E., Bettinger, J.C., jt. (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 403:901–906.
- Robinson, M.D., Smyth, G.K. (2008). Small-sample estimation of negative binomial dispersion, with applications to SAGE data. *Biostatistics.* 9:321–332.
- Rusca, N., jt. (2012). miR-146a and NF-kappaB1 Regulate Mast Cell Survival and T lymphocyte Differentiation. *Mol Cell Biol.* 32:4432–4444.
- Rätsep, R., Kingo, K., Karelson, M., Reimann, E., Raud, K., Silm, H. jt. (2008). Gene expression study of IL-10 family genes in vitiligo skin biopsies, peripheral blood mononuclear cells and sera. *Br J Dermatol.* 159:1275–1281.
- Sallusto, F., Geginat, J., Lanzavecchia, A. (2004). Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annual Review of Immunology.* 22:745-763.
- Schallreuter, K.U., Bahadoran, P., Picardo, M., Slominski, A., Ellassiuty, Y.E., Kemp, E.H., jt. (2008). Vitiligo pathogenesis: autoimmune disease, genetic defect, excessive reactive oxygen species, calcium imbalance, or what else? *Exp Dermatol.* 17(2):139-140.
- Schluns, K.S., Lefrançois, L. (2003). Cytokine control of memory T-cell development and survival. *Nat Rev Immunol.* 3(4):269-79.
- Schwarz, D.S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., Zamore, P.D. (2003).
- Schwartz, R.H. (2012). Historical overview of immunological tolerance. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1:4(4).
- Selva-O’Callaghan, A., Labrador-Horrillo, M., Gallardo, E., Herruzo, A., Grau-Junyent, J.M., Vilardell-Tarres, M. (2006). Muscle inflammation, autoimmune Addison’s disease and sarcoidosis in a patient with dysferlin deficiency. *Neuromuscul Disord;* 16: 208–209.

- Serbina, N.V., Jia, T., Hohl, T.M., Pamer, E.G. (2008). Monocyte-Mediated Defense Against Microbial Pathogens. *Annu Rev Immunol.* 26:421-52
- Shalhaf, M., Gibbons, N.C., Wood, J.M., Maitland, D.J., Rokos, H., Elwary, S.M., Marles, L.K., Schallreuter, K.U. (2008). Presence of epidermal allantoin further supports oxidative stress in vitiligo. *Exp Dermatol.* 17(9):761-70.
- Shi, Y.L., Weiland, M., Li, J., Hamzavi, I., Henderson, M., Huggins, R.H., Mahmoud, B.H., Agbai, O., Mi, X., Dong, Z., jt. (2013). MicroRNA expression profiling identifies potential serum biomarkers for non-segmental vitiligo. *Pigment Cell Melanoma Res.* 26: 418–421.
- Shi, Y.L., Weiland, M., Lim, H.W., Mi, Q.S., Zhou, L. (2014). Serum miRNA expression profiles change in autoimmune vitiligo in mice. *Exp Dermatol.* 23(2):140-2.
- Shivdasani, R.A. (2006). MicroRNAs: regulators of gene expression and cell differentiation. *Blood.* 108:3646–3653.
- Singh, S., Singh, U., Pandey, S.S. (2012). Serum concentration of IL-6, IL-2, TNF- $\alpha$ , and IFN $\gamma$  in Vitiligo patients. *Indian J Dermatol.* 57(1):12-4.
- Sonkoly, E., Stähle, M., Pivarcsi, A. (2008). MicroRNAs: novel regulators in skin inflammation. *Clin Exp Dermatol.* 33(3):312-315.
- Spritz, R.A. (2013). Modern vitiligo genetics sheds new light on an ancient disease. *J Dermatol.* 40(5):310-8.
- Steitz, J., Wenzel, J., Gaffal, E., Tüting, T. (2004). Initiation and regulation of CD8+T cells recognizing melanocytic antigens in the epidermis: implications for the pathophysiology of vitiligo. *Eur J Cell Biol.* 83(11-12):797-803.
- Zhao, J.L., jt. (2011). NF-kappaB dysregulation in microRNA-146a-deficient mice drives the development of myeloid malignancies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108:9184–9189.
- Zhou, B., Wang, S., Mayr, C., Bartel, D.P., Lodish, H.F. (2007). miR-150, a microRNA expressed in mature B and T cells, blocks early B cell development when expressed prematurely. *Proc Natl Acad Sci USA.* 104:7080–7085.
- Zhou, X., Jeker, L.T., Fife, B.T., Zhu, S., Anderson, M.S., McManus, M.T., Bluestone, J.A.. (2008). Selective miRNA disruption in T reg cells leads to uncontrolled autoimmunity. *J Exp Med.* 205:1983–1991.
- Taganov, K.D., Boldin, M.P., Chang, K.J., Baltimore, D. (2006). NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(33):12481-12486.
- Taieb, A. ja Picardo, M. (2009). Clinical practice. Vitiligo. *N Engl J Med.* 360(2):160-169.

