

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

MEDITSIINITEADUSTE VALDKOND
BIO- JA SIIRDEMEDITSIINI INSTITUUT
RNA BIOLOOGIA UURIMISGRUPP

RNA modifikatsiooni ac4C roll inimese epidermaalsete keratinotsüütide rakulises

vastuses

Magistritöö

30 EAP

Valeria Naumova

Juhendaja PhD Pavel Kudrin

TARTU 2025

“RNA modifikatsiooni ac4C roll inimese epidermaalsete keratinotsüütide rakulises vastuses”

RNA reguleerib raku funktsioone ja geneetilise info ülekannet, kusjuures RNA keemilised modifikatsioonid, nagu N4-atsetüültsütidin (ac4C), mille katalüüsijaks on ensüüm NAT10, mõjutavad oluliselt erinevaid rakulisi protsesse. ac4C on seotud translatsiooni, proliferatsiooni ja põletikuvastase regulatsiooniga. Psoriaas on krooniline põletikuline nahahaigus, mille patogeneesis osalevad aktiivselt epidermaalsed keratinotsüüdid ning põletikulised signaalirajad nagu NF- κ B ja JAK-STAT. Käesoleva magistritöö eesmärk oli uurida RNA modifikatsiooni ac4C ja selle ainsa teadaoleva ensüümi NAT10 võimalikku rolli inimese epidermaalsete keratinotsüütide (NHEK) põletikulistes protsessides, keskendudes eelkõige psoriaasi arengule. Magistritöö tulemused näitasid, et psoriaasi korral on *NAT10* ekspressioon suurenenud ja selle vaigistamine mõjutab JAK-STAT ja NF- κ B signaaliradasid ning vähendab rakkude jagunemise ja keratinotsüütide proliferatsiooniga seotud geenide ekspressiooni.

Märksõnad: ac4C, NAT10, psoriaas, NF- κ B, JAK-STAT

CERCS kood: B220 Geneetika, tsütogeneetika; B500 Immunoloogia, seroloogia, transplantoloogia

“The role of RNA modification ac4C in the cellular response of human epidermal keratinocytes”

RNA regulates cellular functions and the transfer of genetic information. Chemical modifications, such as N4-acetylcytidine (ac4C), which is added by the enzyme NAT10, significantly influence cellular processes. ac4C is associated with translation, cell proliferation, and anti-inflammatory regulation. Psoriasis is a chronic inflammatory skin disease in which epidermal keratinocytes and inflammatory signaling pathways such as NF- κ B and JAK-STAT play a central role in its pathogenesis. The aim of this master's thesis was to investigate the potential role of the RNA modification ac4C and its sole known enzyme, NAT10, in the inflammatory responses in human epidermal keratinocytes (NHEK), with a focus on the development of psoriasis. The results showed that *NAT10* expression is increased in psoriasis, and its silencing affects the JAK-STAT and NF- κ B pathways and reduces the expression of genes related to cell division and keratinocyte proliferation.

Keywords: ac4C, NAT10, psoriasis, NF- κ B, JAK-STAT

CERCS code: B220 Genetics, cytogenetics; B500 Immunology, serology, transplantation

SISUKORD

SISUKORD.....	3
KASUTATUD LÜHENDID.....	5
SISSEJUHATUS.....	9
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	10
1.1 RNA ja RNA modifikatsioonid.....	10
1.1.1 N6-metüüladenosiin (m6A).....	11
1.1.2 Pseudouridiin (Ψ).....	11
1.1.3 N7-metüülguanosiin (m7G).....	12
1.1.4 Riboosiosa modifikatsioonid.....	13
1.2 N4-atsetüültsütidiin (ac4C).....	14
1.3 N-atsetüültransferaas 10 (NAT10).....	15
1.4 Naha ehitus ja immunoloogia.....	19
1.4.1 Psoriaas.....	20
1.4.2 NF-κB ja JAK-STAT signaalirajad.....	23
2. EKSPERIMENTAALOSA.....	27
2.1 Töö eesmärgid.....	27
2.2 Materjal ja meetodika.....	27
2.2.1 Rakukultuur.....	27
2.2.2 NAT10 siRNA transfektsioon NHEK rakkudesse.....	28
2.2.3 NHEK rakkude stimulatsioon Polü(I:C), IFNγ ja IL-17A-ga.....	28
2.2.4 NHEK rakkude elulemuse hindamine.....	29
2.2.5 RNA eraldamine ja RT-qPCR mRNA ekspressiooni analüüsimiseks.....	29
2.2.6 RNA sekveneerimine.....	30
2.2.7 <i>Western blot</i> intratsellulaarsete valkude analüüsimiseks.....	30
2.2.8 <i>North-Western blot</i>	32
2.3 Tulemused.....	33
2.3.1 <i>NAT10</i> mRNA suhteline ekspressioon on kõrgenenud psoriaasi korral.....	33
2.3.2 <i>NAT10</i> vaigistamine mõjutab stimuleeritud keratinotsüütide elulemust.....	33
2.3.3 <i>NAT10</i> vaigistamine vähendab viirusvastust Polü(I:C)-stimulatsiooni tingimustes.....	35
2.3.4 <i>NAT10</i> vaigistamine suurendab psoriaasiga seotud tsütokiinide ekspressiooni...37	
2.3.5 <i>NAT10</i> vaigistamine suurendab JAK-STAT signaaliraja negatiivsete regulaatorite ekspressiooni.....	40
2.3.6 Geeniekspressiooni muutuste analüüs RNA sekveneerimise andmete põhjal.....	41
2.3.7 <i>NAT10</i> vaigistamine toetab klassikalise ja häirib alternatiivse NF-κB signaaliraja valkude ekspressiooni.....	46
2.4 Arutelu.....	49
KOKKUVÕTE.....	52
SUMMARY.....	53
KIRJANDUSE LOETELU.....	54
KASUTATUD VEEBIAADRESSID.....	71
LISAD.....	72

KASUTATUD LÜHENDID

ac4C – N4-atstüültsütidiin

Ac-CoA – atsetüülkoensüüm A

ALKBH5 – alkB homoloog 5

BAFFR – B-raku aktiveerimisfaktori retseptor

BSA – veise seerumalbumiin

CaCl₂ – kaltsiumkloriid

CARD14 – kaspaaside meelitamise domeeni sisaldav valk 14

CCK8 – rakulugemis komplekt 8

CCL – C-C motiiviga kemokiini ligand

CD – diferentseerumisklaster

cDNA – komplementaarne DNA

CDS – kodeeriv järjestus

CXCL – C-X-C motiiviga kemokiini ligand

DMSO – dimetüülsulfoksiid

eEF1A – eukarüoodi translatsiooni elongatsiooni faktor 1 alfa

FTO – rasvamassiga ja rasvumisega seotud valk

GAPDH – glütseraldehyüd-3-fosfaatdehüdrogenaas

GNAT – Gcn5-seotud N-atsetüültransferaas

HAT – histooni atsetüültransferaas

HCT116 – inimese kolorektaalse kartsinoomi rakud

HeLa – emakakaela vähi rakud

HIV – inimese immuunpuudulikkuse viirus

HPV – inimese papilloomiviirus

HrP – mädarõika peroksüdaas

hTERT – inimese telomeraasi pöördtranskriptaas

hTR – inimese telomeraasi RNA

IFI16 – interferoon gammaga indutseeritav valk 16

IFN γ – interferoon gamma

IFITM1 – interferooniga indutseeritud transmembraanne valk 1

IgG – immunoglobuliin G

IKK – I κ B kinaas

IL – interleukiin

JAK – Janus kinaas

kDa – kilodalton

KEGG – Kyoto geenide ja genoomide entsüklopeedia
KGM-3 – keratinotsüütide kasvusööde 3
KSHV – Kaposi sarkoomiga seotud herpesviirus
lncRNA – pikk mittekodeeriv RNA
LT β R – lümfotoksiin- β retseptor
MDM2 – E3 ubikvitiin-ligaas
METTL3/14/16 – metüültransferaasilaadne 3/14/16
miRNA – mikro RNA
mRNA – informatsiooni RNA
m6A – N6-metüüladenosiin
m5C – 5-metüültsütosiin
m7G – N7-metüülguanosiin
NAT10 – N-atsetüültransferaas 10
NaOAc – naatriumatsetaat
ncRNA – mittekodeeriv RNA
NF- κ B – tuuma faktor kappa beeta
NF71 – NickFect 71
NFKBIA – NF- κ B inhibiitor alfa
NHEK – inimese epidermaalsed keratinotsüüdid
NIK – NF- κ B-indutseeriv kinaas
Nm – 2'-O-metüülatsioon
NOP58 – nukleolaarne valk 58
NSUN2 – Myc-indutseeritud SUN domeeni sisaldav valk
OCT4 – oktameer-seonduv transkriptsioonifaktor 4
p53 – tuumorsupressor valk p53
PAN RNA – polüadenüleeritud RNA
PBS – fosfaatpuhverdatud füsioloogiline lahus
PIAS – aktiveeritud STAT-i valguline inhibiitor
Polü(I:C) – polüinosiin:polütsütidinhape
PRR – mustreid äratundvad retseptorid
PSORS2 – psoriaasi vastuvõtlikkuse lookus 2
PUS – pseudouridiini süntaas
PVDF – polüvinüülidendifluoriid
RAM – RNA modifikatsiooni aktiveerija
RANK – tuumafaktori κ B retseptori aktivaator

RBM15/15B – RNA-d siduva motiiviga valk 15/15B
RluA – RNA pseudouridiin süntaas L-1
RNMT – RNA metüültransferaas
RNP – ribonukleoproteiin
rRNA – ribosomaalne RNA
RsuA – RNA pseudouridiin süntaas A
RT-qPCR – reaallaja kvantitatiivne PCR
SARS-CoV2 – raske ägeda respiratoorse sündroomi koroonaviirus 2
SDS – naatriumdodetsüülsulfaat
siRNA – väike vaigistatav RNA
SIRT7 – Sirtuin 7
snoRNA – väike tuumakeste RNA
snoRNP – väike tuumakestega seotud ribonukleoproteiin
snRNA – väike tuuma RNA
SOCS1-3 – tsütokiini signaali supressorvalk 1-3
STAT1-6 – signaali edasikandev ja transkriptsiooni aktiveeriv valk 1-6
ZC3H13 – tsink-sõrme CCCH-tüüpi sisaldav valk 13
TEMED – tetrametüül-etüleen-diamiin
Th1/17– abistaja T-rakk 1/17
THUMP1 – THUMP domeeni sisaldav valk 1
TNF- α – vähi nekroosi faktor alfa
tRNA – transpordi RNA
TruA/B/D – tRNA pseudouridiin süntaas A/B/D
TRUB1 – tRNA uridiini 5-karboksümetüül-aminometüül modifikatsioon 1
TYK – türosiini kinaas
U – uridiin
UTR – transleerimata ala
VIRMA – Vir-laadne m6A metüültransferaasiga seotud valk
WB – *Western Blot*
WDR4 – WD kordusdomeen 4
WT – metsiktüüp
WTAP – Wilmsi tuumori 1-ga seonduv valk
 Ψ – pseudouridiin

SISSEJUHATUS

RNA on raku geneetilise informatsiooni edastamise ja funktsioonide reguleerimise keskne komponent, mille tähtsust organismi arengus, tasakaalu säilitamises ja haigusprotsessides on viimastel aastakümnetel järjest enam teadvustatud (Mattick, 2004). Üha rohkem tähelepanu on pööratud RNA modifikatsioonidele, mis võivad oluliselt mõjutada RNA sünteesi, transporti, funktsiooni ja metabolismi (Roundtree jt., 2017). Üks oluline RNA modifikatsioon on N⁴-atsetüültsütidiin (ac4C), mis osaleb translatsiooni, rakkude jagunemise ja kasvajate arengu reguleerimises (Arango jt., 2018; Chen jt., 2022; Huang jt., 2020). N-atsetüültransferaas (NAT10) on praeguseks teadaolevalt peamine ensüüm, mis vahendab ac4C lisamist RNA-le (Arango jt., 2018). Lisaks on NAT10 oluline nii DNA kahjustuste parandamisel kui ka telomeraasi funktsiooni regulatsioonis (Fu ja Collins, 2007; Liu jt., 2007).

Inimese nahk on keha suurim organ, mis täidab füüsilise ja immunoloogilise barjääri funktsiooni (Chuong jt., 2002; Richmond ja Harris, 2014). Enamasti täidavad selle funktsiooni naha epidermises olevad keratinotsüüdid, mis vastusena välismõjudele sekreteerivad proinflammatoorseid molekule ja meelitavad immuunsüsteemi rakke (Albanesi jt., 2005). Psoriaas on põletikuline nahahaigus, mida iseloomustab keratinotsüütide hüperprolifereerumine, diferentseerumise häired ja kaasasündinud immuunvastuse aktiveerumine ning muutused omandatud immuunsuses (Griffiths ja Barker, 2007; Eberle jt., 2016). Psoriaasi arengus mängivad olulist rolli NF- κ B ja JAK-STAT signaalirajad, mille düsregulatsioon toob kaasa põletikuliste tsütokiinide suurenenud ekspressiooni, mis omakorda süvendab kroonilist põletikku (Griffiths ja Barker, 2007). Kuigi psoriaasi on uuritud põhjalikult, pole selle kulgemise molekulaarmehhanismid lõpuni selged. Kasvav huvi RNA modifikatsioonide, eriti ac4C vastu, on avanud uusi võimalusi mõista, kuidas see võib mõjutada põletikulisi signaaliradu ja keratinotsüütide käitumist psoriaasi patogeneesis, eriti arvestades asjaolu, et olemasolevad ravimid ei ole piisavalt efektiivsed, et ravida psoriaasi lõplikult (*Mayo Clinic* (i.a)).

Käesolev magistritöö on valminud Tartu Ülikooli biomeditsiini õppekava raames. Töö eksperimentaalne osa tehti Tartu Ülikooli meditsiiniteaduste valdkonnas, bio- ja siirdemeditsiini instituudis, RNA bioloogia uurimisrühmas. Magistritöö üldine eesmärk oli uurida RNA modifikatsiooni ac4C võimalikku rolli inimese epidermaalsete keratinotsüütide rakulises vastuses, keskendudes spetsiifiliselt psoriaasi patogeneesile ja peamistele signaaliradadele nagu NF- κ B ja JAK-STAT.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 RNA ja RNA modifikatsioonid

Nukleiinhapped avastas Friedrich Miescher juba 1869. aastal, kuid kuni 1950. aastateni kestis vaidlus, kas pärilikkuse kandja on DNA, RNA või valgud (Dahm, 2008). RNA-d peeti ebastabiilseks ja liiga lihtsaks molekuliks, et selgitada elu evolutsiooni, mistõttu selle uurimine jäi piiratuks kuni 1970. aastateni. Samas oli juba teada, et RNA vahendab geneetilise informatsiooni ülekannet DNA-st valgudesse (Woese, 1967; Jeffares jt., 1998). 1977. aastal selgus, et RNA ei ole pelgalt DNA koopiat, vaid seda saab splaissida ja ümber järjestada, luues erinevaid isovorme (Chow jt., 1977).

RNA modifitseerimine on protsess, mille käigus RNA molekulid läbivad keemilisi muutusi, nagu keemiliste rühmade lisamine alusele või suhkrule, samuti nukleotiidide isomerisatsioon, deamineerimine ja muud struktuurimuutused (Grosjean, 2005; Jackman ja Alfonzo, 2013). See protsess toimub kõigis elusorganismides ja on üks RNA-de evolutsiooniliselt kõige säilitatumaid omadusi (Song jt., 2012). Esimese RNA modifikatsioon, pseudouridiin (Ψ), avastati 1960. aastal (Cohn, 1960). Ψ on uridiini isomeer, mida leidub sageli erinevat tüüpi RNA-des ja mis on oluline komponent nii ribosomaalses RNA-s (rRNA) kui transpordi RNA-s (tRNA) (Cohn, 1960). Samuti leiti, et 5' *cap* ja 3' polü(A) RNA modifikatsioonide olemasolu eristab eukarüootset informatsiooni RNA-d (mRNA-d) prokarüootsest mRNA-st (Holtkamp jt., 2006). Lisaks nendele leiti veel kümme erinevat RNA modifikatsiooni, kui sekveneeriti esimene tRNA 1965. aastal (Holley jt., 1965). Need uuringud näitasid, et RNA-s toimub palju erinevaid modifitseerimisi, mis reguleerivad erinevaid funktsioone rakkudes – RNA sünteesi, transporti, funktsiooni ja metabolismi (Cui jt., 2022). Vastavalt MODOMICS andmebaasile, praegu on teada 335 RNA modifikatsiooni, kuid nende täpne hulk ja tähtsus jäävad veel uurimata (*Modomics*, (i.a)).

Keskendudes spetsiifilistele RNA lämmastikaluste modifikatsioonidele, saab neid liigitada selle järgi, milline lämmastikalus on modifitseeritud. Kodeeriva ja mittekodeeriva RNA kõige levinumad puriin- või pürimidiinaluse modifikatsioonid on metüleerimine, pseudouridinileerimine, adenosiini muutmine inosiiniks ja atsetüleerimine (Wiener ja Schwartz, 2021). Käesolevas magistritöös keskendutakse mRNA modifikatsioonidele.

1.1.1 N6-metüüladenosiin (m6A)

Adenosiini kõige levinum modifikatsioon on N6-metüüladenosiin (m6A), mis moodustab umbes 0,4% kõigist adenosiinidest (Meyer ja Jaffrey, 2014). m6A on peamiselt leitud mRNA-l, kuid praeguseks on seda tuvastatud peaaegu igat tüüpi RNA-del (Liu ja Pan, 2016; Shi jt., 2019). m6A modifikatsiooni asetamist katalüüsivad metüültransferaaside kompleksid (nimetatakse ka m6A kirjutajateks), mis koosnevad katalüütilisest ja struktuursest subühikust, kusjuures nii metüültransferaasilaadne 3 (METTL3) kui ka metüültransferaasilaadne 14 (METTL14) kuuluvad katalüütilise subühiku koosseisu (Jia jt., 2011; Wang jt., 2016). METTL3 oli esimene avastatud m6A metüültransferaas ning see mängib peamist katalüütilist rolli m6A lisamisel RNA-le (Yue jt., 2015). METTL14 seondub otseselt METTL3-ga, moodustades stabiilse heterodimeeri ning see aitab lokaliseerida METTL3 RNA-dele, suurendades seeläbi katalüütilist efektiivsust (Liu jt., 2014). Struktuurne subühik koosneb Wilmsi tuumori 1-ga seonduvast valgust (WTAP), Vir-laadne m6A metüültransferaasiga seotud valgust (VIRMA), tsink-sõrme CCCH-tüüpi sisaldava valgust 13 (ZC3H13), HAKAI ja RNA-d siduva motiiviga valgust 15/15B (RBM15/15B). Need valgud on olulised kirjutaja kompleksi stabiilsuse, funktsionaalsuse, lokaliseerimise ja spetsiifilisuse säilitamiseks (Bawankar jt., 2021; Ping jt., 2014; Yue jt., 2018; Knuckles jt., 2018). Viimasel ajal on esile tulnud ka metüültransferaasilaadne 16 (METTL16), mis eelistatult lokaliseerub tsütoplasmasse ja soodustab mRNA translatsiooni (Su jt., 2022).

Lisaks m6A kirjutajatele on olemas ka m6A demetülaasid (nimetatakse ka m6A kustutajateks), mis eemaldavad m6A modifikatsiooni RNA-st. Esimesena kirjeldati m6A demetülaas FTO, ehk rasvamassiga ja rasvumisega seotud valk (Jia jt., 2011). Teine oluline demetülaas on alkB homoloog 5 (ALKBH5), mis mõjutab mRNA eksporti ja RNA metabolismi, vähendades m6A tasemeid (Zheng jt., 2013). m6A mõju rakkudes väljendub eelkõige nn m6A lugejate kaudu, mis määravad selle funktsiooni rakkudes. Lugejad suudavad ära tunda ja seonduda m6A-modifitseeritud transkriptiga ja reguleerivad geeniekspressiooni, mõjutades mRNA stabiilsust, lokaliseerumist, splaissimist ja translatsiooni efektiivsust (Zhao jt., 2014; Xiao jt., 2016; Wang jt., 2015).

1.1.2 Pseudouridiin (Ψ)

Kõige levinum uridiini (U) modifikatsioon on pseudouridiin (Ψ) ehk 5-ribosüüluratsiil. Ψ on U isomeer, kus uratsiil on ühendatud süsinik-süsinik sideme asemel lämmastik-süsinik glükosiidsidemega (Becker jt., 1997). Ψ avastati esmalt struktuursetes RNA-des (tRNA, rRNA ja väike tuuma RNA (snRNA)) (Davis ja Allen, 1957). Kuigi üldiselt esineb Ψ kõigis

elu kolmes fülogeneetilises domeenis, avastati alles 2014. aastal, et see modifikatsioon on laialt levinud ka mRNA-s (Charette ja Gray, 2000; Carlile jt., 2014).

Ψ süntees RNA-s toimub kahe erineva mehhanismi kaudu. Enamik rakus leiduvast Ψ -st, mis esineb rRNA-des ja teatud snRNA-des, lisatakse väikeste tuumakestega seotud ribonukleoproteiinide (snoRNP-de) vahendusel. Selle protsessi juhib aluspaardumine H/ACA tüüpi väike tuumakeste-RNA (snoRNA) kasti ja siht-RNA vahel (Borchardt jt., 2020). Teine mehhanism põhineb pseudouridiini süntaaside (PUS) toimele, mille kaudu Ψ lisatakse RNA-le ilma suunava snoRNA osaluseta (Charette ja Gray, 2000). Inimrakkudes kuuluvad need ensüümid kuute erinevasse perekonda: tRNA pseudouridiin süntaasid (TruA, TruB, TruD), RNA pseudouridiin süntaas A (RsuA), RNA pseudouridiin süntaas L-1 (RluA) ja Pus10 (Hamma ja Ferré-D'Amaré, 2006). Siiski on RsuA-tüüpi PUS-id seni leitud ainult bakterites, samas kui Pus10 ensüüme esineb mõnedes arhede liikides ja eukarüootides (Watanabe ja Gray, 2000). Pärmis on leitud, et peamised PUS ensüümid, mis lisavad Ψ mRNA-dele, on PUS1 ja PUS7, samas kui inimestel vastutavad selle eest lisaks ka PUS-i hulka kuuluv tRNA uridiini 5-karboksümetüül-aminometüül modifikatsioon 1 (TRUB1) ensüüm (Carlile jt. 2014; Li jt. 2015; Safra jt. 2017).

Ψ mõju rakkudele avaldub näiteks selles, et see parandab translatsiooni käigus tRNA molekulide koostoimeid rRNA ja mRNA-ga. Nimelt on antikoodoni lingus olev Ψ kriitilise tähtsusega tRNA-de korrektseks sidumiseks ribosoomiga (Gustilo, 2009). mRNA-s olevad Ψ -jäädid võivad mõjutada stoppkoodonite spetsiifilisust, mis tähendab, et U \rightarrow Ψ modifikatsioon aitab vähendada varajase stoppkoodoni mõju. Selle tagajärjel jätkub translatsioon ja sünteesitakse täispikk valk, hoolimata mutatsioonist (Adachi jt., 2019). Lisaks Ψ on aktiivsel kasutusel farmakoloogias, kus teda ja tema derivaati N1-metüülpseudouridiini pannakse mRNA vaktsiinide sisse U-de asemele (Kariko jt., 2008). Heaks näiteks on raske ägeda respiratoorse sündroomi koroonaviiruse 2 (SARS-CoV2) vastane vaktsiin, kus N1-metüülpseudouridiinid suurendavad vaktsiini stabiilsust ja samal ajal vähendavad RNA-vastast immuunvastust (*European Medicines Agency Assessment Report on Comirnaty*, (i.a)).

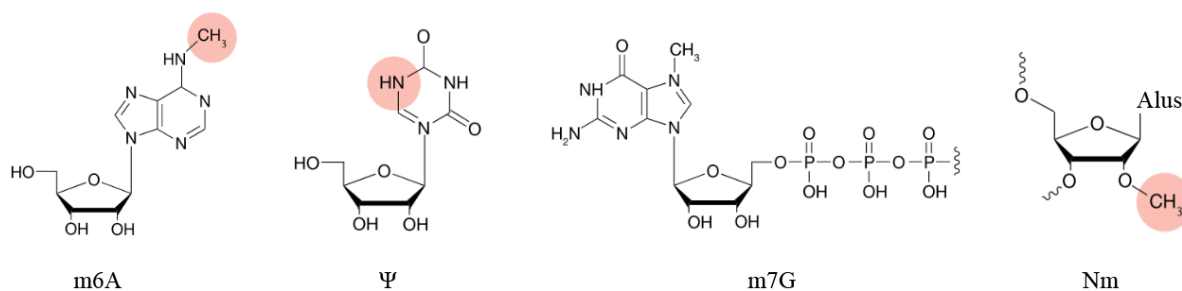
1.1.3 N7-metüülguanosiin (m7G)

Guanosiini kõige levinum modifikatsioon on N7-metüülguanosiin (m7G) (Lin jt., 2018). m7G modifikatsioonid jaotatakse kaheks peamiseks tüübiks vastavalt nende asukohtadele: mRNA 5'-terminaalses osas olev m7G-müts (5' *cap*) ja sisemine m7G modifikatsioon (Ramanathan

jt., 2016). Sisemine m7G modifikatsioon on levinud teistes RNA tüüpides, näiteks tRNA-s, rRNA-s, mikro RNA-s (miRNA) ja pikkades mittekodeerivates RNA-des (lncRNA) (Jühling jt., 2009; Pandolfini jt., 2019). Kõige paremini uuritud m7G kirjutajad on METTL1 ja WD kordusdomeen 4 (WDR4), mis moodustavad kompleksi, et katalüüsida m7G modifikatsiooni erinevates RNA-des (Alexandrov jt., 2002). See kompleks on hädavajalik mRNA täpse translatsiooni jaoks, nimelt METTL1/WDR4 kompleksi puudumine hiire embrüonaalsetes tüvirakkudes häirib oluliselt rakutsükli ja proliferatsiooni, mõjutades tRNA funktsiooni ja mRNA-de translatsiooni (Lin jt., 2018). Lisaks soodustab METTL1/WDR4 kompleks miRNA biogeneesi, lisades m7G modifikatsiooni esmase miRNA transkriptile (Pandolfini jt., 2019). RNA metüültransferaas (RNMT) ja RNA modifikatsiooni aktiveerija (RAM) on samuti olulised m7G katalüüsi regulaatorid, kuna teevad koostööd m7G-modifitseeritud 5' *cap*-i sünteesimisel mRNA-s. See modifikatsioon kaitseb mRNA-d eksonukleasidest lagundamise eest ning mõjutab RNA töötlemist, transporti ja translatsiooni (Bueren-Calabuig jt., 2019).

1.1.4 Riboosiosa modifikatsioonid

Eelnevad peatükid keskendusid lämmastikaluste modifikatsioonidele, kuid esinevad ka riboosiosa modifikatsioonid, mis on keemiliselt vähem mitmekesised. Sellest hoolimata riboosi 2'-OH rühma metüleerimine 2'-O-metüülriboosiks (Nm, kus N tähistab ükskõik millist nukleotiidi) on iseloomulik modifikatsioon mRNA-s ja paljudes mittekodeerivates RNA-des (ncRNA), sealhulgas tRNA-s, rRNA-s ja väikeses vaigistavas RNA-s (siRNA) (Motorin ja Helm, 2011). Mitmed uuringud on näidanud Nm modifikatsiooni tähtsust RNA puhul, näiteks 2'-OH rühmal on oluline roll kõrgema järgu RNA struktuuride moodustumisel, ning selle metüleerimine võib oluliselt mõjutada RNA-valgu interaksioone ja RNA sekundaarstruktuure (Kurth ja Mochizuki, 2009; Yildirim jt., 2014). Samuti suurendab riboosi metüleerimine RNA stabiilsust, kaitstes seda nukleasidest põhjustatud hüdrolyüüsi eest, kuna aktiivne 2'-OH rühm jääb isoleerituks (Sharma jt., 2017).



Joonis 1. RNA modifikatsioonide keemilised struktuurid. Joonisel on näidatud kõik neli modifikatsiooni, mis on kirjeldatud Peatükis 1.1 Kirjanduse Ülevaates. Kanonilistele nukleotiididele lisatud või isomeriseeritud keemilised rühmad on näidatud roosa värviga. Joonis on kohandatud Zaccara jt., (2019) järgi.

1.2 N4-atsetüültsütidiin (ac4C)

Eelmises peatükis käsitleti RNA modifikatsioonide liigitamist vastavalt modifitseeritud lämmastikalusele. Selles peatükis keskendutakse tsütosiini modifikatsioonidele, eelkõige N4-atsetüültsütidiinile (ac4C), mis on antud magistritöö peamine uurimisteema. Atsetüleerimine on üldiselt hästi uuritud rakuline mehhanism, mis kontrollib geeniekspressiooni, eriti histoonide kontekstis (Bannister ja Kouzarides, 2011). Kuigi RNA atsetüleerimise kohta on kirjandust vähem kui valkude atsetüleerimise kohta, on leitud, et see mehhanism on hästi konserveerunud kõigis elu domeenides (Arango jt., 2018). RNA atsetüleerimise mehhanismidest on kõige paremini iseloomustatud ensümaatilise modifikatsioon, mille tulemusena moodustub atsetüleeritud nukleotiid ac4C (Sas-Chen jt., 2020). Kuna ac4C on hästi konserveerunud, leidub seda nii eukarüootide kui ka prokarüootide RNA-s, nagu tRNA, rRNA ja mRNA. Esmakordselt tuvastati see tRNA-des (Zachau ja Feldmann, 1966) ja rRNA-des (täpsemalt 18S rRNA-des, Thomas jt., 1978), hiljem ka mitmetes mRNA-des (Arango jt., 2018). Paljud uuringud on rõhutanud RNA ac4C modifikatsiooni olulist rolli translatsiooni regulatsioonis, mis on võtmetähtsusega raku funktsioneerimisel ja tervise säilitamisel, näiteks Kumbhar jt., (2013) uuring näitas, et ac4C esinemine tRNA-del soodustab valkude täpset translatsiooni.

ac4C modifikatsioon on samuti oluline rRNA-des translatsiooni efektiivsuse tagamiseks, kuna Sharma jt., (2015) avastasid kaks ac4C asukohta 18S rRNA-s poolduvas pärmis (*germinated fission yeast*) ja inimese kolorektaalse kartsinoomi rakkudes (HCT116), mis on tähtsad väikeste ribosoomide subühikute sünteesiks, kuigi rRNA atsetüleerimine ei ole otseselt vajalik ribosoomide biogeneesiks. Enamik varasemaid ac4C uuringuid keskendusid tRNA-de ja rRNA-de modifikatsioonidele, kuid hiljuti on avastatud, et ac4C modifikatsioone esineb ka inimese ja pärmi mRNA-des (Tardu jt., 2019). Näiteks Arango jt., (2018) näitasid, et emakakaela vähi rakkude (HeLa) puhul ac4C modifikatsioon on laialdaselt esindatud mRNA kodeerivates järjestustes (CDS), suurendades elongatsiooni efektiivsust ja seeläbi parandades interaktsiooni tRNA-ga. Samal ajal, 5' transleerimata ala (UTR) atsetüleerimine pärsib translatsiooni initsiatsiooni (Arango jt., 2022). Kuna mRNA stabiilsuse vähenemine võib avalduda translatsiooni efektiivsuse vähenemisel ja vastupidi, leidsid Arango jt., (2018) et ac4C-ga modifitseeritud mRNA-d omavad pikemat poolestusaja kestust võrreldes teiste transkriptidega.

Kui rõhutada ac4C rolli mitte ainult molekulaarsel tasandil, vaid ka rakulisel tasandil, siis ac4C modifikatsioon on kriitiline rakkude paljunemise, kasvu ja diferentseerumise

protsessides, mõjutades geenide avaldumist nii mRNA kui ka valgu tasemel suunates seeläbi rakkude kasvu ja arengut (Luo jt., 2023). Näiteks on leitud, et sugurakkudes mängib ac4C olulist rolli rakkude jagunemises. Nimelt, meeste sugurakkude meiosis põhjustab ac4C puudus tõsiseid meioosihäireid, takistades kromosoomide paaritumist ja DNA katkestuste parandamist (Chen jt., 2022). ac4C modifikatsioon mängib rolli ka rakkude diferentseerumises, soodustades või pärssides seda. Näiteks kiirendab ac4C Gremlin 1 mRNA lagunemist preosteoblastides, edendades osteogeenset diferentseerumist (Zhu jt., 2021). Samas, ac4C modifikatsiooni puudus vähendab oktaamer-seonduva transkriptsioonifaktori 4 (OCT4) transkriptsiooni, häirides embrüonaalsete tüvirakkude isetaaste protsessi ja soodustades nende diferentseerumist (Liu jt., 2023).

ac4C modifikatsiooni rolli uurimine normaalset päritolu rakkudes juhib tähelepanu vajadusele analüüsida selle võimalikke mõjusid patoloogilistes seisundites, eriti vähirakkudes. Kasvajarakkudes võib ac4C oluliselt mõjutada geeniekspressiooni ning rakulisi protsesse, mis on kriitilise tähtsusega kasvaja arengus (Huang jt., 2020). Näiteks võib ac4C soodustada kasvajate arengut, mõjutades viiruslikku replikatsiooni või viiruse poolt vahendatud protsesse. Yan jt., (2023) uuringus näidati, et Kaposi sarkoomiga seotud herpesviiruses (KSHV) on suurenenud polüadenüleeritud RNA (PAN RNA) atsetüleerimistase, mis soodustab viiruse replikatsiooni. Kui ac4C modifikatsioon eemaldada viiruse PAN RNA-lt, väheneb viiruse esinemissagedus, mis üldiselt võib viidata võimalikule terapeutilisele sihtmärgile. Mõned uuringud näitasid ka ac4C osalust emakakaelavähis ja maovähis, nimelt esimesel juhul ac4C võib kaasa aidata inimese papilloomiviiruse (HPV) arengule, mis omakorda soodustab emakakaelavähi teket (Long jt., 2023). Teisel juhul stimuleerib *Helicobacter pylori* infektsioon onkogeeni E3 ubikvitiin-ligaasi (nim. ka *mouse double minute 2*, MDM2) 3' UTR-i atsetüleerimist, suurendades selle stabiilsust. Selle tagajärjel tõuseb MDM2 tase ja tuumorsuppressorvalk p53 laguneb, mis viib maovähi arenguni (Deng jt., 2023).

ac4C modifikatsioon on viimasel ajal pälvinud märkimisväärset teaduslikku tähelepanu, kuid selle tähenduse mõistmiseks on võtmetähtsusega ensüüm, mis seda vahendab – N-atsetültransferaas 10 (NAT10). Järgnevalt keskendutaksegi NAT10 struktuurile, funktsioonidele ja rollile rakulistes protsessides.

1.3 N-atsetültransferaas 10 (NAT10)

Tsütidiini atsetüleerimise eest vastutavad ensüümid, mis on tuntud ac4C kirjutajatena. Inimrakkudes toimib ATP-sõltuv valk NAT10 peamise ac4C kirjutajana ning on seni ainus

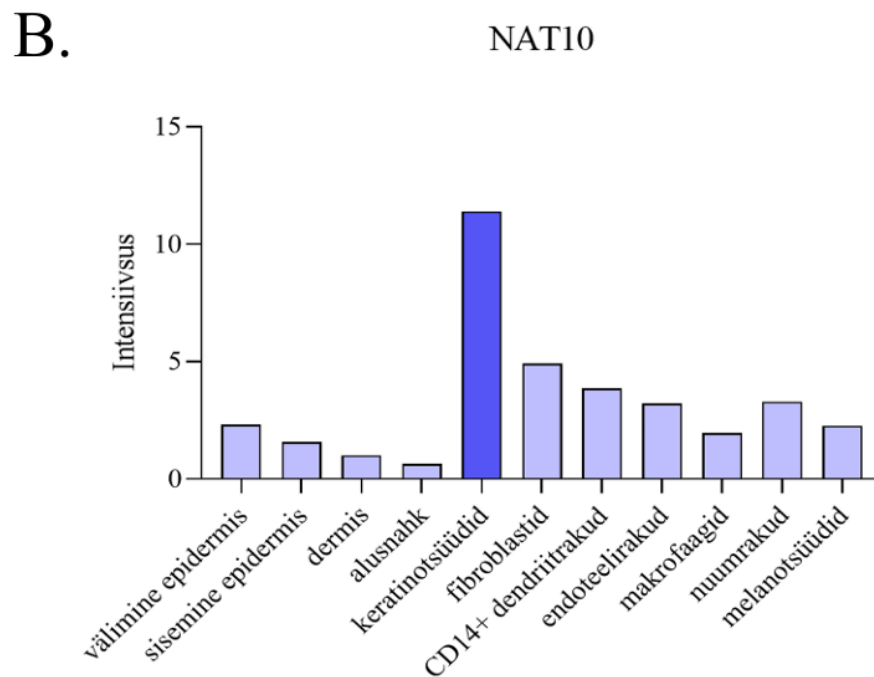
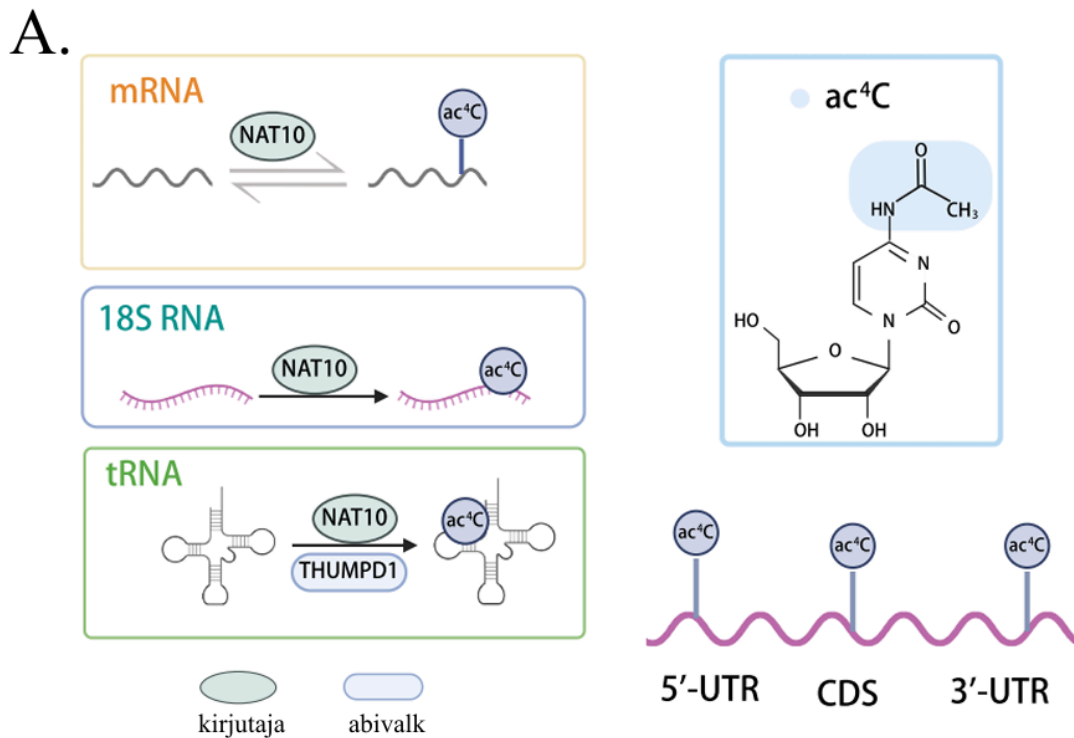
teadaolev selle modifikatsiooni allikas (Arango jt., 2018). *NAT10* geen on osa histooni atsetültransferaaside (HAT) perekonnast ning kuulub Gcn5-seotud N-atsetültransferaaside (GNAT) alam perekonda (Liu jt., 2016; Cai jt., 2017). GNAT perekonna ensüümid sisaldavad konserveerunud järjestusmotiive, sealhulgas atsetülkoensüüm A (Ac-CoA) seondumismotiivi, mis esineb atsetüülühma doonorina (Lu jt., 1996). *NAT10* koosneb 1025 aminohapest ning selle molekulmass on 116 kilodaltonit (kDa). Selles valgus leidub kolm konserveerunud struktuuridomeeni: N-terminaalne atsetültransferaasi struktuuridomeen, ATP/GTP seondumismotiiv ja C-terminaalne ATPaasi struktuuridomeen (Sleiman ja Dragon, 2019). Üldiselt atsetüleerivad NAT ensüümid valke, kandes atsetüülühma Ac-CoA-st polüpeptiidis oleva aminohappe positiivselt laetud N-terminaalse otsa vaba α -aminorühmale (Drazic jt., 2016). RNA atsetüleerimisel toimub atsetüülühma ülekande AcCoA-st *NAT10* ensüümi C-terminaalse ATPaasi ja N-terminaalse N-atsetültransferaasi domeeni kaudu, kusjuures energia saamiseks on vajalik ATP/GTP hüdrolyüs (Ikeuchi jt., 2008). *NAT10* mängib olulist rolli nii DNA kahjustuse vastuses kui ka telomeraasi regulatsioonis. Uuringud on näidanud, et *NAT10* atsetüleerib sihtvalke, mõjutades sellega telomeraasi funktsiooni. *NAT10* mõjutab inimese telomeraasi pöördtranskriptaasi (hTERT) ribonukleoproteiin (RNP) kompleksi moodustumist ja paiknemist rakus, seondudes hTERT ja inimese telomeraasi RNA (hTR) subkompleksidega ning takistades nende transporti telomeeridele, reguleerides seeläbi telomeraasi aktiivsust (Fu ja Collins, 2007). Samuti on leitud, et *NAT10* ekspressioon suureneb genotoksiliste ainete, nagu H_2O_2 , mõjul, mis viitab selle rollile DNA kahjustuste parandamises (Liu jt., 2007). Kuna *NAT10* võib suurendada rakkude vastupidavust genotoksilistele ainetele, suudab ta stimuleerida ka telomeraasi aktiivsust (Liu jt., 2007). Telomeeride lühenemisel aktiveeruvad DNA kahjustuse signaalirajad, mis võivad viia raku vananemise või apoptoosini, näidates, et *NAT10* võib olla ühendav lüli DNA kahjustuste ja telomeraasi aktiivsuse vahel

NAT10 osaleb ka rakujagunemises ja mikrotuubulite stabiilsuses, nimelt võib *NAT10* reguleerida mikrotuubulite atsetüleerimist, mõjutades seeläbi tsütokineesi (Shen jt., 2009). Kuna *NAT10* paikneb raku keskkehas, kus asuvad atsetüleeritud α -tubuliinid, siis uuringus näidati, et *NAT10* ja atsetüleeritud α -tubuliini tasemed tõusevad genotoksilise stressi korral, mis viitab nende võimalikule seotusele. Mikrotuubulite atsetüleerimine stabiliseerib neid, aidades säilitada nende funktsionaalsust tsütokineesi ajal (Shen jt., 2009).

NAT10 RNA atsetültransferaasi rollis kirjeldati esmakordselt tRNA-de modifitseerimisel, kus tRNA atsetüleerimiseks vajab ta lisaks THUMP domeeni sisaldavat valku 1 (THUMP1), mis soodustab *NAT10* seondumist tRNA-ga (Sharma jt., 2015) (Joonis 2A).

Nende valkude koostöö suurendab veelgi translatsiooni stabiilsust ja efektiivsust (Arango jt., 2018). NAT10-st kui ac4C kirjutajast on tehtud palju uuringuid, kuid lugejad ja kustutajad on endiselt küsimärgi all. Viimaste aastate uuringud on viidanud võimalikele ac4C modifikatsiooniga seonduvatele valkudele, sealhulgas nukleolaarsele valgule 58 (NOP58) kui potentsiaalsele ac4C sidujale ning Sirtuin 7-le (SIRT7) kui võimalikule deatsetülaasile (Kudrin jt., 2021; Kudrin jt., 2024). Nende valkude täpsed funktsioonid ac4C regulatsioonis ei ole siiski veel kinnitust leidnud, mistõttu puuduvad praegu kindlad tõendid ac4C-spetsiifiliste äratundmisvalkude või deatsetülaaside olemasolu kohta.