- Taieb, A., Alomar, A., Böhm, M., Dell'anna, M.L., De Pase, A., Eleftheriadou, V., Ezzedine, K., jt. (2013). Guidelines for the management of vitiligo: the European Dermatology Forum konsensus. *Br J Dermatol.* 168(1):5-19.
- Takahashi, A., Masuda, A., Sun, M., Centonze, V.E., Herman, B. (2004). Oxidative stress-induced apoptosis is associated with alterations in mitochondrial caspase activity and Bcl-2-dependent alterations in mitochondrial pH (pHm). *Brain Res Bull.* 62:497-504.
- Takechi, Y., Hara, I., Naftzger, C., Xu, Y., Houghton, A.N. (1996). A melanosomal membrane protein is a cell surface target for melanoma therapy. *Clin Cancer Res.* 2:1837–1842.
- Takeuchi, O. ja Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell.* 140(6):805-820.
- Théry, C., Zitvogel, L., Amigorena, S. (2002). Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol.* 2:569-579.
- Toosi, S., Orlow, S.J., Manga, P. (2012). Vitiligo-inducing phenols activate the unfolded protein response in melanocytes resulting in upregulation of IL6 and IL8. *J Invest Dermatol.* 132(11):2601-9.
- Van den Boorn, J.G., Konijnenberg, D., DelleMijn, T.A., Van der Veen, J.P., Bos, J.D., Melief, C.J., Vyth-Dreese, F.A., Luiten, R.M. (2009). Autoimmune destruction of skin melanocytes by perilesional T cells from vitiligo patients. *J Invest Dermatol.* 129(9):2220-32.
- Van den Boorn, J.G., Picavet, D.I., Van Swieten, P.F., Van Veen, H.A., Konijnenberg, D., Van Veelen, P.A., Van Capel, T., Jong, E.C., Reits, E.A., Drijfhout, J.W., Bos, J.D., Melief, C.J., Luiten, R.M. (2011). Skin-depigmenting agent monobenzone induces potent T-cell autoimmunity toward pigmented cells by tyrosinase haptentation and melanosome autophagy. *J Invest Dermatol.* 131(6):1240-51.
- Van den Wijngaard, R.M.J., Anna, W.-K., Le Poole, C., (2000). Local immune response in skin of generalized vitiligo patients. Destruction of melanocytes is associated with the prominent presence of CLA+ T cells at the perilesional site. *Lab Invest.* 80:1299–1309.
- Wan, Y.Y., Flavell, R.A. (2009). How diverse – CD4 effector T cells and their functions. *J Mol Cell Biol.* 1(1):20-36.
- Wang, K.Y., Wang, K.H., Zhang, Z.P. (2010). Health-related quality of life and marital quality of vitiligo patients in China. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 25(4):429-435.
- Ventura, A., Young, A.G., Winslow, M.M., Lintault, L., Meissner, A., Erkeland, S.J., Newman, J., Bronson, R.T., Crowley, D., Stone, J.R., Jaenisch, R., Sharp, P.A., Jacks, T. (2008). Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters. *Cell.* 132(5):875-886.

Westendorp, R.G., Langermans, J.A., Huizinga, T.W., Verweij, C.L., Sturk, A. (1997). Genetic influence on cytokine production and fatal meningococcal disease. *Lancet*. 349: 170-173.

Wightman, B., Ha, I., Ruvkun, G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*. 75:855–862.

Von Andrian, U.H. ja Mackay, C.R. (2000). T-cell function and migration. *New England Journal of Medicine*. 343:1020-1034.

Wu, H. jt. (2007). miRNA profiling of naive, effector and memory CD8 T cells. *PLoS ONE*. 2:e1020.

Xiao, C., Srinivasan, L., Calado, D.P., Patterson, H.C., Zhang, B., Wang, J., Henderson, J.M., Kutok, J.L., Rajewsky, K. (2008). Lymphoproliferative disease and autoimmunity in mice with increased miR-17-92 expression in lymphocytes. *Nature Immunol*. 9:405–414.

Xiao, C., Calado, D.P., Galler, G., Thai, T.H., Patterson, H.C., Wang, J., Rajewsky, N., Bender, T.P., Rajewsky, K. (2007) MiR-150 controls B cell differentiation by targeting the transcription factor c-Myb. *Cell*. 131(1):146-59.

Xiao, C., jt. (2008). Lymphoproliferative disease and autoimmunity in mice with increased miR-17-92 expression in lymphocytes. *Nat Immunol*. 9:405–414.

Xu, P., Guo, M., Hay, B.A. (2004). MicroRNAs and the regulation of cell death. *Trends Genet*. 20:617-624.

Yang, L., jt. (2012). miR-146a controls the resolution of T cell responses in mice. *J Exp Med*. 209:1655–1670.

Yi, R., Qin, Y., Macara, I.G., Cullen, B.R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev*. 17(24):3011-3016.

**Kasutatud veebiaadressid:**

[http://www.targetscan.org/vert\\_50/](http://www.targetscan.org/vert_50/)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/406995>

[http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna\\_entry.pl?acc=MI0000289](http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0000289)

## LIHTLITSENTS

Mina,

SIIRI SARV (28.01.1989),

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Immuunsüsteemiga seotud mikroRNAd ekspressioon vitiliigohaigete perifeerse vere mononukleaarsetes rakkudes“,

mille juhendajaks on PhD, ENE REIMANN,

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 punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 26.05.2014