On leitud, et mitmed atsetültransferaasid ja deatsetülaasid osalevad naha haavade paranemisprotsessis (Spallotta jt., 2013). Näiteks Wang jt., (2023) uuringus näidati, et NAT10 mängib olulist rolli mitmete signaalide tugevdamisel, mis on vajalikud naha tõhusaks taastumiseks. Samuti põhjustab *NAT10* geeni osaline väljalülitamine hiirtel nähtavat viivitust naha taastumises (Wang jt., 2023). See leid on kooskõlas *Skin Atlas* andmebaasiga, kus on näidatud, et kõige kõrgem NAT10 valgu ekspressioonitase esineb keratinotsüütides, võrreldes fibroblastide, diferentseerumisklaster 14 (CD14+) dendriit-, endoteeli- ja nuumrakkudega, kus NAT10 ekspressioon on ka kõrge, kuid mõnevõrra madalam (Dyring-Andersen jt., 2020; Joonis 2B). Kuna keratinotsüüdid moodustavad üle 95% epidermisest, võib NAT10 funktsiooni uurimine epidermaalsetes keratinotsüütides anda väärtuslikku teavet selle kohta, kuidas ac4C modifikatsioon mõjutab põletikuvastust rakkudes (McGrath jt., 2004; Tonel ja Conrad, 2009; Elder jt., 2010).



Joonis 2. RNA ac⁴C modifikatsiooni struktuur ja selle katalüüsimine ning NAT10 valgu ekspressiooni suhteline tase nahas ja naha rakkudes. A. NAT10 vahendab ac⁴C modifikatsiooni lisamist mRNA, 18S rRNA ja tRNA-le. tRNA modifitseerimiseks vajab NAT10 THUMP domeeni sisaldavat valku 1 (THUMPD1). ac⁴C esineb mRNA erinevates piirkondades (5'-UTR, CDS ja 3'-UTR). Joonis on kohandatud Ouyang jt., (2024) järgi. B. NAT10 valgu ekspressioon erinevates naharakkudes. Tumedam tulp tähistab keratinotsüüte, milles NAT10 valgu tase on kõige kõrgem. Joonis on kohandatud *Skin Atlas* järgi (Dyring-Andersen jt., 2020).

1.4 Naha ehitus ja immunoloogia

Nahk katab selgroogsete loomade keha ning sellel on mitmed olulised ülesanded: kaitseb väliskeskkonna eest, väldib vedeliku kadu, reguleerib temperatuuri ja edastab aistinguid. Imetajate nahk koosneb kolmest kihist: epidermisest, dermisest ja alusnahast (Chuong jt., 2002). Epidermis on naha pealne kiht, täpsemalt kihiline lameepiteel, mis toimib keha pinnal kaitsebarjäärina. Esimene epidermise kiht on sarvkiht, mis sisaldab lõplikult diferentseerunud keratinotsüüte (Green jt., 1982). Need keratinotsüüdid uuendatakse pidevalt basaalkihis paiknevate uute keratinotsüütide poolt (Hsu ja Fuchs, 2014). Järgmine kiht on läikivkiht, mis on õhuke ja läbipaistev kiht surnud keratinotsüüte. Selles kihis olevad keratinotsüüdid sisaldavad keratiini asemel eleidiini, mis on läbipaistev rakusisene valk, andes kihile iseloomuliku läbipaistva välimuse (Yousef ja Sharma, 2017). Sellest edasi tuleb sõmerkiht, milles olevad keratinotsüüdid on kaotamas oma tuuma ning sisaldavad tsüsteiini- ja histidiinirikkaid valke, mis paiknevad graanulites, mis ühendavad keratiini filamente (Ovaere jt., 2009). Basaalkiht sisaldab basaalseid keratinotsüüte, immuunrakke nagu Langerhansi rakud ja T-rakud, ning melanotsüüte, mis vastutavad naha pigmentatsiooni eest (Gilaberte jt., 2016). Kokkuvõttes moodustavad keratinotsüüdid umbes 95% epidermisest (McGrath jt., 2004). Keratinotsüütidevahelised ühendused, ehk tiheliidused, piiravad teiste rakkude, näiteks strooma- ja luuüdist pärinevate rakkude, liikumist ning jäävad enamasti fikseeritud asendisse. Selline struktuur aitab kaasa naha barjäärifunktsioonile ja kudede stabiilsusele (Rodrigues jt., 2019). Barjäärifunktsioon seisneb ka kahjustuste tajumisel, nimelt hakkavad nii keratinotsüüdid kui ka immuunrakud kahjustuse korral sekreteerima proinflammatoorseid signaalmolekule, meelitades sellega kohale nii kaasasündinud kui ka omandatud immuunsüsteemi rakke (Kersse jt., 2011). Keratinotsüüdid ekspresseerivad paljusid intra- ja ekstratsellulaarseid mustreid äratundvad retseptoreid (PRR) ning toodavad mitmesuguseid tsütokiine, kemokiine ja antimikroobseid peptiide, kaitstes organismi infektsioonide eest (Bitschar jt., 2017). Keratinotsüüdid epidermises ja muudes naha struktuurides suhtlevad pidevalt immuunrakkudega ning osalevad homeostaasi ja koekahjustuste taastamise protsessides (Takashima jt., 1995).

Epidermise all paikneb dermis, mis koosneb peamiselt rakuvälise maatriksi valkudest, mis tagavad naha struktuuri ja elastsuse. Dermis koosneb kahest kihist: papillaardermisest ja retikulaardermisest (Dick, 1947). Mõlemas dermise kihis asuvad fibroblastid, mis toodavad ekstratsellulaarset maatriksit, tagades dermise struktuuri tugevuse ja stabiilsuse (Woodley, 2017). Lisaks leidub dermises immuunrakke, nagu makrofaagid, lümfotsüüdid ja nuumrakud, mis kaitsevad nahka võimalike kahjustuste eest (Bangert jt., 2011). Epidermist ja dermist

eraldab basaalmembraan, mis on õhuke ja tihe valgukiht ja mille vahendusel toimub rakkude ja valkude liikumine nende kahe nahakihi vahel (Kolarsick jt., 2011). Lisaks toimib see tsütokiinide ja kasvufaktorite säilituskohana, tagades nende kontrollitud vabanemise naha taastumise ja ümberkujundamise protsesside käigus (Iozzo, 2005). Dermise all paikneb nahaalne kude ehk alusnahk, mis koosneb peamiselt sidekoest ja rasvkoest (Arda jt., 2014). Alusnahas on peamised rakutüübid fibroblastid ja adipotsüütid ning see sisaldab umbes 50% keha rasvast (Wong jt., 2016). Lisaks toodab nahaalne kude erinevaid kasvufaktoreid ja tsütokiine ning sisaldab mitmeid immuunrakke, näiteks makrofaage ja T-rakke (Cildir jt., 2013).

Rakke, mis moodustavad epidermise ja dermise ning asuvad nahaaluses rasvas, saab jagada immuun- ja mitteimmuunrakkudeks, kusjuures viimased toetavad naha struktuuri ja funktsiooni ning osalevad osaliselt ka põletikulistes protsessides (Richmond ja Harris, 2014). Immuunrakud, sealhulgas müeloidsed (nt Langerhansi rakud, makrofaagid) ja lümfoidsed rakud ($\alpha\beta$ T- ja B-rakud), hoiavad koe talitlust ning tunnevad ära keskkonna antigeene (Kupper ja Fuhlbrigge, 2004; DeBenedictis jt., 2001). Põletiku korral sekreteerivad nad põletikumediaatoreid, mis aktiveerivad ümbritsevaid rakke ja reguleerivad immuunvastust (Watkins jt., 1995; Skapenko jt., 2005; Havran ja Jameson, 2010). B-rakud osalevad eeskätt põletikuliste seisundite puhul, mil nende hulk nahas suureneb ning nad on seotud immunoglobuliinide taseme tõusuga (Pasparakis ja Nestle, 2014; Braza jt., 2014). B-rakkude rolli terapeutilistes rakendustes on uuritud ka hiire psoriaasi mudelis, kus B-rakkude puudumine viis haiguse raskemate sümptomite avaldumiseni (Yanaba jt., 2013).

1.4.1 Psoriaas

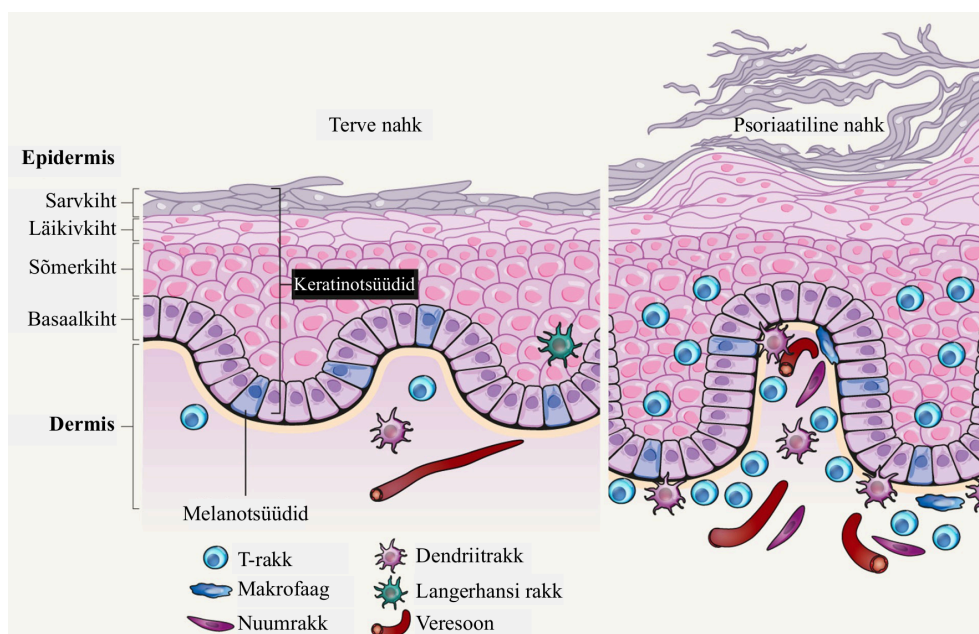
Psoriaas on põletikuline nahahaigus, mis mõjutab maailmas enam kui 60 miljonit last ja täiskasvanut (Michalek jt., 2016). Maailma Terviseorganisatsioon kirjeldas psoriaasi kui kroonilist, mittenakkuslikku, valulikku, välimust muutvat ja elukvaliteeti halvendavat haigust, mille olemasolev ravi ei ole piisavalt efektiivne, et ravida haigust lõplikult (*WHO* (i.a)). Psoriaasi ravi eesmärk on vähendada naharakkude liigset paljunemist ja leevendada ketendust (*Mayo Clinic* (i.a)). Kasutatakse paikseid ravimeid, valgusteraapiat ning suu- või süstitavaid ravimeid. Sageli tuleb katsetada erinevaid meetodeid ning isegi tõhusa ravi järel võib haigus korduda (*Mayo Clinic* (i.a)). Psoriaasil on mitmeid kliinilisi vorme, kuid kõige tavalisem ja kergesti äratuntav on krooniline plaakpsoriaas, tuntud ka kui *psoriasis vulgaris* (Griffiths jt., 2007). Tüüpiliselt on psoriaasil teravalt piiritletud lõheroosad naastud, mida katavad hõbedased ketendused (Rzany jt., 1998). Histoloogilised tunnused hõlmavad epidermise

paksenemist, õhenenud või puuduvat granulaarset kihti ning laienuvad ja pikenenud kapillaare (Murphy jt., 2007). Lisaks esineb dermises ja epidermises T-rakkude põletikuline tungimine ning mõnel juhul ka neutrofiilide kogunemine parakeratootilises kihis (Sabat jt., 2007). Psoriaasi tekkimine sõltub geeni ja keskkonna koostoimest. Haigus ei pruugi ilmnedagi, kui ei ole olemas sobivat keskkonnategurit, nagu stress, infektsioonid (eriti streptokokkide põhjustatud), alkoholi tarbimine, suitsetamine, kokkupuude teatud ravimitega (nt liitium, malaaria ravimid ja mittesteroidsed põletikuvastased ained) või mõnel juhul päikesevalgus (Griffiths ja Barker, 2007). Viimastel aastatel on leitud, et mitmed patogeensed ained, nagu *Helicobacter pylori*, *Candida* ning mitmed viirused (inimese immuunpuudulikkuse viirus (HIV) ja HPV) võivad olla seotud psoriaasi tekkimisega (Rademaker jt., 2019). Näiteks HIV-infektsioon suurendab psoriaasi riski ja raskusastet, eriti CD4⁺ lümfotsüütide taseme languse korral (Goh jt., 2007). HIV-positiivsetel patsientidel on psoriaasi ravimine sageli keerulisem ja haigus kipub sagedamini korduma (Fernandes jt., 2011). HPV-ga nakatunud inimestel on psoriaasi tekkeks umbes kaks korda suurem risk, kusjuures see risk kasvab vanusega oluliselt rohkem kui tervetel inimestel (Chen jt., 2020).

T-rakkude tähtsus psoriaasi patogeneesis oli kinnitatud juba 1980. aastate alguses tänu kliinilistele uuringutele tsüklosporiiniga, mis on psoriaasi raviks kasutatav immunosuppressant (Griffiths jt., 1986; Ellis jt., 1986). Haiguse patogeneesis osalevad dendriitrakud, neutrofiilid ja keratinotsüüdid, mille vaheline suhtlus toimub peamiselt tsütokiinide, nagu vähi nekroosi faktor alfa (TNF- α), interferoon gamma (IFN γ), IL-17 ja IL-23, ning keratinotsüütide aktiveerimise kaudu, mis soodustavad epidermise hüperprolifereerumist ja antimikroobsete valkude, kasvufaktorite ja kemokiinide tootmist (Tonel ja Conrad, 2009). Need tegurid põhjustavad psoriaasi iseloomulikke muutusi, nagu angiogeneesi, neutrofiilide infiltratsioon ja abistavate Th1 ja Th17 rakkude arvu kasvu (Hawkes jt., 2017). Viimase 20 aasta jooksul on immunoloogilised ja geneetilised uuringud näidanud, et psoriaasi arengus mängivad olulist rolli IL-17 ja IL-23 vahendatud adaptiivse immuunsuse mehhanismid (Elder jt., 2010). IL-23 mängib tähtsat rolli IL-17 tootvate immuunrakkude arengus ja säilitamises ning on tihedalt seotud IL-12-ga, mis osaleb naiivsete T-rakkude diferentseerumises Th1 rakkudeks (McGeachy jt., 2019; Hsieh jt., 1993). IL-17 suurendab C-C motiiviga kemokiini ligandi 20 (CCL20) taset, mis meelitab Th17 rakke põletikukohta (Harper jt., 2009). Teised tsütokiinid, mis soodustavad põletikku psoriaasis on TNF α , IFN- γ ja IL-36 (Tsuruta, 2009). TNF α soodustab põletikuliste tsütokiinide ja neutrofiilide kogunemist, IFN- γ aitab kaasa antigeenide töötlemisele ja põletiku püsimisele (Chiricozzi jt., 2011; Früh ja Yang, 1999). IL-36 perekonna tsütokiinid mängivad võtmerolli

neutrofiilide ja Th17 rakkude meelitamise ning aktiveerimise psoriaatilises nahas (Johnston jt., 2017). Nende kõikide tsütokiinide tasakaal võib aidata selgitada psoriaasi erinevaid kliinilisi ilminguid, kus näiteks IL-23 ja IL-17 on peamised tsütokiinid *psoriasis vulgaris*-es, samas kui IFN-vastused ilmnevad haiguse algstaadiumis (Xing jt., 2016; Nestle jt., 2005). Need põletikulised ahelad toetavad üksteist, kus IFN- γ soodustab IL-23 ja Th17 vahendatud vastuseid, samas kui IL-17 vastused soodustavad IL-36 tekkimist ja aktiveerimist, luues keeruka ja autonoomse põletikureaktsiooni süsteemi psoriaasis (Kryczek jt., 2008; Johnston jt., 2011).

RNA modifikatsioonid mängivad kesksel rollil nii immuunsüsteemi rakkude aktivatsioonis, diferentseerumises ja funktsioonis kui ka psoriaasi patogeneesis. Näiteks 5-metüültsütidini (m5C) modifikatsiooni metüültransferaas, nimega Myc-indutseeritud SUN domeeni sisaldav valk (NSUN2), metüleerib IL-17A mRNA-d, suurendades selle translatsiooni T-rakkudes (Wang jt., 2017). METTL14 puudulikkus pärsib m6A metülatsiooni küpsevates B-rakkudes ja takistab IL-7 poolt indutseeritud pro-B-rakkude proliferatsiooni (Zheng jt., 2020). Mõned uuringud on näidanud, et m6A metülatsioon ja selle kirjutaja ensüüm METTL3 on psoriaatilises nahas allareguleeritud ning negatiivselt korrelatsioonis haiguse raskusastmega. Nimelt, METTL3 vaigistamine vähendab m6A taset ja süvendab psoriaasi sümptomeid hiiremudelil (Wang jt., 2022).

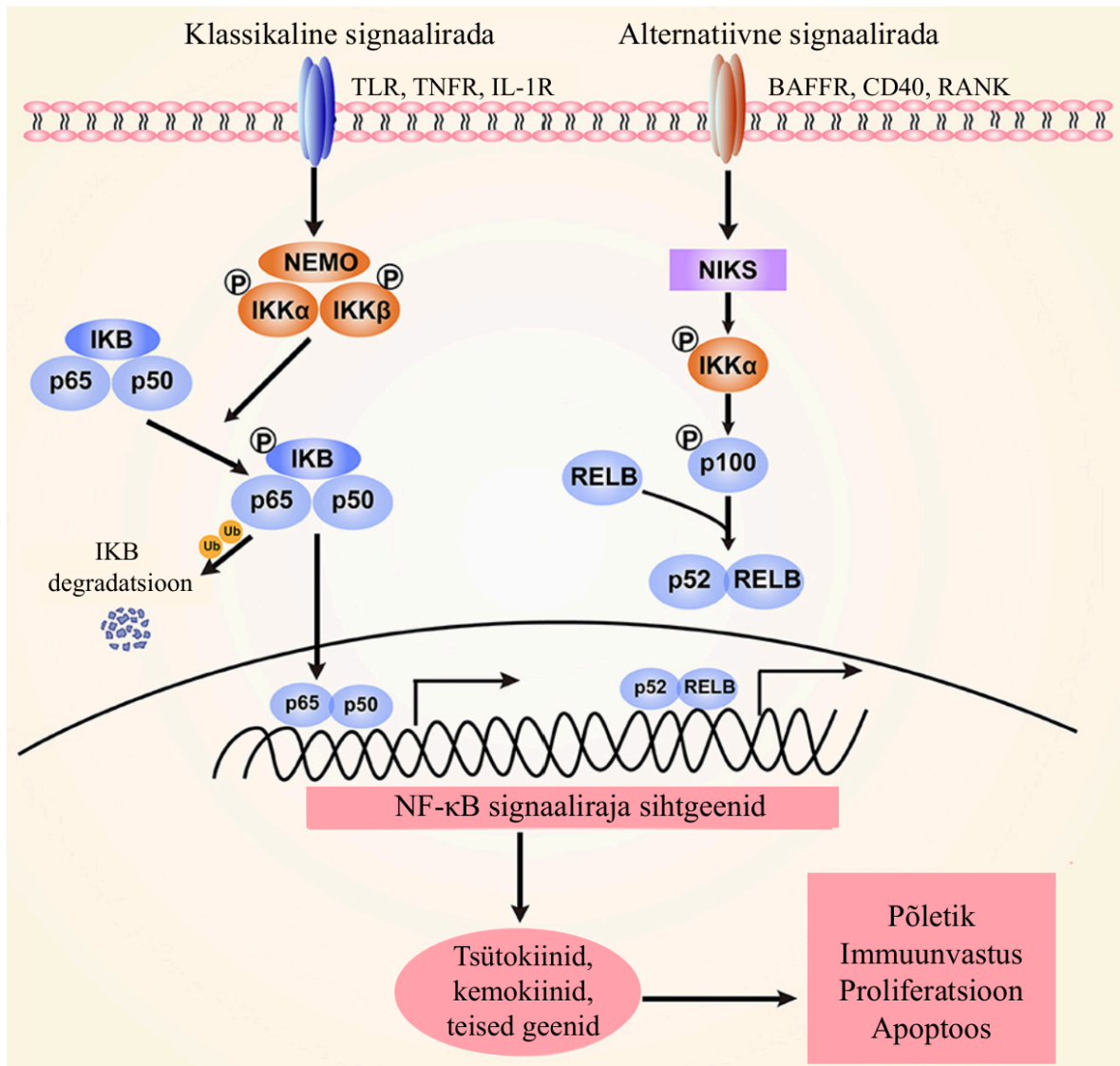


Joonis 3. Illustratiivne näidis terve ja psoriaatilise naha kohta. Psoriaas on krooniline põletikuline nahahaigus, mis mõjutab keratinotsüüte – rakke, mis moodustavad valdava osa epidermisest. Haiguspuhangute ajal paljunevad keratinotsüüdid kümme korda kiiremini kui tervel nahal olevad rakud ning nende küpsemine on häiritud. Selle tulemusena moodustuvad nahale kõrgemad, põletikulised ja ketendavad punased naastud, mis võivad olla sügelevad ja valulikud. Joonis on kohandatud Crow (2012) järgi.

1.4.2 NF- κ B ja JAK-STAT signaalirajad

Selleks et rakud saaksid kohandada oma funktsioone vastavalt muutuvatele tingimustele, peavad nad olema võimelised tuvastama ja reageerima keskkonnast saabuvatele signaalidele, mis on tuntud kui signaaliülekanne (Trewavas ja Malhó, 1997). Signaalid liiguvad raku keerukate signaaliradade kaudu, mis koosnevad keemiliste reaktsioonide ahelatest, kus järjestikused molekulide aktiveerumised edastavad keskkonnast saadud signaale, kuni vajalik raku funktsioon käivitub (*National Cancer Institute*, (i.a)).

NF- κ B (tuuma faktor kapp beeta) on indutseeritavate transkriptsioonifaktorite perekond, mis reguleerib paljusid immuun- ja põletikuliste reaktsioonidega seotud geene (Oeckinghaus ja Ghosh, 2009). See perekond koosneb viiest struktuurilt sarnasest valgust: NF- κ B1 (p50), NF- κ B2 (p52), RELA (p65), RELB ja c-Rel. Need valgud reguleerivad sihtgeenide transkriptsiooni, seondudes spetsiifilise DNA elemendiga – κ B enhaanseriga, kas hetero- või homodimeeri vormis (Sun jt., 2013). NF- κ B aktiveerumine toimub kahe peamise signaaliraja, klassikalise ja alternatiivse raja kaudu (Vallabhapurapu ja Karin, 2009; Sun, 2011). Klassikaline NF- κ B signaalirada aktiveerub erinevate retseptorite, nagu TNF-, T- ja B-raku retseptorite, tsütokiinide ning PRR-ide, kaudu ja sõltub NF- κ B inhibiitor alfa (NFKBIA või I κ B α) lagundamisest, mida reguleerib I κ B kinaasi (IKK) kompleks (Zhang ja Sun, 2015; Karin ja Delhase, 2000). IKK, mis koosneb kahest katalüütilisest alaühikust (IKK α ja IKK β) ning reguloorsest alaühikust IKK γ (NEMO), aktiveerub tsütokiinide, kasvufaktorite, mikroobsete komponentide ja stressitegurite toimel (Sun ja Ley, 2008; Israël, 2010). Selle tulemusena siirduvad NF- κ B dimeerid (p50/RELA ja p50/REL) kiiresti rakutuuma ja reguleerivad seal sihtgeenide transkriptsiooni (Hayden ja Ghosh, 2008). Erinevalt klassikalisest rajast, aktiveerub alternatiivne NF- κ B rada vaid teatud retseptorite, nagu lümfotoksiin- β retseptor (LT β R), B-raku aktiveerimisfaktori retseptor (BAFFR), CD40 ja tuumafaktori κ B retseptori aktivaator (RANK), kaudu (Sun, 2012; Sun ja Liu, 2011). Selle aktiveerimine ei hõlma I κ B α lagundamist, vaid tugineb p100 töötlemisele, mis on NF- κ B2 prekursorvalk (Sun, 2011). NF- κ B-indutseeriv kinaas (NIK) aktiveerib IKK α , mis fosforüleerib p100, põhjustades selle töötlemist ja tekkinud p52/RELB kompleksi siirdumist tuuma (Xiao jt., 2001; Sun, 2012). Klassikaline NF- κ B reguleerib immuunvastust, samas kui alternatiivne rada täiendab seda, reguleerides omandatud immuunsüsteemi funktsioone (Sun, 2011).



Joonis 4. Klassikaline ja alternatiivne NF-κB signaalirada. Klassikalise signaaliraja aktiveerimiseks on vaja TLR-, TNFR- ja IL-1R-retseptoreid, mis viib inhibeeriva valgu IκB fosforüülimiseni ja lagundamiseni. Selle tulemusena vabaneb p50/p65 kompleks, mis siirdub tuuma. Alternatiivne rada sõltub NF-κB2 (p100)/RELB kompleksi aktiveerimisest BAFFR-, CD40- ja RANK-retseptorite poolt. See käivitab NIK fosforüülimise, mis aktiveerib IKKα, viies p52-RELB heterodimeeri aktiveerimise ja selle siirdumiseni tuuma. NF-κB signaaliraja aktiveerimine reguleerib erinevaid rakuprotsesse, mõjutades tsütokiinide, kemokiinide ja teiste geenide ekspressiooni. Joonis on kohandatud Peng jt., (2020) järgi.

Genoomsed uuringud on tuvastanud, et mitmed NF-κB signaaliraja geenid on seotud psoriaasi arenguga. Nii näiteks REL geen on seotud psoriaasi geneetilise eelsoodumusega (Stuart jt., 2010). Lisaks võib REL allareguleerimine pärssida keratinotsüütide kasvu, häirides nende rakutsükli (Lorenz ja Seitz, 2014). Psoriaasi geneetilisele eelsoodumusele panustab ka kaspaaaside meelitamise domeeni sisaldav valk 14 (CARD14), mis asub psoriaasi vastuvõtlikkuse lookuses 2 (PSORS2) ja toimib põletikulise signaalimolekulina, mida leidub naharakkudes, nagu keratinotsüüdid (Van Nuffel jt., 2017). Psoriaasi korral on tuvastatud üle

20 CARD14 variatsiooni, mis viitab selle tähtsusele haiguse kujunemisel (Jordan jt., 2012; Tsoi jt., 2012).

Psoriaasi arengus mängib olulist rolli ka JAK-STAT (Janus kinaasid ja signaali edasikandvad ja transkriptsiooni aktiveerivad valgud) signaalirada. Seda signaalirada peetakse üheks peamiseks signaaliülekanne ahelaks rakkudes, kus osaleb rohkem kui 50 tsütokiini ja kasvufaktoreid, sealhulgas hormoone, IFN-e ja IL-e (Darnell, 1997). Nagu nimegi ütleb, koosneb signaalirada ligand-retseptori kompleksidest: JAK-idest ja STAT-idest. JAK perekonnas on 4 liiget: JAK1-3 ja türosiini kinaas 2 (TYK2) ning STAT perekonnas on 7 liiget: STAT1-4, STAT5a, STAT5b ja STAT6 (Leonard ja O'Shea, 1998). Nagu NF- κ B signaaliraja puhul, eristatakse JAK-STAT signaalirajas klassikalist ja mitteklassikalist signaalirada. Klassikaline signaalirada aktiveerub, kui ligand seondub retseptoriga, põhjustades selle dimeriseerumise ja JAK-i aktiveerumise. Seejärel fosforüleeritakse JAK retseptori, luues sidumiskoha STAT-valkudele (Li, 2008). Fosforüleeritud STAT-id moodustavad dimeere, mis liiguvad tuuma ning reguleerivad sihtgeenide transkriptsiooni, kas otse seondudes DNA-le transkriptsiooni komplekside kaudu või koostöös teiste transkriptsioonifaktoritega (O'Shea jt., 2015). Mitteklassikaline JAK-STAT signaalirada on keerukam ja reguleerib mitmeid rakulisi protsesse. STAT-valgud võivad aktiveeruda ka sõltumatult JAK-ist ning lokaliseeruda erinevates rakustruktuurides, nagu mitokondrid ja endoplasmaatiline retiikulum, mõjutades nii raku ainevahetust kui ka apoptoosi (Bharadwaj jt., 2020). Psoriaasi patogeneesi kontekstis on oluline JAK1, mis on seotud haiguse raskusastmega (Nada jt., 2018). TYK2 puudumine võib vähendada psoriaasi fenotüüpe hiiremudelil, mis viitab sellele, et sellel on potentsiaalne terapeutiline väärtus psoriaasi ravis (Ishizaki jt., 2014). Psoriaatilistes nahakahjustustes on leitud ka STAT1 ja STAT3 suurenenud ekspressioon võrreldes terve nahaga (Hald jt., 2013; Sano jt., 2005).

JAK-STAT signaaliraja negatiivsed regulaatorid kuuluvad tsütokiini signaali supressor valkude (SOCS) perekonda (Hilton jt., 1998). SOCS1 pärsib mitmete tsütokiinide, sealhulgas IL-6, signalisatsiooni, interakteerudes otseselt JAK-kinaasidega ja takistades nende aktivatsiooni ning STAT-valkude fosforüleerimist (Starr jt., 1997; Endo jt., 1997; Naka jt., 1997). SOCS2 on suhteliselt nõrk tsütokiinide inhibiitor ega pärsi JAK-kinaaside aktiivsust (Yasukawa jt., 1999; Pezet jt., 1999). Selle toime sõltub kontsentratsioonist ja rakulisest kontekstist, võimaldades tal teatud juhtudel pidurdada või takistada teisi SOCS-valke (Favre jt., 1999; Dif jt., 2001). SOCS3 inhibeerib sarnaseid signaaliradu nagu SOCS1, sealhulgas IL-6, kuid on IFN signalisatsiooni nõrgem pärssija (Takahashi jt., 2003; Song ja Shuai, 1998).

See võib seonduda JAK-valkudega, kuid madalama afiinsusega kui SOCS1, mistõttu on inhibeerimiseks vaja SOCS3 kõrgemat ekspressioonitaset (Pezet jt., 1999; Suzuki jt., 1998). SOCS1 ja SOCS3 osalevad ka NF- κ B signaaliraja aktiivsuse muutmises, tugevadades teatud tingimustes põletikulisi vastuseid, mõjutades seeläbi NF- κ B/RelA aktiivsust (Park jt., 2003). JAK-STAT signaaliraja negatiivsete regulaatorite hulka kuulub ka aktiveeritud STAT-i valguliste inhibiitorite (PIAS) perekond. PIAS1 ja PIAS3 interakteeruvad vastavalt STAT1 ja STAT3-ga ja blokeerivad nende STAT-ide DNA-seondumisvõime (Liu jt., 1998; Chung jt., 1997). Kokkuvõttes toob analüüsitud kirjandus esile, et mõlemad NF- κ B ja JAK-STAT signaalirajad on olulised psoriaasi arengus ja kulgemises.

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1 Töö eesmärgid

Magistritöö üldine eesmärk oli uurida RNA modifikatsiooni ac4C võimalikku rolli psoriaasiga seotud põletikulistes protsessides kasutades inimese epidermaalsete keratinotsüütide (NHEK) rakukultuuri mudelit. Põletikulise vastuse esilekutsumiseks kasutati uuringus kolme erinevat stimulant: polüinosiin:polütsütidinhapet (Polü(I:C)), IFN γ ja IL-17A.

Spetsiifilisemalt sooviti:

1. kirjeldada *NAT10* ekspressiooni psoriaasiga patsientide nahas.
2. selgitada välja kuidas mõjutab *NAT10* vaigistamine NHEK rakkude elulemust ja põletikuliste protsessidega seotud markergeenide ekspressiooni Polü(I:C), IFN γ ja IL-17A juuresolekul.
3. kaardistada ac4C mõju geeniekspressioonimustrile NHEK rakkudes kasutades kogu transkriptoomi analüüsi.
4. uurida, kuidas *NAT10* vaigistamine mõjutab NF- κ B ja JAK-STAT signaaliradade aktiivsust stimuleeritud NHEK rakkudes kasutades kogu transkriptoomi andmeid ja signaaliraja analüüsi.

2.2 Materjal ja meetodika

2.2.1 Rakukultuur

Töös kasutati normaalseid inimese epidermaalseid keratinotsüüte (PromoCell). Rakke kasvatati keratinotsüütide kasvusöötmes (*Keratinocyte Growth Medium 3*, edaspidi KGM-3) (PromoCell), kuhu lisati 3,8% ulatuses kasvufaktoreid sisaldav segu (PromoCell), 60 μ M kaltsiumkloriidi (CaCl₂, PromoCell) ning 1% streptomütsiini ja penitsilliini segu (Gibco). Iga kahe päeva järel vaadeldi rakke mikroskoobi all (Zeiss AxioCam 208) ning vahetati KGM-3 söödet 80–85% konfluentsuse saavutamiseni. Rakke kasvatati T75 rakukultuuri flakoonides ja inkubeeriti Eppendorf CellExpert C170i inkubaatoris temperatuuril 37 °C ja 5% CO₂ juures. Vajaliku konfluentsuse saavutamisel pesti rakud *Dulbecco's* fosfaatpuhverdatud füsioloogilise lahusega (PBS, Sigma) ja võeti tassilt lahti 0,05% trüpsiin-EDTA abil (Gibco). Trüpsiini toime peatamiseks lisati 3 ml trüpsiini neutraliseerivat lahust (*Trypsin neutralizer solution*, Invitrogen) ja seejärel korjati rakud 15 ml tuubi. Tassi loputati 5 ml PBS-iga allesjäänud rakkude kogumiseks 15 ml tuubi. Rakke tsentrifugeeriti 5 minutit toatemperatuuril 250 rcf

juures, eemaldati supernatant ning rakud suspendeeriti KGM-3 söötmes. Edaspidi kasvatati rakke kas 12 või 24 kannuga plaadil, sõltuvalt huvipakkuvast katsest.

2.2.2 NAT10 siRNA transfektsioon NHEK rakkudesse

24 tundi enne NHEK rakkude transfektsiooni jagati rakud 12 või 24 kannuga plaadile, sõltuvalt katsest. 12 kannuga plaadil oli igas kannus ligikaudu 80000 rakku, 24 kannuga plaadi puhul aga kaks korda vähem. Katses kasutati NAT10 siRNA (Thermo Fisher, kataloog AM16708) ja negatiivset kontroll-siRNA (Thermo Fisher, kataloog 4390843). Transfektsiooni läbiviimiseks kasutati rakku läbivat peptiidi NickFect 71 (NF71), mis valiti selle tõhususe ja väikse tsütotoksilisuse poolest keratinotsüütides (Carreras-Badosa jt., 2020). Transfektsioonisegu lõppmahus 50 µl ühe kannu kohta sisaldas lõppkontsentratsiooniga 60 nM siRNA-d, 1,02 µM NF71 peptiidi ja destilleeritud vett (dH₂O). Transfektsioonisegu segati KGM-3 söötmega ja seejärel lisati rakkudele. Sellele järgnes inkubatsioon 48 tundi 37°C juures.

2.2.3 NHEK rakkude stimuleerimine Polü(I:C), IFN γ ja IL-17A-ga

Antud töös viidi läbi kaks stimuleerimist: Polü(I:C) HMW (*High Molecular Weight*, InvivoGen) ja tsütokiinidega IFN γ (R&D systems) või IL-17A (PeproTech). Polü(I:C) lõppkontsentratsioon rakkudel oli 0,4 µg/ml, mida segati kokku NF71 (6,8 µg/ml) ja dH₂O-ga. Stimuleerimata kontroll rakkudele lisati ainult Opti-MEM söödet (31985-070, Gibco). Seejärel inkubeeriti rakke 6 tundi 37 °C juures. Järgmisena lisati rakkudele 700 või 400 µl (vastavalt 12 või 24 kannulisele plaadile) QIAzol lüüsilahust (Qiagen) RNA eraldamiseks.

Tsütokiinide lõppkontsentratsioonid rakkudel olid 20 ng/ml IFN γ ja 10 ng/ml IL-17A puhul. Tsütokiinide valik oli tehtud põhimõttel, et IFN γ on Th1-rakkude poolt toodetud tsütokiin, mis on psoriaasi korral kõrgeks, eriti haiguse ägenemise faasis (Szegedi jt., 2003). IL-17A on Th17-rakkude poolt toodetud tsütokiin, mis on otseselt seotud psoriaasi kroonilise põletiku ja keratinotsüütide hüperprolifereerumisega (Miossec ja Kolls, 2012). Opti-MEM söödet kasutati tsütokiinide lahjendamiseks. Stimuleerimata kontrollile lisati ainult Opti-MEM söödet. Seejärel inkubeeriti rakke vastavalt katsele kas 6, 12 või 24 tundi 37°C juures. Vastava aja möödudes lisati rakkudele 700 või 400 µl (vastavalt 12 või 24 kannulisele plaadile) QIAzol lüüsilahust RNA eraldamiseks.

2.2.4 NHEK rakkude elulemuse hindamine

NHEK rakkude elulemuse hindamiseks viidi läbi elulemuse katse (*cell viability assay*). Selleks rakke kasvatati 96-kannulises plaadis ning ühe kannu kohta oli 9000 rakku. Esimesena transfekeeriti rakke NAT10 siRNA või negatiivse kontroll-siRNA-ga (Materjal ja meetodika 2.2.2). 48 tundi möödudes stimuleeriti rakke Polü(I:C) või IFN γ -ga (Materjal ja meetodika 2.2.3). Positiivses kontrollis segati ühe kannu kohta 11 μ l dimetüülsulfoksiidi (DMSO) ja KGM-3 sööde ning negatiivses kontrollis oli ainult KGM-3 sööde ja metsiktüüpi (WT) keratinotsüüdid. Lisaks valmistati tühiproov, kus oli ainult KGM-3 sööde ilma rakkudeta. 4 tundi möödudes lisati iga kannule rakulugemiskomplekt 8 segu (*Cell counting kit 8*, CCK-8, APExBIO), oodati reaktsiooni toimumist 2 tundi ning seejärel mõõdeti rakkude neelduvust mikroplaadi lugejaga Ledetect 96 (Labexim Products) ning selle tarkvaraga Capture96. Neelduvus mõõdeti mõõtmisfiltriga 450 nm ja referentsfiltriga 620 nm. Statistiline analüüs teostati *Excel*-is kasutades valemit:

Rakkude elulemus (%) = $[(A_s - A_b) / (A_c - A_b)] \times 100$, kus

A_s - testitava ühendi neeldumine (kannu neelduvus, mis sisaldab rakke, söödet, CCK-8 ja testitavat ühendit).

A_b - tühiproovi (nn *blank*) neeldumine (kannu neelduvus, mis sisaldab söödet ja CCK-8).

A_c - kontrollproovi (nn negatiivne kontroll) neeldumine (kannu neelduvus, mis sisaldab rakke, söödet ja CCK-8).

Saadud tulemused analüüsiti *GraphPad Prism 8* (Dotmatics) programmi abil.

2.2.5 RNA eraldamine ja RT-qPCR mRNA ekspressiooni analüüsimiseks

Reaalaja kvantitatiivse PCR-i (RT-qPCR) tegemiseks eraldati stimuleeritud NHEK rakkudest totaalne RNA. Rakkudele, kuhu eelnevalt oli lisatud QIAzol lüüsilahus, lisati 140 või 80 μ l kloroformi (vastavalt sellele kas rakud koguti 12 või 24 kannulisest plaadist). Rakulüsaat tsentrifuugiti 15 min, 4 °C, 14000 rcf juures (Mikro 220R, Hettich). Korjatud pealmisele vesifaasile lisati 700 μ l isopropanooli. RNA eraldamiseks kasutati *Total RNA Zol-Out* komplekti (A&A Biotechnology) ning eraldamine tehti tootja protokoll järgi. RNA-d elueeriti 50 μ l dH₂O-ga ning kontsentratsioonid mõõdeti NanoDrop2000 spektrofotomeetriga (Thermo Scientific).

Järgmise sammuna sünteesiti RNA ahelale komplementaarne DNA (cDNA). cDNA sünteesimiseks kasutati 300 ng eraldatud totaalset RNA-d. Reaktsioonisegu tegemiseks kasutati *RevertAid First Strand cDNA Synthesis* komplekti (Thermo Scientific), ning seda

tehti tootja protokoll järgi. cDNA süntees viidi läbi termotsükleris (Eppendorf nexus) järgmise programmiga: 60 min 42 °C; 5 min 70 °C. Sünteesitud cDNA-d lahjendati 15 korda.

RT-qPCR-i tegemiseks segati ühe süvendi kohta 2.4 µl 5x *HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus* (Solis BioDyne), 1 µl pärissuunalise (*forward*) ning pöördsuunalise (*reverse*) praimerite segu (4 µM) (TAGCopenhagen) ja 2.6 µl dH₂O. Normaliseerimiseks kasutati referentsgeeni eukarüootse translatsiooni elongatsioonifaktori 1 alfa (eEF1A) praimerid (TAGCopenhagen). Kõigi magistritöö raames kasutatud praimerite loetelu ja järjestused on toodud Lisa 1-s. Edasi lisati süvendisse 6 µl cDNA-d ja negatiivse kontrollina kasutati dH₂O. RT-qPCR viidi läbi *QuantStudio 12K Flex* masinas (Applied Biosystems) järgmise programmiga:

Algne denaturatsioon	50 °C	2 min	} 40 tsükli
	95 °C	15 min	
Denaturatsioon	95 °C	15 s	
Ekstensioon	60 °C	1 min	

Saadud lävitsükli väärtused (C_t) analüüsiti *Excel*-is 2^{-ΔΔC_t} meetodiga (Livak ja Schmittgen, 2001) ja *GraphPad Prism 8* (Dotmatics) programmi abil.

2.2.6 RNA sekveneerimine

RNA sekveneerimiseks transfekteriti NHEK rakud NAT10 või kontroll-siRNA-ga (Materjal ja meetodika 2.2.2). 48 tunni pärast stimuleeriti rakke IFN γ või IL-17A-ga (Materjal ja meetodika 2.2.3). 24 tunni pärast koguti rakke ning eraldati nendest totaalne RNA (Materjal ja meetodika 2.2.4). Sekveneerimiseks kasutati 400 ng totaalset RNA-d, mis saadeti biotehnoloogiaettevõttesse Novogene (Saksamaa), mis pakub sekveneerimisteenust. Ettevõtte viis läbi RNA kvaliteedi kontroll, mRNA raamatukogu ettevalmistamine (polüA rikastamine) ja geeniekspressiooni diferentsiaalanalüüs. Sekveneerimine viidi läbi NovaSeq X Plus Series (PE150) sekvenaatoril, kus iga proovi kohta saadi 9 GB sekveneerimisandmeid, mis vastab 30 miljonile lugemile proovi kohta. Saadud andmeid analüüsis autor.

2.2.7 Western blot intratsellulaarsete valkude analüüsimiseks

NHEK rakkude intratsellulaarsete valkude analüüsimiseks kasutati *Western blot* (WB) meetodit. Selleks transfekteriti NHEK rakud NAT10 või kontroll-siRNA-ga (Materjal ja meetodika 2.2.2). 48 tunni pärast stimuleeriti rakke IFN γ või IL-17A-ga (Materjal ja meetodika 2.2.3). 6 tunni pärast koguti rakud (Materjal ja meetodika 2.2.1) ning tsentrifugiti

5 min 400 g juures. Rakke lüüsi 1x RIPA puhvris (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Igepal 630, 0.5% naatriumdeoksükolaat, 0.1% naatriumdodetsüülsulfaat (SDS)), millele oli lisatud ka fenüülmetüülsulfonüülfluoriid (Sigma) ja proteaaside inhibiitor (Sigma). Lüsati inkubeeriti 15 minutit jääl, segati seejärel Vortex-seadmehel ning protseduuri korrati ühe korra. Seejärel segati lüsati kokku 4x SDS laadimispuhvriga (200 mM Tris HCl pH 6.8, 400 mM ditiotreitol, 8% SDS, 0.4% broomfenool sinine, 40% glütserool).

WB tegemiseks valmistati 10% SDS-polüakrüülamiid geel. Lahutava ja kontsentreeriva geeliosade valmistamiseks kasutati 30% Bis-akrüülamiid (PanReac AppliChem), 1.5 M Tris-HCl pH 8.8, 10% SDS (Naxo), 10% ammonium persulfaat (Naxo), tetrametüül-etüleen-diamiin (TEMED, PanReac AppliChem) ja dH₂O. Geelile kanti 15 µl iga rakulüsati. Valkude suuruse määramiseks kasutati *PageRuler Plus* prestained valkude suurusmarkerit (Thermo Scientific). Foresivann täideti 1x SDS jooksupuhvriga (10x puhver sisaldab 0.25 M Tris-HCl pH 8.3, 1.92 M glütsiin, 1% SDS). Geelelektroforees viidi läbi 130 V juures 1.5 tundi. Edasi kanti valgud üle polüvinüülidendiidifluoriid (PVDF) membraanile, mida eelnevalt aktiveeriti metanoolis. Geeli ja membraani loputati 1x ülekandepuhvris (10x puhver sisaldab 25 mM Tris-HCl pH 8.3, 192 mM glütsiin, 20% metanool). Valkude ülekandeks paigaldati geel ja membraan transblotterisse (*Trans-Blot Turbo Transfer System*, Bio Rad) ning ülekanne toimus järgmistel tingimustel: 33 min, 25 V, 1 A. Membraan blokeeriti kas 1x TBST (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% Tween® 20) ja 5% lõssipulbri sisaldavas lahuses fosforüleerimata valkude puhul või 1x TBST-s ja 5% veise seerumalbumiini (BSA) sisaldavas lahuses fosforüleeritud valkude puhul 1 tund loksutis toatemperatuuril. Seejärel inkubeeriti membraan primaarse antikehaga: kas anti-glütseraldehyüd-3-fosfaatdehüdgenaas (GAPDH) (#5174s, Cell signaling technology), anti-NAT10 (13365-1-AP, Proteintech), anti-p100-52 (3017S, Cell signaling technology), anti-p105-50 (#13681, Cell signaling technology), anti-p65 (#8242, Cell signaling technology), anti-p65P (#3033, Cell signaling technology) või anti-RelB (#10544, Cell signaling technology). 1:1000 lahjendused tehti 1x TBST ja 5% lõssipulbrit sisaldavas lahuses fosforüleerimata valkude puhul ning 1x TBST ja 5% BSA-s fosforüleeritud valkude puhul, ning membraan inkubeeriti üleöö loksutil 4°C juures. Järgmisel päeval membraan pesti kolm korda 5 min 1x TBST-s loksutades. Edasi inkubeeriti membraanid sekundaarse antikehaga, kas anti-küülik immunoglobuliin G (IgG), mädarõika peroksüdaasiga (HrP, *horseradish peroxidase*) konjugeeritud (7074S, Cell signaling technology) või anti-hiir IgG, HrP-ga konjugeeritud (7076P2, Cell signaling technology). Antikehade lahjendused olid 1:5000 1x TBST ja 5% lõssipulbrit sisaldavas lahuses. Membraane inkubeeriti üks tund loksutil

toatemperatuuril. Peale inkubeerimist membraanid pesti kolm korda 5 min 1x TBST-s loksutil. Valkude tuvastamiseks kasutati *SuperSignal West Atto* maksimaalse tundlikkusega kemoluminestsents-substraati (Thermo Scientific) tootja protokoll järgi. Valgud visualiseeriti Li-Cor C-Digit masina abil. Saadud WB tulemused analüüsiti *GraphPad Prism 8* (Dotmatics) ja *ImageJ* (*National Institutes of Health*) programmide abil, kus mõõdeti WB bändide intensiivsust.

2.2.8 North-Western blot

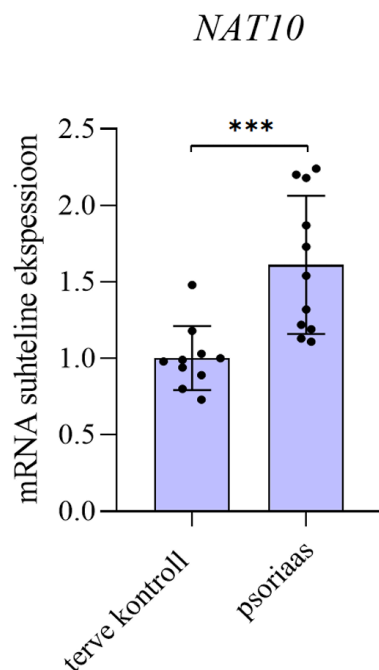
North-Western blot-i tegemiseks kasutati totaalset RNA-d NHEK rakkudest, mis transfekteeriti NAT10 või kontroll-siRNA-dega (Materjal ja meetodika 2.2.2) ning stimuleeritud Polü(I:C)-ga (Materjal ja meetodika 2.2.3). 500 ng iga RNA-d denatureeriti 5 min 95 °C juures ja jahutati kohe jää peal 2 minutit. RNA-d lahjendati dH₂O-s lõppmahuni 100 µl ning pipeteeriti Hybond N+ nailonmembraani peale (GE Healthcare), mis oli asetatud Bio-Blot 96-kannulisesse mikrofiltratsiooni seadmesse (Bio-Rad). Selleks et filtreerida RNA-d läbi membraani kasutati vaakumpumpa. Edaspidi membraan ristseoti (*crosslinked*) transilluminaatoris 254 nm UV-valguses 1,5 minuti jooksul. Seejärel blokeeriti membraan lahuses, mis sisaldas 5% lõssipulbrit ja 1x PBST (1x PBS, 0.05% Tween 20) 45 min toatemperatuuril. anti-ac4C primaarne antikeha (Abcam, ab252215) lahjendati 1:1000 lahuses, mis sisaldas 5% lõssipulbrit ja 1x PBST, ning membraani inkubeeriti 4°C juures üleöö. Järgmisel päeval pesti membraan 3 korda 5 min 1x PBST-s. Sekundaarne anti-küülik IgG, HrP-ga konjugeeritud antikeha (7074S, Cell signaling technology) oli lahjendatud 1:5000 lahuses, mis sisaldas 5% lõssipulbrit ja 1x PBST ning membraani inkubeeriti 1 tund toatemperatuuril. Sellele järgnes pesu 3 korda 5 min 1x PBST-s. RNA-de detekteerimiseks kasutati *SuperSignal West Atto* maksimaalse tundlikkusega kemoluminestsents-substraati (Thermo Scientific) tootja protokoll järgi. RNA-d visualiseeriti Li-Cor C-Digit masina abil.

Metüleensinisega värvimist kasutati RNA-de koguste võrdsuse kontrollimiseks. Töös kasutati 1% metüleensinine (Sigma), mis oli lahjendatud dH₂O-s. Kuivatatud membraan inkubeeriti 5% äädikhappes 15 min toatemperatuuril ja seejärel pesti üks kord dH₂O-ga. Jägmisena inkubeeriti membraan 0.5 M naatriumatsetaati (NaOAc, pH 5.2) ja 0.04% metüleensinist sisaldavas lahuses 10 min toatemperatuuril. Peale seda pesti membraan üks kord dH₂O-s ja uuesti pesti dH₂O-ga 1-2 minutit kuni sinine värv muutus heledamaks.

2.3 Tulemused

2.3.1 *NAT10* mRNA suhteline ekspressioon on kõrgenenud psoriaasi korral

ac4C modifikatsiooni rolli põletikulises vastuses, eriti psoriaasi kontekstis, uuriti esmalt psoriaasiga patsientidelt saadud nahabiopsiate analüüsi kaudu. Biopsiad olid kogutud Tartu Ülikooli Dermatoloogia Kliiniku Dr. Kristi Abram ja Dr. Liis Ilvese poolt. RNA eraldas Pavel Kudrin ning sellest RNA-st sünteesiti cDNA ja teostati RT-qPCR analüüs (Materjal ja meetodika 2.2.5). Kuna *NAT10* on ainus teadaolev ensüüm, mis katalüüsib ac4C modifikatsiooni, otsustati ac4C modifikatsiooni olulisust uurida just *NAT10* vahendusel. Tulemus näitas, et *NAT10* mRNA suhteline ekspressioon oli psoriaasi patsientide nahaproovides oluliselt suurenenud võrreldes tervete kontrollidega ($P \leq 0.001$, joonis 5). Selle tulemuse põhjal võib eeldada, et *NAT10* ekspressiooni tõus võib viidata ac4C võimalikule rollile psoriaasi arengus.



Joonis 5. *NAT10* suurenenud ekspressioon psoriaasi korral. *NAT10* mRNA suhtelise ekspressiooni analüüs RT-qPCR abil tervete ($n=10$) ja psoriaasiga patsientide ($n=11$) naha biopsiaproovidest. Statistilise olulisuse leidmiseks kasutati kahepoolset sõltumatute valimite Studenti t-testi, *** $P \leq 0.001$. Andmed esindavad keskmist \pm standardviga (SEM).

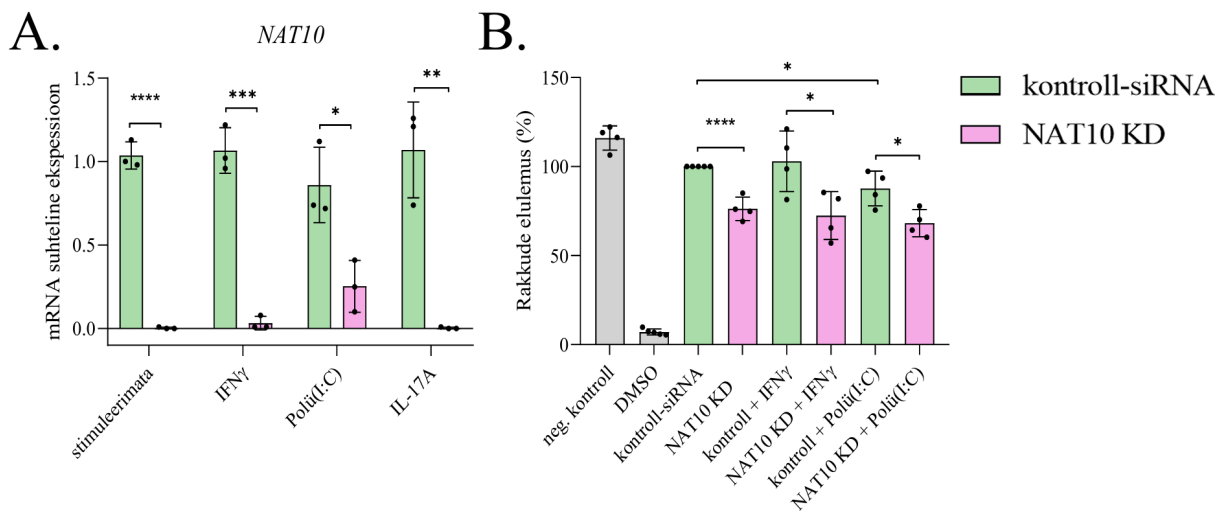
2.3.2 *NAT10* vaigistamine mõjutab stimuleeritud keratinotsüütide elulemust

ac4C modifikatsiooni edasiseks uurimiseks vaigistati *NAT10* geeniekspressioon 48 tunni jooksul kasutades *NAT10* või kontroll-siRNA-d, millele järgnes 6-tunnine stimulatsioon Polü(I:C)-ga või 24-tunnine stimulatsioon IFN γ või IL-17A-ga (Materjal ja meetodika 2.2.2; 2.2.3). Seejärel hinnati transfektsiooni efektiivsust ja sellest tulenevat *NAT10* geeni vaigistamise tõhusust. *NAT10* geeni vaigistamine oli võrreldes kontroll-siRNA-ga

transfekteeritud rakkudega edukas nii stimuleerimata kui ka Polü(I:C), IFN γ ja IL-17A stimuleerimise tingimustes (Joonis 6A). Polü(I:C) on sünteetiline immuunvastuse aktivator, mis struktuurilt sarnaneb kaheaheelalise RNA-ga, mida leidub mõnedes viirustes (Fortier jt., 2004). Kuna on leitud, et psoriaasi teke võib olla seotud mitmete viirustega, sooviti Polü(I:C) vahendusel uurida selle aspekti (Li jt., 2015). Kuna *NAT10* vaigistamine oli edukas, on tõenäoline, et kõik järgnevad erinevused geenide ekspressioonis on tingitud *NAT10* taseme langusest ning sellest tingitud ac4C modifikatsioonide vähenemisest mRNA-l.

Järgmisena hinnati NHEK rakkude elulemust põletikulistes tingimustes. Selleks transfekteeriti NHEK rakke *NAT10* või kontroll-siRNA, millele järgnes 6-tunnine stimulatsioon Polü(I:C)-ga või 24-tunnine stimulatsioon IFN γ -ga (Materjal ja meetoodika 2.2.2; 2.2.3). *NAT10* geeni vaigistamine põhjustas NHEK rakkude elulemuse statistiliselt olulise vähenemise ($P \leq 0.0001$), kuid langus jääb suhteliselt mõõdukaks (Joonis 6B). Suurem mõju on täheldatud IFN γ ja Polü(I:C) stimulatsioonide korral, viidates sellele, et *NAT10* ekspressiooni langus mõjutab rakkude elulemust mõõdukal määral, kuid ei põhjusta ulatuslikku rakusurma (Joonis 6B). Tõenäoliselt muutub vaigistamise mõju põletikulistes tingimustes olulisemaks, kuna see võib süvendada põletikuga seotud rakulist stressi ja seeläbi veelgi vähendada rakkude elulemust võrreldes normaalse olekuga.

Kuigi *NAT10* geeni ekspressioon vähenes oluliselt mRNA tasemel, ja selle põhjal eeldati, et ac4C modifikatsiooni tasemed võivad olla vähenenud, ei kajastunud see selgelt totaalses RNA-s. *North-western blot* analüüsi tulemused näitasid, et ac4C tasemed ei erinenud märgatavalt kontroll-rakkude ja *NAT10* siRNA-ga vaigistatud rakkude vahel (Lisa 2). See viitab võimalusele, et kuigi mRNA tasemel võiks eeldada ac4C tasemete langust, ei pruugi see kehtida teiste RNA tüüpide, näiteks tRNA ja rRNA kohta, kus samuti esineb ac4C modifikatsioone – eriti arvestades, et tRNA-d ja rRNA-d moodustavad ligikaudu 95% raku totaalsest RNA-st (Palazzo ja Lee, 2015).



Joonis 6. NHEK rakkude transfektsiooni edukus ja elulemus põletikulistes tingimustes.

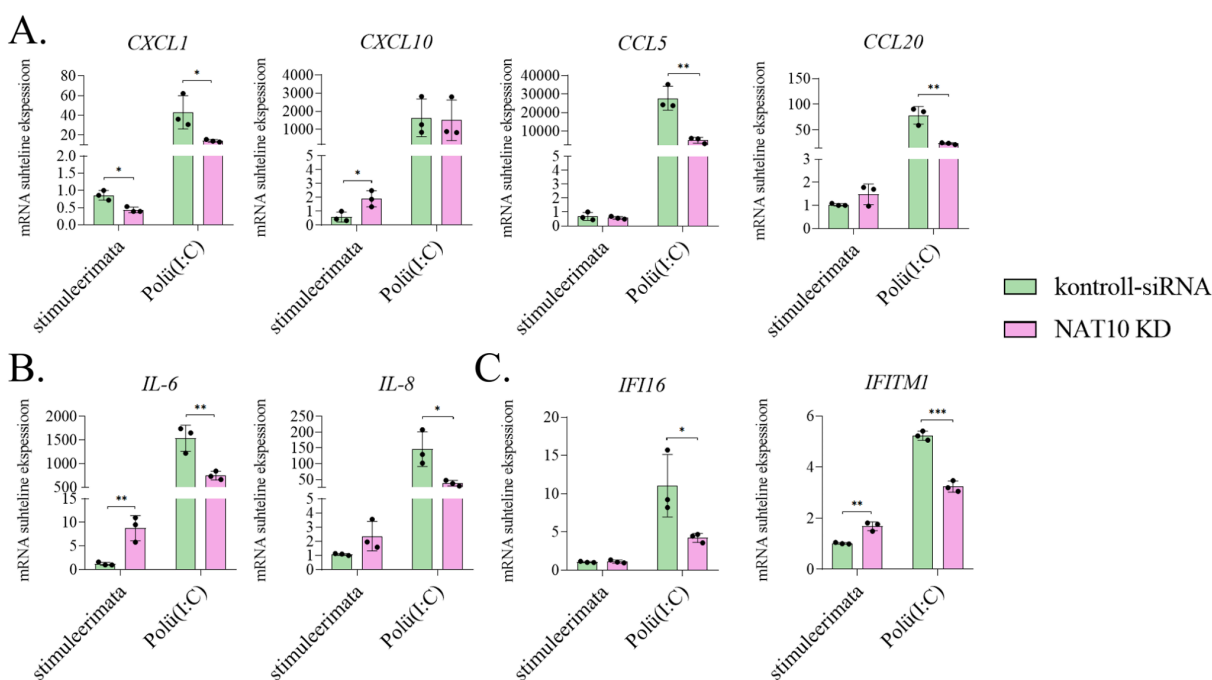
A. *NAT10* mRNA suhtelise ekspressiooni analüüs RT-qPCR abil NHEK rakkudes, mis transfekkeeriti kontroll- või *NAT10* siRNA-ga ning stimuleeriti IFN γ või IL-17A-ga 24 tundi ning Polü(I:C)-ga 6 tundi. **B.** NHEK rakkude elulemuse hindamine. Kontroll-siRNA-ga transfekkeeritud rakud on näidatud roheliste tulpadega ja *NAT10* siRNA-ga transfekkeeritud rakud on näidatud roosade tulpadega (*NAT10* KD - *knock down*). Negatiivne ja positiivne (DMSO) kontroll on näidatud hallide tulpadega. Statistilise olulisuse leidmiseks kasutati kahepoolset sõltumatute valimite Studenti t-testi, * $P \leq 0.05$, *** $P \leq 0.001$, **** $P \leq 0.0001$, tähistuseta tulemused ei ole statistiliselt olulised. Andmed esindavad keskmist \pm standardviga (SEM).

2.3.3 *NAT10* vaigistamine vähendab viirusvastust Polü(I:C)-stimulatsiooni tingimustes

Selleks, et hinnata *NAT10* geeni vaigistamise mõju viirusvastusele stimuleeriti NHEK rakke 6 tundi Polü(I:C)-ga pärast transfekkeerimist kontroll- või *NAT10* siRNA-ga (Materjal ja meetodika 2.2.2: 2.2.3). Tulemustest selgus, et *NAT10* geeni vaigistamine vähendab kemokiinide (C-X-C motiiviga kemokiini ligand 1 (*CXCL1*), *CCL5* ja *CCL20*) mRNA suhtelist ekspressiooni, mida aktiivselt toodetakse keratinotsüütide poolt, Polü(I:C)-stimuleerimise tingimustes (Joonis 7A). *CXCL1* toodetakse läbi NF- κ B ning see toimib kemotaktandina mitmetele immuunrakkudele, eriti neutrofiilidele, suunates need koekahjustuse või infektsiooni piirkonda (Wu jt., 2018; Schumacher jt., 1992). *CCL5* on proinflammatoorne kemokiin ja seda toodetakse nii NF- κ B kui ka JAK-STAT signaaliradade kaudu (Yeo jt., 2020). *CCL5* toimib samuti kemotaktandina T-rakkudele, eosinofiilidele ja basofiilidele, suunates leukotsüüte põletikukoldesse (Appay ja Rowland-Jones, 2001). Täiendavalt on ka *CCL20*, mille ekspressioon vähenes *NAT10* vaigistamise korral ja mille kõrge tase on sageli täheldatav psoriaasi puhul (Harper jt., 2009). *CCL20* meelitab T- ja B-rakke ning dendriittrakke, suunates need epiteelrakkude ja põletikukollete juurde (Thorley jt., 2005). Samuti ei mõjuta *NAT10* geeni vaigistamine oluliselt *CXCL10*, mida toodetakse läbi

JAK-STAT signaaliraja, mRNA suhtelist ekspressiooni (Panzer jt., 2008). Siiski on stimuleerimata tingimustes täheldatav statistiliselt oluline erinevus ($P \leq 0.05$) (Joonis 7A).

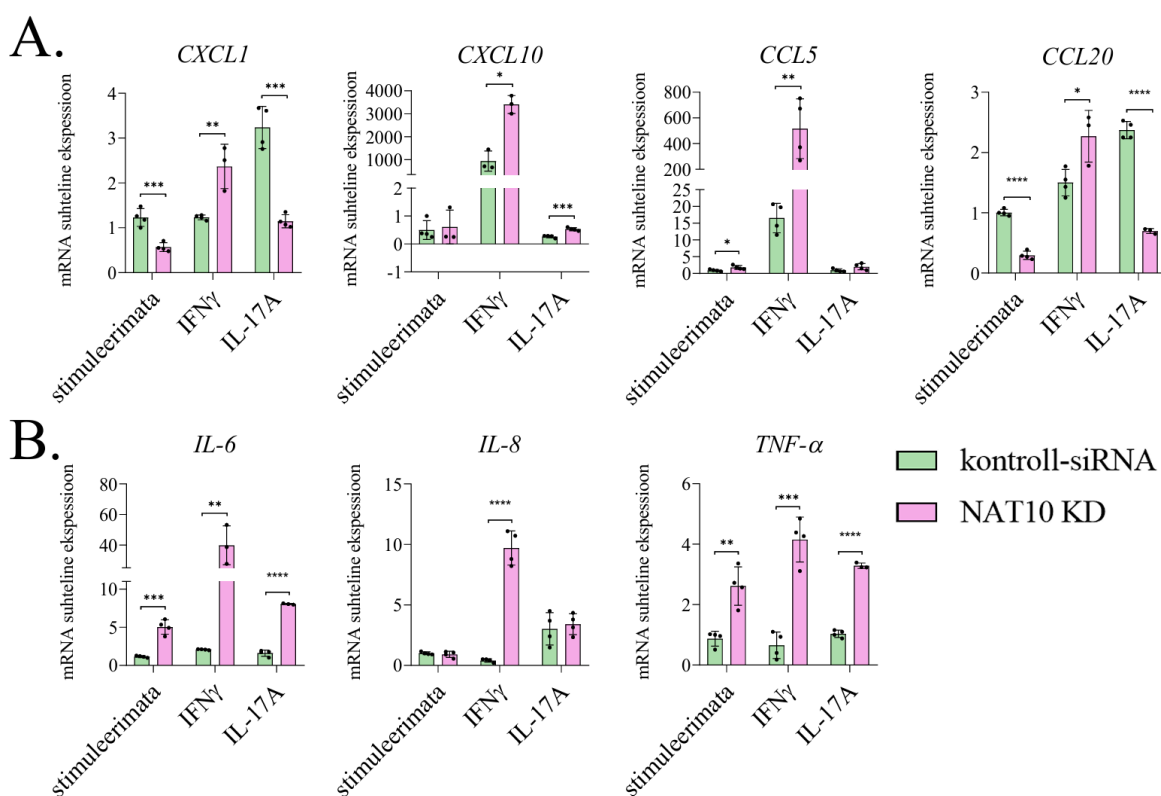
Analüüsidest põletikuliste tsütokiinide, nagu *IL-6* ja *IL-8*, mRNA suhtelist ekspressiooni, on selge, et *NAT10* vaigistamine vähendab nende ekspressiooni Polü(I:C) stimuleerimise tingimustes statistiliselt oluliselt (vastavalt $P \leq 0.001$ ja $P \leq 0.01$) (Joonis 7B). *IL-6* toodetakse nii NF- κ B kui ka JAK-STAT signaaliraja kaudu, mis ei ole iseloomulik näiteks *IL-8*-le, mida toodetakse ainult NF- κ B signaaliraja kaudu (Čokic jt., 2015; Manna ja Ramesh, 2005). Interferoon gammaga indutseeritav valk 16 (*IFI16*) ja interferooniga indutseeritud transmembranne valk 1 (*IFITM1*) on mõlemad IFN poolt indutseeritavad geenid, mille aktivatsioon toimub JAK-STAT signaaliraja kaudu (Kim jt., 2005; Zhou jt., 2007). Nende mRNA suhteline ekspressioon vähenes Polü(I:C)-ga stimuleerimise tingimustes statistiliselt oluliselt (vastavalt $P \leq 0.05$ ja $P \leq 0.001$) (Joonis 7C). Need tulemused viitavad sellele, et *NAT10* vaigistamine vähendab viirusvastust, mis võib olla tingitud ac4C modifikatsiooni puudumisest rakkudes.



Joonis 7. *NAT10* geeni vaigistamisest tingitud põletikuliste tsütokiinide ja kemokiinide mRNA suhtelise ekspressiooni muutused. A. Kemokiinide, B. Põletikuliste tsütokiinide ja C. IFN-i poolt indutseeritavate geenide mRNA suhtelise ekspressiooni analüüs RT-qPCR abil NHEK rakkudes, mis transfekteeeriti kontroll- või *NAT10* siRNA-ga ja seejärel stimuleeriti Polü(I:C)-ga. Kontroll-siRNA-ga transfekteeeritud rakud on näidatud roheliste tulpadega ja *NAT10* siRNA-ga transfekteeeritud rakud on näidatud roosade tulpadega. Statistilise olulisuse leidmiseks kasutati kahepoolset sõltumatute valimite Studenti t-testi, * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, tähistuseta tulemused ei ole statistiliselt olulised. Andmed esindavad keskmist \pm standardviga (SEM).

2.3.4 *NAT10* vaigistamine suurendab psoriaasiga seotud tsütokiinide ekspressiooni

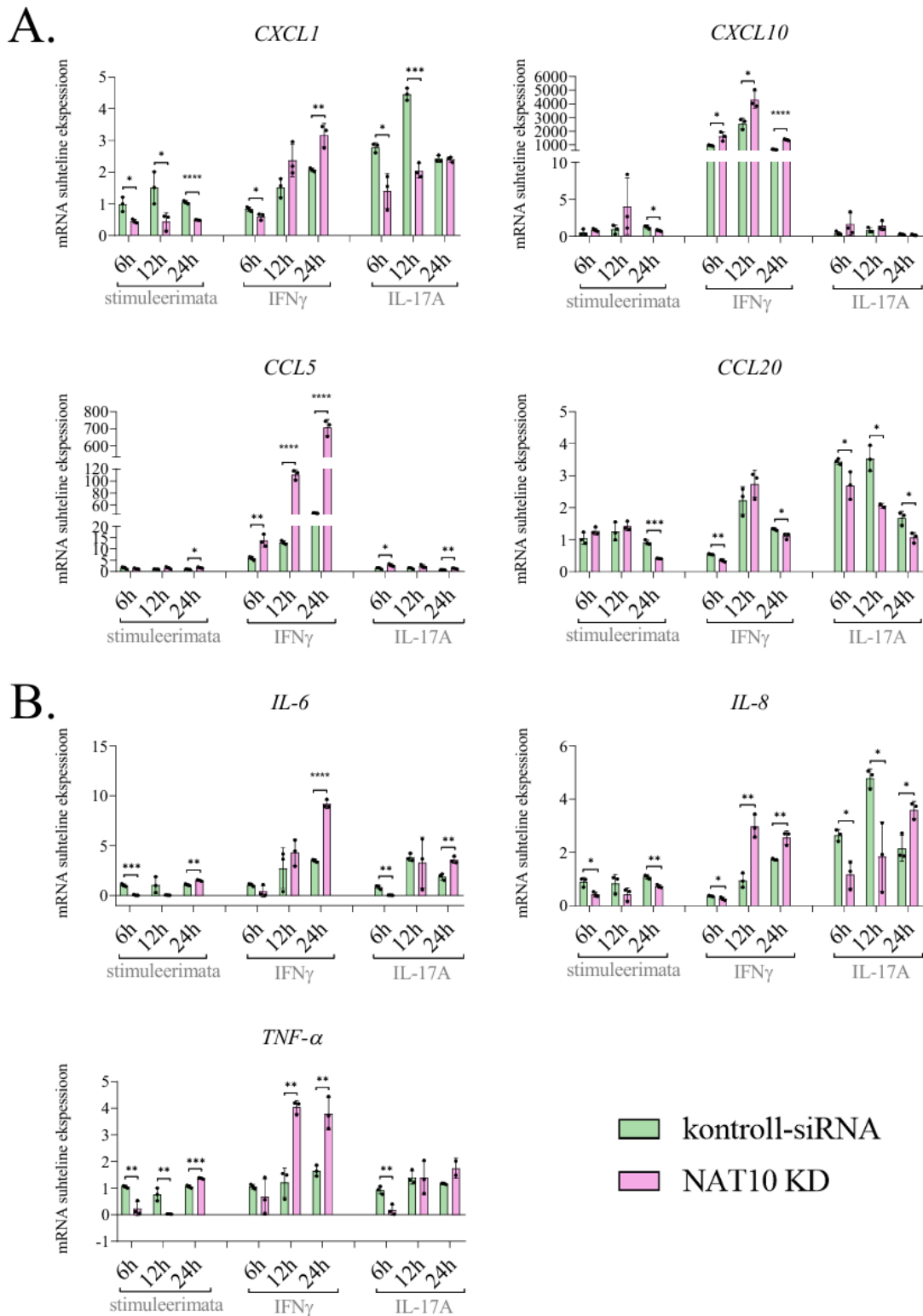
Selleks, et hinnata *NAT10* geeni vaigistamise mõju psoriaasiga seotud tsütokiinidele, stimuleeriti NHEK rakke 24 tundi jooksul IFN γ või IL-17A-ga pärast transfekteerimist kontroll- või *NAT10* siRNA-ga (Materjal ja meetodika 2.2.2; 2.2.3). *NAT10* geeni vaigistamine põhjustas mitmete põletikuliste markerite ekspressiooni statistiliselt olulist muutust. Kemokiinide hulgas täheldati *CXCL1* ja *CCL5* mRNA suhtelist ekspressiooni märkimisväärset suurenemist *NAT10* vaigistatud rakkudes IFN γ stimuleerimise tingimustes. Seevastu IL-17A stimuleerimise korral oli *CXCL1* mRNA suhteline ekspressioon märkimisväärselt langenud. Psoriaasile iseloomulikult ülesekspressseeritud *CCL20* mRNA tase vähenes oluliselt IL-17A stimuleerimise tingimustes *NAT10* vaigistamisel. Samal ajal oli *CXCL10* ekspressioon *NAT10* vaigistatud rakkudes oluliselt suurenenud, eriti IFN γ stimulatsiooni korral (Joonis 8A). Põletikuliste tsütokiinide analüüs näitas, et *IL-6*, *IL-8* ja *TNF- α* ekspressioon oli *NAT10* vaigistamisel stimuleeritud tingimustes märkimisväärselt suurenenud (Joonis 8B).



Joonis 8. *NAT10* geeni vaigistamisest tingitud kemokiinide ja põletikuliste tsütokiinide mRNA suhtelise ekspressiooni muutused. A. Kemokiinide ja B. Põletikuliste tsütokiinide mRNA suhtelise ekspressiooni analüüs RT-qPCR abil NHEK rakkudes, mis transfekeeruti kontroll- või *NAT10* siRNA-ga ning stimuleeriti IFN γ või IL-17A-ga 24 tunni jooksul. Kontroll-siRNA-ga transfekteeeritud rakud on näidatud roheliste tulpadega ja *NAT10* siRNA-ga transfekteeeritud rakud on näidatud roosade tulpadega. Statistilise olulisuse leidmiseks kasutati kahepoolset sõltumatute valimite Studenti t-testi, * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, tähistuseta tulemused ei ole statistiliselt olulised. Andmed esindavad keskmist \pm standardviga (SEM).

Võttes arvesse asjaolu, et osa põletikulised geenid võivad aktiveeruda varem kui 24 tundi, otsustati rakke stimuleerida IFN γ või IL-17A-ga 6, 12 ja 24 tunni vältel pärast transfekteerimist kontroll- või NAT10 siRNA-ga (Materjal ja meetodika 2.2.2; 2.2.3). See lähenemine võimaldab täpsemalt hinnata huvipakkuvate geenide *NAT10* vaigistamise tingimustes maksimaalset ekspresseonitaset. Tulemustest selgus, et *CXCL1* mRNA suhteline ekspressioon oli *NAT10* geeni vaigistatud rakkudes oluliselt madalam võrreldes kontroll-rakkudega IL-17A stimulatsioonil 12 ja 24 tunni ajapunktidel (Joonis 9A). Vastupidiselt sellele täheldati IFN γ stimulatsiooni korral *CXCL1* ekspressiooni mõõdukat tõusu *NAT10* vaigistamise tingimustes (Joonis 9A). *CXCL10* mRNA suhteline ekspressioon oli suurenenud *NAT10* vaigistatud rakkudes pärast IFN γ stimulatsiooni kõikides ajapunktides, viidates sellele, et *NAT10* geen võib osaleda IFN-signaalaraja reguleerimises eelkõige varajases vastuses, kuna ekspressiooni tippu täheldati 12 tunni järel (Joonis 9A). *CCL5* mRNA suhteline ekspressioon märgatavalt suurenes IFN γ stimulatsiooni korral eriti *NAT10* vaigistatud rakkudes, viidates võimalikule negatiivsele regulatsioonile *NAT10* poolt (Joonis 9A). Psoriaasile iseloomulikult ülesreguleeritud *CCL20* mRNA suhteline ekspressioon oli peaaegu kõigis stimulatsioonitingimustes ja ajapunktides oluliselt madalam *NAT10* vaigistatud rakkudes (Joonis 9A).

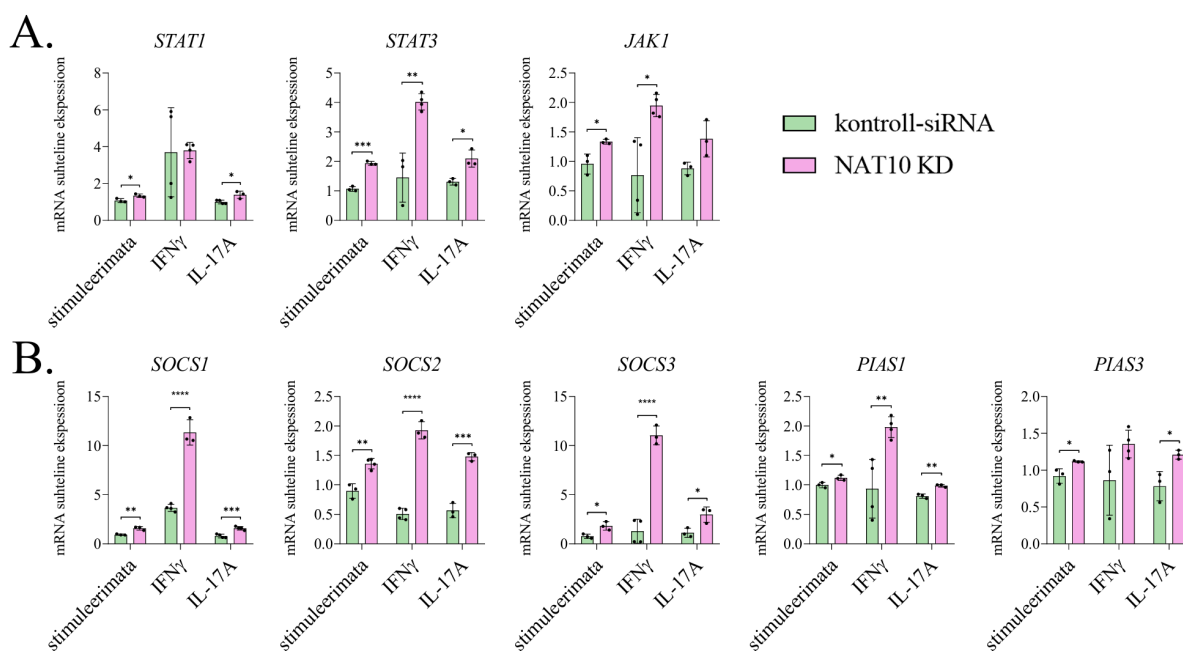
Põletikuliste tsütokiinide ekspresseonianalüüs näitas, et *IL-6* mRNA suhteline ekspressioon oli märkimisväärselt kõrgem *NAT10* geeni vaigistatud rakkudes, eriti IFN γ stimulatsioonis 12 ja 24 tunnistel ajapunktidel, viidates võimalikule *NAT10* rollile *IL-6* ekspresseoni allasurumisel (Joonis 9B). *IL-8* mRNA ekspresseon järgnes sarnasele mustrile IFN γ stimulatsiooni tingimustes, kuid IL-17A stimulatsiooni korral oli selle ekspresseon *NAT10* vaigistatud rakkudes madalam 6 ja 12 tunnistel ajapunktidel ning tõusis alles 24 tunniks (Joonis 9B). See võib viidata *NAT10* ajalisel diferentseeritud mõjule *IL-8* regulatsioonis, kus varajases faasis on ekspresseon allasurutud ning hilisemas faasis düsreguleeritud. *TNF- α* ekspresseon oli samuti kõrgem *NAT10* vaigistatud rakkudes võrreldes kontroll rakkudega, eriti IFN γ stimulatsiooni korral, kuid efekt oli tagasihoidlikum võrreldes *IL-6*-ga (Joonis 9B). Need tulemused näitavad, et *NAT10* võib mõjutada põletikuliste tsütokiinide püsivat ülesreguleerimist, mitte ainult varajast vastust, mis on selgelt täheldatud *IL-6* ja *TNF- α* puhul.



Joonis 9. NAT10 geeni vaigistamisest tingitud põletikuliste tsütokiinide ja kemokiinide mRNA suhtelise ekspressiooni muutused 6, 12 ja 24 tunni ajapunktides. A. Kemokiinide ja **B.** Põletikuliste tsütokiinide mRNA suhtelise ekspressiooni analüüs RT-qPCR abil NHEK rakkudes, mis transfekeeriti kontroll- või NAT10 siRNA-ga ning stimuleeriti IFN γ või IL-17A-ga. Kontroll-siRNA-ga transfekeeritud rakud on näidatud roheliste tulpadega ja NAT10 siRNA-ga transfekeeritud rakud on näidatud roosade tulpadega. Statistilise olulisuse leidmiseks kasutati kahepoolset sõltumatute valimite Studenti t-testi, * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, tähistuseta tulemused ei ole statistiliselt olulised. Andmed esindavad keskmist \pm standardviga (SEM).

2.3.5 *NAT10* vaigistamine suurendab JAK-STAT signaaliraja negatiivsete regulaatorite ekspressiooni

Kuna eelnevalt täheldati *NAT10* vaigistamisest tingitud muutusi JAK-STAT signaalirajas osalevate geenide ekspressioonis (Tulemused 2.3.3), sooviti täiendavalt uurida suuremat hulka gene, mis osalevad JAK-STAT signaalirajas. Tulemused näitasid, et *STAT1*, *STAT3* ja *JAK1* ekspressioonid olid *NAT10* vaigistatud rakkudes kõrgemad võrreldes kontroll rakkudega (Joonis 10A). Analüüsid JAK-STAT signaaliraja negatiivseid regulaatoreid *SOCS1*, *SOCS2* ja *SOCS3*, ilmnnes, et nende mRNA suhteline ekspressioon oli *NAT10* vaigistatud rakkudes märkimisväärselt kõrgem võrreldes kontroll rakkudega, eriti pärast IFN γ stimuleerimist (Joonis 10B). Samuti täheldati *PIAS1* ja *PIAS3* ekspressiooni suurenemist, kuigi mõju oli mõõdukam võrreldes *SOCS* geenidega (Joonis 10B). See võib olla tingitud kompensatsioonsetest mehhanismidest rakkudes, kus rakk püüab tasakaalustada muutunud *STAT*-ide aktiivsust, suurendades seeläbi negatiivsete regulaatorite ekspressiooni. Kokkuvõttes näitavad need tulemused, et *NAT10* geeni vaigistamine võib põhjustada signaaliülekanne suurenemise, mis omakorda kutsub esile kompensatoorsed mehhanismid, nagu negatiivsete regulaatorite (*SOCS* ja *PIAS*) ekspressiooni suurenemise.

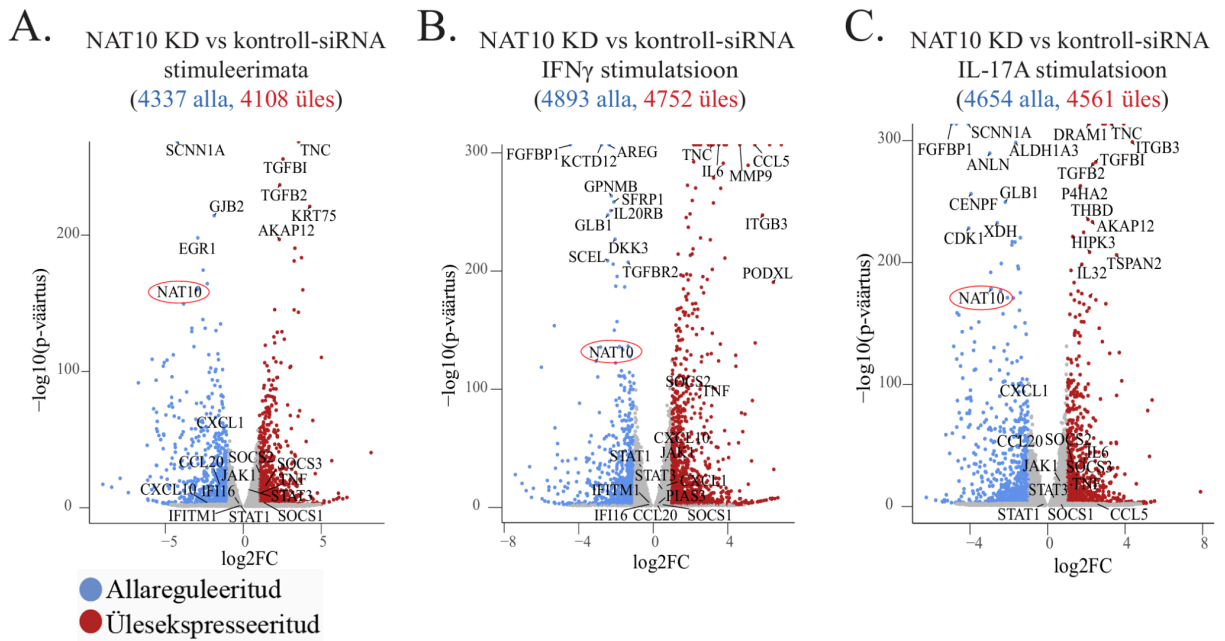


Joonis 10. *NAT10* geeni vaigistamisest tingitud JAK-STAT signaaliraja komponentide mRNA suhtelise ekspressiooni muutused. A. JAK-STAT signaaliraja komponentide ja **B.** JAK-STAT signaaliraja negatiivsete regulaatorite mRNA suhtelise ekspressiooni analüüs RT-qPCR abil NHEK rakkudes, mis transfekteeeriti kontroll- või *NAT10* siRNA-ga ning stimuleeriti IFN γ või IL-17A-ga 24 tundi. Kontroll-siRNA-ga transfekteeeritud rakud on näidatud rohelistes tulpadega ja *NAT10* siRNA-ga transfekteeeritud rakud on näidatud roosades tulpadega. Statistilise olulisuse leidmiseks kasutati kahepoolset sõltumatute valimite Studenti t-testi, * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, tähistuseta tulemused ei ole statistiliselt olulised. Andmed esindavad keskmist \pm standardviga (SEM).

2.3.6 Geeniekspressiooni muutuste analüüs RNA sekveneerimise andmete põhjal

Selleks, et kaardistada laiaulatuslikult geeniekspressiooni muutusi *NAT10* geeni vaigistamise korral, viidi läbi RNA sekveneerimine (Materjal ja meetodika 2.2.6). Selleks transfekteeriti NHEK rakke NAT10- või kontroll-siRNA-ga 48 tunni jooksul, millele järgnes 24-tunnine stimulatsioon IFN γ või IL-17A-ga (Materjal ja meetodika 2.2.2; 2.2.3). Erinevalt avaldunud geenide analüüsi käigus hinnati geenide ekspressioonimuutuste ulatust ning nende muutuste statistilist olulisust kontroll- või *NAT10* vaigistatud rakkude vahel erinevate stimulatsiooni tingimuste korral. Analüüs viidi läbi Galaxy platvormil (<https://usegalaxy.org/>), kus kasutati korrigeeritud p-väärtusi (*adjusted p-value*), mis näitavad statistilise olulisuse taset ja log₂-muutust (*log₂ fold change, log₂FC*), mis näitab kui palju on geenide avaldumise tase muutunud *NAT10* vaigistamise korral võrreldes kontroll-rakkudega. Statistilise olulisuse piirväärtuseks (*significance threshold*) määrati 0.01 ning visualiseerimiseks kasutati log₂FC (*log₂FC threshold to colour*) piirväärtust 1. Antud andmete põhjal koostati kolm vulkaanograafikut, mis näitasid nii üles- kui allareguleeritud geenid kõigis stimulatsiooni tingimustes.

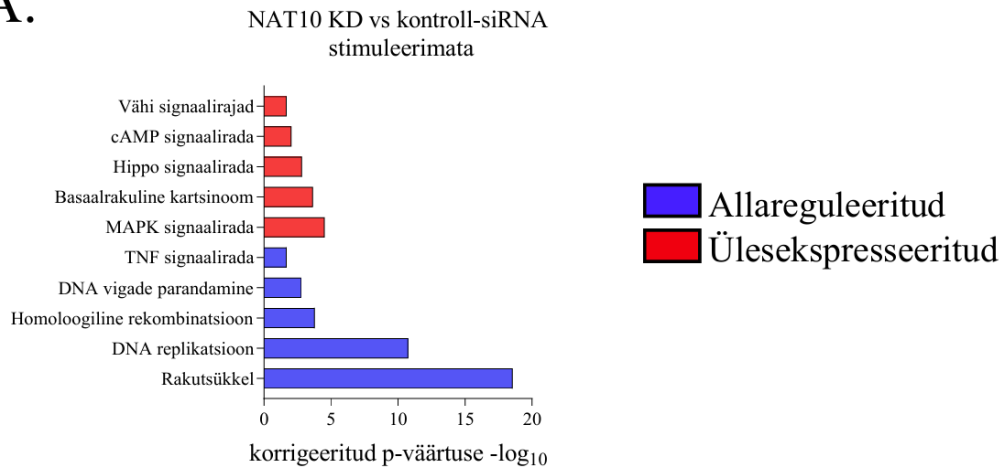
Stimuleerimata tingimustes tuvastati kokku 8445 erinevalt avaldunud geeni, millest 4108 olid ülesekspressioneeritud ja 4337 allareguleeritud (Joonis 11A). IFN γ stimulatsioon suurendas muutunud geenide koguarvu 9645-ni, millest 4752 olid ülesekspressioneeritud ja 4893 allareguleeritud (Joonis 11B). IL-17A stimulatsioon andis samuti suure arvu erinevalt avaldunud geeni: kokku 9215 geeni, millest 4651 olid ülesekspressioneeritud ja 4654 allareguleeritud (Joonis 11C). Võrreldes stimuleerimata tingimustega suurendasid mõlemad põletikulised stimulatsioonid oluliselt erinevalt ekspresseerivate geenide arvu, viidates sellele, et *NAT10* roll rakus on tugevam just põletikulises kontekstis. *NAT10* oli kõikides tingimustes oluliselt allareguleeritud, kinnitades edukat vaigistamist ning tagades, et täheldatud muutused tulenevad *NAT10* ekspressiooni langusest (Joonis 11).



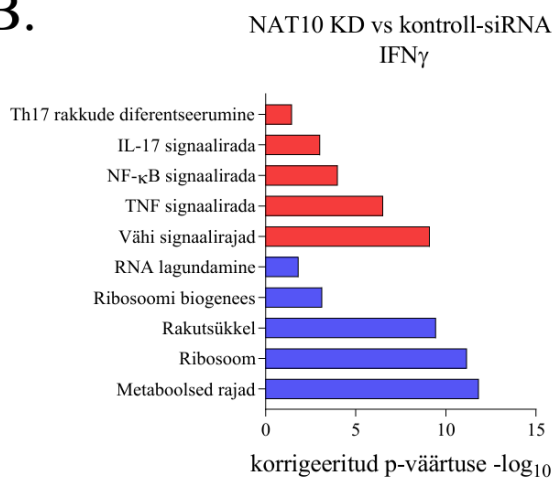
Joonis 11. Erinevalt avaldunud geenid *NAT10* geeni vaigistamise korral. A. Stimuleerimata, B. IFN γ stimulatsiooni ja C. IL-17A stimulatsiooni tingimustes erinevalt avaldunud geenide visualiseerimine vulkaanograafikutel. Analüüs viidi läbi NHEK rakkudes, mis eelnevalt transfekteeriti kontroll- või *NAT10* siRNA-ga ja stimuleeriti IFN γ või IL-17A-ga. Ülesekspressioonitud geenid näidatud punase värviga ja allareguleeritud geenid sinise värviga. Statistiliselt mitteolulised geenid on näidatud halli värviga. X-teljel on toodud log₂-muutus (\log_2FC) ja Y-teljel korrigeeritud p-väärtuse negatiivne kümnendlogaritm ($-\log_{10}$).

Selleks, et saada laiem ülevaade *NAT10* geeni vaigistamisega seotud muutustest rakkudes, viidi läbi Kyoto geenide ja genoomide entsüklopeedia (KEGG) põhjal signaaliradade rikastumisanalüüs, mis võimaldas tuvastada, millised bioloogilised protsessid või signaalirajad olid statistiliselt oluliselt mõjutatud erinevates stimulatsioonitingimustes. Analüüs viidi läbi tarkvaraga g:Profiler (<https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/gost>) kasutades sisendina üles- ja allareguleeritud geenide nimekirja, mille log₂-muutus oli suurem või võrdne 0,5 (ülesekspressioonitud) või väiksem või võrdne -0,5 (allareguleeritud). Seejärel valiti välja viis kõige olulisemalt üles- ja viis allareguleeritud signaalirada või bioloogilist protsessi. Tulemused näitasid, et kõikides stimulatsioonides olid kõige olulisemalt allareguleeritud protsessid seotud rakutsükli reguleerimisega ja DNA replikatsiooniga, mis on kooskõlas *NAT10* olulisusega nende protsesside reguleerimisel (Joonis 12A). Samal ajal ilmnes märgatav ülesekspressioon vähi, cAMP ja Hippo signaaliradades, mis võivad viidata proliferatsiooni ja kasvu signaalsiooni muutustele (Joonis 12A). IFN γ stimulatsiooni tingimustes täheldati allaregulatsiooni peamiselt metaboolsetes radades, ribosoomi biogeneesis ja rakutsükliga seotud protsessides (Joonis 11B). Põletikuga seotud signaalirajad, nagu NF- κ B, TNF ja IL-17 signaalirada, olid kõikides stimulatsioonides düsreguleeritud, mis viitab, et *NAT10* vaigistamine moduleerib põletikuliste signaaliradade aktiivsust (Joonis 12B).

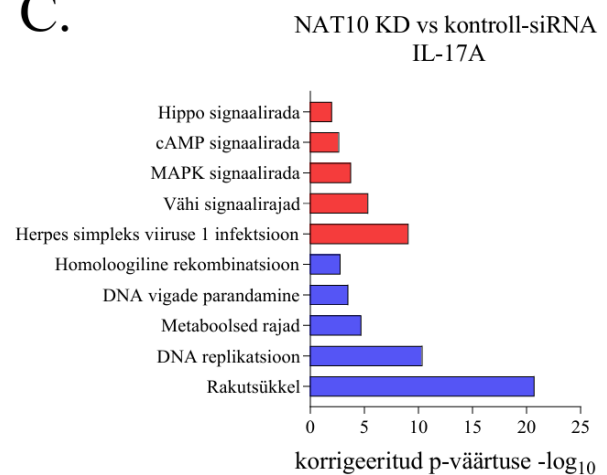
A.



B.



C.



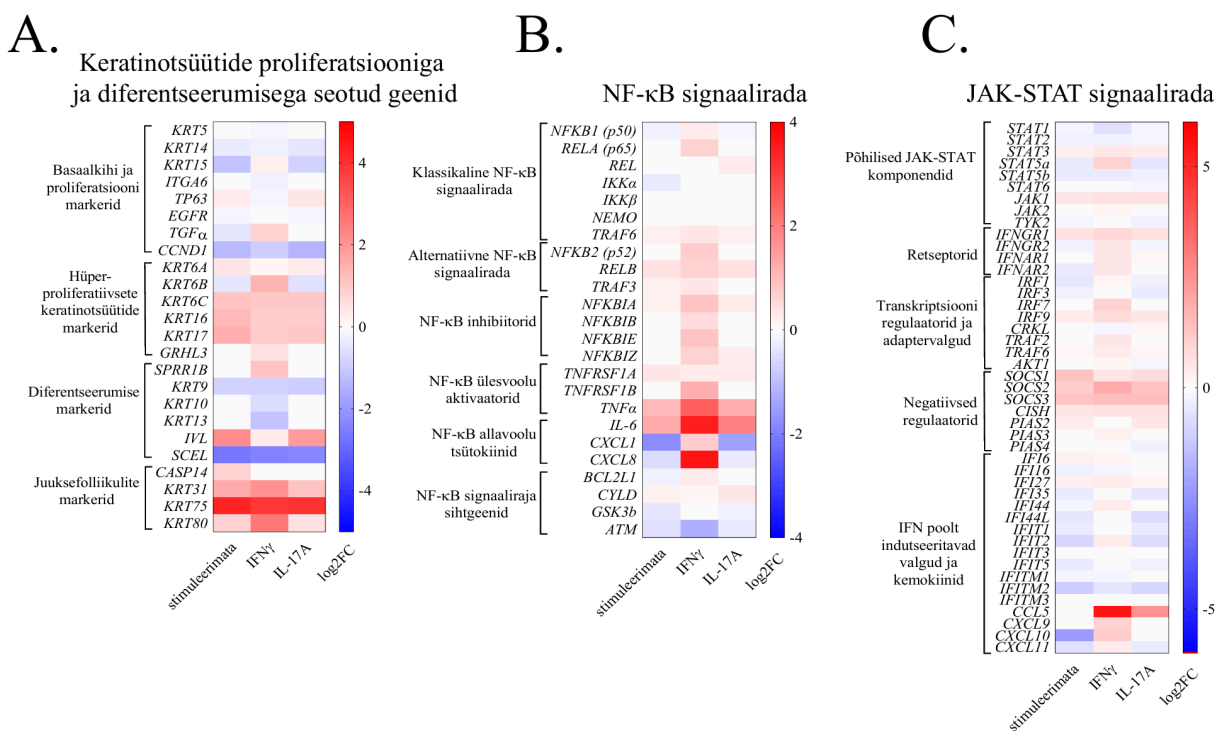
Joonis 12. Erinevalt avaldunud geenide KEGG põhine signaaliradade analüüs *NAT10* geeni vaigistamise korral. A. Stimuleerimata, B. IFN γ stimulatsiooni ja C. IL-17A stimulatsiooni tingimustes erinevalt avaldunud geenide visualiseerimine. Analüüs viidi läbi NHEK rakkudes, mis transfekteeriti kontroll- või *NAT10* siRNA-ga ning stimuleeriti IFN γ või IL-17A-ga. Ülesekspressioonid on näidatud punase värviga ja allareguleeritud geenid sinise värviga. X-teljel on toodud korrigeeritud p-väärtuse negatiivne kümnendlogaritm ($-\log_{10}$), ning Y-teljel statistilisemalt kõige olulisemalt mõjutatud bioloogilised protsessid või signaalirajad.

Võttes arvesse eelnevalt saadud tulemusi (Tulemused 2.3.1-2.3.5) ja signaaliradade rikastumisanalüüsi (Joonis 12), visualiseeriti spetsiifilisi rajasõltuvaid mustreid detailsema ülevaade saamiseks keratinotsüütide proliferatsiooni ja diferentseerumise (Joonis 13A) ning NF- κ B- ja JAK-STAT signaaliradade (Joonis 13B, C) aktiivsusest. Ekspressioonimustrite koostamisel võeti aluseks vastavate geenide \log_2 -muutuse väärtused. Tulemused näitavad, et pärast *NAT10* vaigistamist suurenes mitmete hüperproliferatiivsete keratinotsüütide markerite ekspressioon, eriti IFN γ stimulatsiooni tingimustes (Joonis 13A). See viitab võimalusele, et *NAT10* puudumine soodustab keratinotsüütide aktiveerimist ja stressivastust, mille tulemusena võivad nad soodustada immuunrakkude ligimeelitamist – universaalset

immunoloogilist mehhanismi, mis mängib aga psoriaasi patogeneesis eriti kesksel rolli (Albanesi jt., 2018). Vastupidiselt jäid normaalse proliferatsiooniga seotud markerite ekspresioonitasemed muutumatuks või muutusid vaid vähesel määral (Joonis 13A). Keratinotsüütide diferentseerumise markerite ekspressioon oli enamasti allareguleeritud, mis viitab sellele et rakud püsivad proliferatiivses seisundis ega läbi efektiivset diferentseerumist küpsesse epidermise rakukihti (Joonis 13A). Need andmed viitavad sellele, et *NAT10* võib osaleda keratinotsüütide proliferatsiooni ja diferentseerumise tasakaalu reguleerimisel.

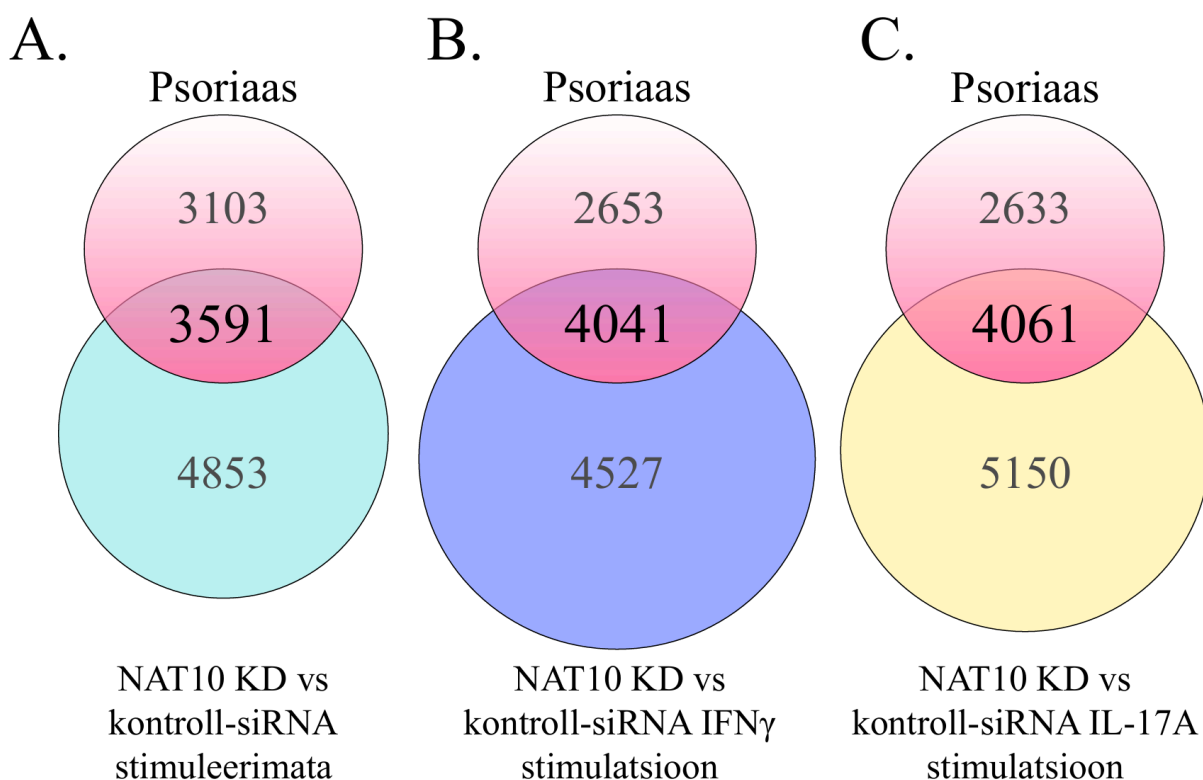
NF- κ B signaaliraja analüüs näitas, et *NAT10* vaigistamise mõju oli eriti märgatav IFN γ stimulatsiooni tingimustes. Täheldati ülesvoolu aktivaatorite, nagu *TNF- α* , ekspressiooni tõusu, lisaks allavoolu tsütokiinide (nt *IL-6*) ülesregulatsiooni, kuid sellega kaasnes mõningane *CXCL1* ja *CXCL8* ekspressiooni langus (Joonis 13B). Lisaks ilmnes, et alternatiivse NF- κ B signaaliraja komponentide (*p52*, *RELB* ja *TRAF3*) ekspressioon oli kõrgem võrreldes klassikalise signaalirajaga, viidates, et alternatiivne rada võib olla *NAT10* vaigistamise tingimustes aktiivsem (Joonis 13B). NF- κ B inhibiitorite ekspressiooni suurenemine oli samuti märgatav, eriti IFN γ stimulatsiooni korral, mis viitab negatiivse tagasiside mehhanismide aktiveerimisele põletikulise vastuse reguleerimiseks (Joonis 13B).

JAK-STAT signaaliraja analüüs näitas, et *NAT10* vaigistamine põhjustab mitmete IFN-vahendatud vastuse komponentide ülesregulatsiooni. Erinevalt teistest uuritud geenirühmadest oli eriti märgatav negatiivsete regulaatorite, nagu *SOCS1*, 2 ja 3, ekspressiooni suurenemine ja tugev *CCL5* ülesregulatsioon (Joonis 13C). Need muutused kinnitavad IFN γ -indutseeritud põletikulise vastuse aktiveerumist *NAT10* vaigistamise tingimustes.



Joonis 13. Erinevalt avaldunud geenide analüüs spetsiifiliste signaaliradade kontekstis *NAT10* geeni vaigistamise korral. A. Keratinotsüütide proliferatsiooniga ja diferentseerumisega seotud geenid, B. NF-κB ja C. JAK-STAT signaalirajas osalevad geenid. Analüüs viidi läbi NHEK rakkudes, mis transfekteeeriti kontroll- või *NAT10* siRNA-ga ning stimuleeriti IFN γ või IL-17A-ga. Vasakpoolsel Y-teljel on toodud geenide nimed ja nende kuuluvus rühmadesse, parempoolsel Y-teljel aga log₂-muutus. Ülesekspresseritud geenid on näidatud punase värviga ja allareguleeritud geenid sinise värviga. Muutumatu ekspressiooniga geenid on näidatud valge värviga.

Viimasena võrreldi erinevalt avaldunud geenide kattuvust psoriaasile iseloomulike geenimuudatuste ning *NAT10* siRNA-ga vaigistatud rakkude geeniekspressiooniprofiilide vahel erinevates stimulatsioonitingimustes. Psoriaasi geeniprofiili andmed on kättesaadavad GEO andmebaasis (GSE121212; Tsoi jt., 2019). Venn-diagrammid olid koostatud Venny 2.1.0 programmis (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>) ning koostamisel võeti arvesse nii üles- kui ka allareguleeritud geenid. Psoriaasi geeniprofiili puhul oli geenide koguarv 6698. Stimuleerimata tingimustes analüüsiti kokku 8445 geeni, millest 3591 kattusid psoriaasile iseloomulike geenidega (Joonis 14A). IFN γ stimulatsioonis analüüsiti 9645 geeni, ning selle stimulatsiooni korral suurenes kattuvate geenide arv 4041-ni, viidates võimalikule sarnasusele psoriaatilise geeniekspressiooni profiiliga (Joonis 14B). IL-17A stimulatsiooni korral analüüsiti 9215 geeni, millest kattuvate geenide absoluutarv oli veelgi suurem - 4061 geene, võrreldes eelmiste stimulatsioonidega (Joonis 14C). Ülejäänud geenid esinesid kas ainult *NAT10* vaigistatud rakkudes või olid iseloomulikud ainult psoriaasile, moodustades vastavalt iga võrdluse eraldiseisvad sektorid. Kokkuvõtvalt viitavad tulemused sellele, et *NAT10* vaigistamise korral võivad toimuda sarnased geeniekspressiooni muutused nagu psoriaasis, eriti IFN γ ja IL-17A stimulatsiooni tingimustes.



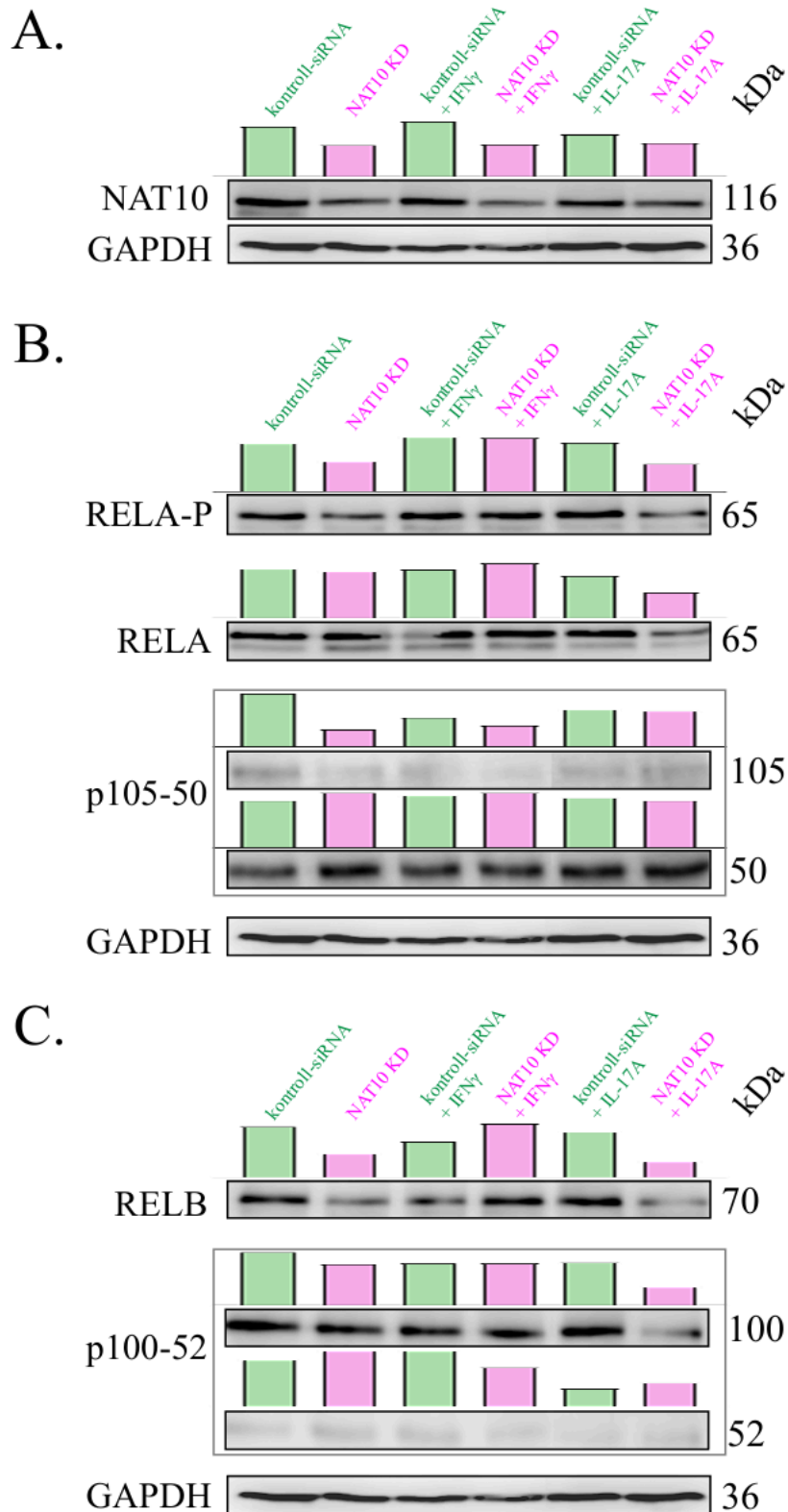
Joonis 14. Erinevalt avaldunud geenide kattuvus psoriaasile iseloomuliku ja NAT10 siRNA-ga vaigistatud rakkude ekspresiooniprofilide vahel. A. Stimuleerimata, **B.** IFN γ stimulatsiooni ja **C.** IL-17A stimulatsiooni tingimustes erinevalt avaldunud geenide kattuvuse psoriaasiprofiiliiga visualiseerimine Venn diagrammidena. Analüüs viidi läbi NHEK rakkudes, mis transfekkeeriti kontroll- või NAT10 siRNA-ga ning stimuleeriti IFN γ või IL-17A-ga. Diagrammides on näidatud kattuvate geenide absoluutarv iga stimulatsiooni tingimuse jaoks. Ülejäänud geenid esinesid kas ainult *NAT10* vaigistatud rakkudes või olid iseloomulikud ainult psoriaasile, moodustades vastavalt iga võrdluse eraldiseisvad sektorid.

2.3.7 *NAT10* vaigistamine toetab klassikalise ja häirib alternatiivse NF- κ B signaaliraja valkude ekspressiooni

Järgmisena teostati WB analüüs (Materjal ja meetodika 2.2.8), et selgitada, kas *NAT10* geeni vaigistamine mõjutab NF- κ B signaaliraja komponentide ekspressiooni ja aktiivsust ka valgu tasemel, pakkudes terviklikumat ülevaadet *NAT10* geeni regulaatorsest rollist. Selleks transfekkeeriti rakke NAT10- või kontroll-siRNA-ga ning stimuleeriti IFN γ või IL-17A-ga (Materjal ja meetodika 2.2.2; 2.2.3). Kuna *NAT10* edukas vaigistamine oli eelnevalt kinnitatud mRNA tasemel, hinnati selle efektiivsust ka valgu tasemel. Tulemused näitasid, et NAT10 valgu tase märgatavalt vähenes *NAT10* vaigistatud rakkudes võrreldes kontroll-siRNA rakkudega. Kontrollvalgukuks kasutati GAPDH, kuna võis eeldada, et selle ekspressioon ei muutunud kasutatud katsetingimustes. See tulemus kinnitab efektiivset *NAT10* geeni vaigistamist, mis edaspidi loob võimalusi hinnata *NAT10* mõju NF- κ B signaaliraja komponentidele (Joonis 14A).

Kanoonilises NF- κ B signaalirajas osalevad mitmed valgud, näiteks RELA (p65), p105 (prekursorvalk) ja p50 (NF- κ B1). Tulemused näitavad, et *NAT10* vaigistamine mõjutab RELA valgu aktiivsust, mida hinnati selle fosforüleerimise taseme kaudu (RELA-P), samas kui kogu RELA ekspressioonitase jäi suhteliselt muutumatuks (Joonis 15B). Erinevust on näha eriti IL-17A stimuleerimise puhul, kus *NAT10* geeni vaigistatud rakkudes on fosforüleeritud RELA bänd märgatavalt nõrgem võrreldes kontroll-rakkudega (Joonis 15B). NF- κ B signaaliraja aktiveerimisel toimub p105 ubikvitineerimine ja osaline proteasoomne degradeerimine, mille käigus eemaldatakse C-terminaalne inhibeeriv domeen (Sears jt., 1998). Selle protsessi tulemusena moodustub aktiivne p50 subühik, mis on võimeline seonduma RELA-ga, moodustades koos transkriptsiooniliselt aktiivse kompleksi (Harhaj ja Sun, 1999). Tulemused näitasid, et *NAT10* vaigistamise korral p105 valgu tase veidi väheneb, samas aga p50 puhul jääb selle valgu tase samasuguseks kõikides stimulatsioonides (Joonis 15B). Antud tulemus võib viidata sellele, et *NAT10*-l on toetav roll klassikalise NF- κ B signaaliraja aktiveerimisel, soodustades p65 fosforüleerimist ja p105 protsessimist p50-ks.

Alternatiivses NF- κ B signaalirajas mängivad olulist rolli sellised valgud nagu RELB, p100 (prekursorvalk) ja p52 (NF- κ B2). Tulemused näitavad, et RELB ekspressioon oli *NAT10* vaigistamise korral kõrgenenud IFN γ stimulatsiooni korral, samas kui IL-17A stimulatsiooni korral oli vastupidine efekt (Joonis 15C). p100 valgu proteolüütiline töötlemine p52-ks toimub sarnasel viisil nagu p105 protsessimine p50-ks. Vabastatud p52 subühik on võimeline moodustama kompleksi RELB-ga ning sisenema tuuma ja aktiveerima sihtgeenide transkriptsiooni (Bren jt., 2001). p100 valgu tase oli IFN γ stimulatsiooni korral *NAT10* vaigistatud rakkudes veidi madalam, kuid märgatavalt suurem efekt ilmnes IL-17A-ga stimuleeritud tingimustes, kus *NAT10* vaigistatud rakkudes on palju nõrgem bänd kui kontroll-rakkudes (Joonis 15C). p52 valgu tase erinevates tingimustes jäi üldiselt sarnaseks, kuigi IL-17A stimulatsiooni korral p52 tase oli madal. Siiski ei olnud olulisi erinevusi *NAT10* vaigistatud ja kontrollrakkude vahel (Joonis 15C). Kuna p52 protsessimine p100-st on alternatiivse NF- κ B signaaliraja oluline etapp, võib antud tulemus viidata sellele et *NAT10* puudumise korral võib selle signaaliraja aktivatsioon olla osaliselt pärsitud või muutunud.



Joonis 15. NF- κ B signaalirajas osalevate valkude ekspressiooni analüüs WB abil. A. NAT10 valgu ekspressiooni vähenemine *NAT10* vaigistatud rakkudes. **B.** Klassikalises ja **C.** Alternatiivses NF- κ B signaalirajas osalevate valkude ekspressiooni analüüs NHEK rakkudes, mis transfekeeriti kontroll- või NAT10 siRNA-ga ning stimuleeriti IFN γ või IL-17A-ga. Kontroll-siRNA-ga transfekeeritud rakud on näidatud roheliste tulpadega ja NAT10 siRNA-ga transfekeeritud rakud on näidatud roosade tulpadega. Valkude teoreetilised molekulmassi väärtused on esitatud kilodaltonites (kDa). WB tulemuste kvantitatiivne analüüs on normaliseeritud GAPDH ekspressioonitaseme suhtes.

2.4 Arutelu

Antud magistritöö eesmärk oli selgitada RNA modifikatsiooni ac4C ja selle ainukese teadaoleva ensüümi NAT10 võimalikku rolli NHEK rakkude põletikulises vastuses, keskendudes spetsiifiliselt psoriaasi patogeneesile ja peamistele signaaliradadele nagu NF- κ B ja JAK-STAT. Kuna NAT10 valku ekspresseeritakse suurimas koguses keratinotsüütides, mis moodustavad umbes 95% epidermisest, keskenduti selle uurimisel just NHEK rakkudele. Lisaks üritati hinnata NAT10 rolli psoriaasis – haiguses, mille olemasolevad ravivõimalused ei ole piisavalt tõhusad selle täielikuks kõrvaldamiseks.

Tulemused näitasid, et *NAT10* mRNA suhteline ekspressioon oli ülesreguleeritud psoriaatilises nahas, viidates seeläbi ac4C modifikatsiooni võimalikule osalusele haiguse patogeneesis. *NAT10* vaigistamine mõjutas keratinotsüütide elulemust mõõdukal määral, eriti põletikusoodustavate stimulatsioonide puhul nagu IFN γ ja Polü(I:C). See viitab sellele, et *NAT10* võib osaleda stressivastuse kujunemises, võimaldades rakkudel paremini toime tulla põletikuga. Vaatamata edukale *NAT10* mRNA taseme vähendamisele, ac4C tasemed totaalses RNA-s jäid muutumatuks, mis tõenäoliselt tuleneb tRNA ja rRNA domineerivast osakaalust, ning nendes säilinud ac4C modifikatsioonidest. Edasised uuringud on vajalikud, et teha kindlaks, millised muutused toimuvad peale *NAT10* vaigistamist tRNA ja rRNA-del.

NAT10 vaigistamine vähendas keratinotsüütides viirusvastust, kui neid stimuleeriti Polü(I:C)-ga, viidates, et *NAT10* võib potentsiaalselt osaleda viirusvastuse kujunemises, mis on kooskõlas mõnede varasemate uuringutega (Yan jt., 2023). Antud teadmine võib olla oluline psoriaasi patogeneesi uurimisel, kuna on leitud et mitmed viirused (HIV ja HPV) võivad olla seotud psoriaasi tekkega (Rademaker jt., 2019). Samas tulemustest selgus, et *NAT10* vaigistamine mõjutab mitmete psoriaasiga seotud kemokiinide ja tsütokiinide ekspressiooni. Kuna erinevates tingimustes täheldati nii üles- kui ka allareguleerimist, näitab see, et *NAT10* ei toimi universaalse transkriptsioonilise inhibiitori ega aktivaatorina, vaid reguleerib põletikuradade aktiivsust rakusisese signalisatsiooni tüübist ja põletikulise signaali iseloomust sõltuvalt. Huvitaval kombel oli *CCL20*, mis on psoriaasile iseloomulikult ülesreguleeritud, *NAT10* vaigistamise tingimustes IL-17A stimulatsiooni korral oluliselt allareguleeritud, viidates, et *NAT10* võib osaleda IL-17A-vahendatud põletikulise signalisatsiooni positiivses regulatsioonis.

Psoriaasi patogeneesis osalevad NF- κ B ja JAK-STAT signaalirajad, mille regulatsioon oli mõjutatud *NAT10* geeni vaigistamise korral, viidates *NAT10* osalusele põletikuliste signaalide

modulatsioonis. *NAT10* vaigistatud rakkudes oli suurenenud nii JAK-STAT signaaliraja põhiliste komponentide (*STAT1*, *STAT3* ja *JAK1*) kui ka selle negatiivsete regulaatorite (*SOCS*-id ja *PIAS*-id) ekspressioon. See viitab, et *NAT10* võib aktiveerida või võimendada JAK-STAT signaaliraja, mistõttu tekib tasakaalustav tagasisidemehhanism, mis tõstab pärssivate geenide aktiivsust.

NF- κ B signaaliraja osas täheldati, et *NAT10* puudumine võib toetada klassikalise signaaliraja aktivatsiooni, soodustades *RELA* fosforüleerimist ja p105 protsessimist p50-ks. Lisaks *NAT10* võib häirida alternatiivses signaalirajas p100 töötlemist p52-ks. Märkimisväärne on see, et *RELB*, mis on alternatiivse signaaliraja oluline komponent, oli *NAT10* vaigistatud rakkudes mRNA tasemel ülesreguleeritud, samas kui valgu tasemel täheldati vastupidist toimet. See lahknevus võimaldab järeldada, et *NAT10* võib osaleda *RELB* translatsiooni efektiivsuse või valgu stabiilsuse reguleerimises. Kuna ac4C modifikatsioon soodustab translatsiooni, siis võib üheks põhjuseks olla ac4C hulga vähenemine (Arango jt., 2018). Edasised uuringud, näiteks kasutades erinevate ajapunktidega stimulatsioone (6 või 12 tundi), on vajalikud, et paremini mõista, kuidas *NAT10* mõjutab NF- κ B signaaliraja valkude dünaamilist regulatsiooni ajas.

NAT10 vaigistamine põhjustab laialdast rakutsükliga seotud geenide allareguleerimist, mis on kooskõlas varasemate uuringutega *NAT10* olulisusest rakutsükli regulatsioonis (Liu jt., 2020; Zheng jt., 2022). Kuna rakkude kasv võib olla pidurdatud *NAT10* vaigistamise korral, täiendavad katsed näiteks *NAT10* inhibiitoriga - Remodeliniga (Larrieu jt., 2014) hiire psoriaasi mudelis (Singh jt., 2019) on vajalikud, et hinnata *NAT10* inhibeerimise süsteemset mõju naha histoloogiale, põletikule ja haigusfenotübile *in vivo*. See võimaldaks kinnitada, kas rakkudes täheldatud mehhanismid rakenduvad ka komplekssemates koesüsteemides ning kas *NAT10* võiks olla potentsiaalne terapeutiline sihtmärk. Lisaks mõjutab *NAT10* vaigistamine keratinotsüütide proliferatsiooni ja hüperproliferaatsiooniga seotud geenide ekspressiooni, mis näitab, et *NAT10* puudumine võib aktiveerida stressivastuseid ning muuta keratinotsüüte aktiivsemaks põletikulises tingimustes. See viitab võimalusele, et *NAT10* puudumine soodustab keratinotsüütide aktiveerimist ja stressivastust, mille tulemusena võivad nad soodustada immuunrakkude ligimeelitamist – universaalset immunoloogilist mehhanismi, mis mängib aga psoriaasi patogeneesis eriti kesksel rollil.

Samuti ilmnes, et *NAT10* vaigistamise korral esinevad mitmed geeniekspressiooni muutused, mis sarnanevad psoriaasile, eriti IL-17A või IFN γ poolt indutseeritud põletikulises tingimustes.

Kuigi käesolev magistritöö toob esile ac4C modifikatsiooni ja *NAT10* olulise rolli põletikulistes protsessides ning viitab nende seotusele JAK-STAT ja NF-κB signaaliradade regulatsiooniga, ei olnud võimalik määrata ac4C paiknemist konkreetsetes geenides ega hinnata nende atsetüleerimistaset erinevates tingimustes. See piirab järelduste täpsust ac4C otsese funktsionaalse rolli kohta individuaalsete geenide ja signaaliradade tasandil. Sellise info saamiseks oleks vajalik läbi viia spetsiifilised RNA-seq meetodid, näiteks acRIP-seq või ac4C-seq (*CD Genomics* (i.a); Thalalla Gamage jt., 2021), mis võimaldaks tuvastada ac4C modifikatsiooni asukohti terve transkriptoomi ulatuses. Tulevikus võiks see pakkuda sügavamat arusaama ac4C dünaamikast ja spetsiifilisest osalusest erinevates immuunvastustes ning toetada *NAT10* kui võimaliku terapeutilise sihtmärgi edasist valideerimist.

KOKKUVÕTE

Käesoleva magistritöö eesmärk oli uurida RNA modifikatsiooni ac4C ja selle ainsa teadaoleva ensüümi NAT10 võimalikku rolli NHEK rakkude põletikuvastuses, keskendudes psoriaasi patogeneesile. Kirjanduse ülevaates käsitleti olulisemaid RNA modifikatsioone, ac4C ja NAT10 funktsioone, naha ehitust, psoriaasi ning peamisi signaaliradasid, mis on psoriaasi korral mõjutatud. Kuna *NAT10* ekspressioon on kõige kõrgem just keratinotsüütides, mis moodustavad suure osa epidermisest, on selle geeni uurimine psoriaasi kontekstis põhjendatud, eriti arvestades, et olemasolevad ravimeetodid ei võimalda haigust täielikult ravida ja ei ole tõhusad kõigil juhtudel. Ka meie esmane analüüs patsientide proovidega näitas, et *NAT10* mRNA suhteline ekspressioon oli suurenenud psoriaatilises nahas, viidates võimalikule seosele ac4C modifikatsiooni ja psoriaasi patogeneesi vahel.

Eksperimentaalselt vaigistati NHEK rakkudes *NAT10* geen siRNA abil ning rakke stimuleeriti Polü(I:C), IFN γ või IL-17A-ga põletikulise vastuse esilekutsumiseks. Tulemused näitasid, et *NAT10* mRNA suhteline ekspressioon vähenes kõikides stimulatsioonitingimustes, võimaldades järeldada, et edasised muutused rakulises vastuses olid tingitud ac4C taseme vähenemisest mRNA-l. Polü(I:C) stimulatsiooni järel täheldati viirusvastuse nõrgenemist, mis võib viidata *NAT10* rollile viirusinfektsioonide ja nendega seotud immuunreaktsioonide regulatsioonis. IFN γ ja IL-17A poolt indutseeritud tingimustes täheldati mitmete kemokiinide ja tsütokiinide nii üles- kui ka allareguleerimist, mis võib viidata, et *NAT10* ei toimi universaalse aktivaatori ega inhibiitorina, vaid moduleerib põletikuradade aktiivsust sõltuvalt rakusisesest signalisatsioonist ja põletikulise signaali olemusest. *NAT10* osaleb ka JAK-STAT ja NF- κ B signaaliradade regulatsioonis, sealhulgas suurendades negatiivsete regulaatorite (*SOCS*-id ja *PIAS*-id) ekspressiooni. NF- κ B signaaliraja valkude tasemete muutused viitavad, et *NAT10* vaigistamine võib toetada klassikalise NF- κ B signaaliraja aktivatsiooni ja samaaegselt inhibeerida alternatiivset signaalirada. Lisaks põhjustas *NAT10* vaigistamine rakutsükli, keratinotsüütide kasvu ja proliferatsiooniga seotud geenide allareguleerimist, mistõttu tulevased katsed *NAT10* väikemolekulaarsete inhibiitoritega hiire psoriaasi mudelis aitaksid paremini mõista *NAT10* vaigistamise mõju naha põletikule.

Antud magistritöö raames näidati, et *NAT10* ja ac4C modifikatsioon võivad mõjutada keratinotsüütide põletikulist vastust ja olla seotud psoriaasi patogeneesiga. Edasised uuringud, on vajalikud, et täpsemalt mõista ac4C modifikatsiooni mõju molekulaarseid mehhanisme psoriaasis.

The role of RNA modification ac4C in the cellular response of human epidermal keratinocytes

Valeria Naumova

SUMMARY

Psoriasis is a chronic inflammatory skin disease characterized by keratinocyte hyperproliferation and immune dysregulation (Griffiths and Barker, 2007; Eberle et al., 2016). Recent research highlights the importance of RNA modifications, such as N4-acetylcytidine (ac4C), in controlling gene expression and cellular responses (Arango et al., 2018). This thesis focuses on ac4C and its only known writer enzyme, NAT10, exploring their potential roles in regulating inflammatory signaling in NHEK cells. Particular attention is given to key pathways involved in psoriasis, including NF- κ B and JAK-STAT. The findings provide new insights into how NAT10 may modulate inflammatory responses and keratinocyte behavior, offering potential directions for future therapeutic strategies.

NAT10 expression was found to be upregulated in psoriatic skin, suggesting a possible involvement of ac4C in chronic inflammation. To investigate this potential role, *NAT10* was silenced in keratinocytes using siRNA, and cells were stimulated with Poly(I:C), IFN γ , or IL-17A. *NAT10* knockdown altered the expression of various cytokines and chemokines in a stimuli-dependent manner, indicating that *NAT10* does not act as a universal activator or repressor but modulates immune responses based on the signaling context. Poly(I:C) stimulation revealed reduced antiviral responses, linking *NAT10* to immune defense mechanisms. Moreover, *NAT10* silencing affected key inflammatory signaling pathways—promoting classical NF- κ B activation, disrupting the alternative NF- κ B pathway, and inducing changes in JAK-STAT components and their regulators. *NAT10* depletion further downregulated cell cycle and proliferation-related genes, suggesting a broader role in keratinocyte homeostasis.

While this study highlights the importance of *NAT10* and ac4C in skin inflammation, it did not map ac4C distribution on specific transcripts. Future studies using transcriptome-wide ac4C profiling (e.g., ac4C-seq) are needed to better understand its dynamic regulatory functions in immune signaling.

KIRJANDUSE LOETELU

Adachi, H., De Zoysa, M. D., & Yu, Y. T. (2019). Post-transcriptional pseudouridylation in mRNA as well as in some major types of noncoding RNAs. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1862(3), lk 230-239. doi: 10.1016/j.bbagr.2018.11.002

Albanesi, C., Madonna, S., Gisondi, P., & Girolomoni, G. (2018). The interplay between keratinocytes and immune cells in the pathogenesis of psoriasis. *Frontiers in Immunology*, 9, lk 1549. doi: 10.3389/fimmu.2018.01549

Albanesi, C., Scarponi, C., Giustizieri, M. L., & Girolomoni, G. (2005). Keratinocytes in inflammatory skin diseases. *Current Drug Targets-Inflammation & Allergy*, 4(3), lk 329-334. doi: 10.2174/1568010054022033

Alexandrov, A., Martzen, M. R., & Phizicky, E. M. (2002). Two proteins that form a complex are required for 7-methylguanosine modification of yeast tRNA. *Rna*, 8(10), lk 1253-1266. doi: 10.1017/s1355838202024019

Appay, V., & Rowland-Jones, S. L. (2001). RANTES: a versatile and controversial chemokine. *Trends in immunology*, 22(2), lk 83-87. doi: 10.1016/s1471-4906(00)01812-3

Arango, D., Sturgill, D., Alhusaini, N., Dillman, A. A., Sweet, T. J., Hanson, G., ... & Oberdoerffer, S. (2018). Acetylation of cytidine in mRNA promotes translation efficiency. *Cell*, 175(7), lk 1872-1886. doi: 10.1016/j.cell.2018.10.030

Arango, D., Sturgill, D., Yang, R., Kanai, T., Bauer, P., Roy, J., ... & Oberdoerffer, S. (2022). Direct epitranscriptomic regulation of mammalian translation initiation through N4-acetylcytidine. *Molecular cell*, 82(15), 2797-2814. doi: 10.1016/j.molcel.2022.05.016

Arda, O., Göksügür, N., & Tüzün, Y. (2014). Basic histological structure and functions of facial skin. *Clinics in dermatology*, 32(1), lk 3-13. doi: 10.1016/j.clindermatol.2013.05.021

Bangert, C., Brunner, P. M., & Stingl, G. (2011). Immune functions of the skin. *Clinics in dermatology*, 29(4), lk 360-376. doi: 10.1016/j.clindermatol.2011.01.006

Bannister, A. J., & Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell research*, 21(3), lk 381-395. doi: 10.1038/cr.2011.22

Bawankar, P., Lence, T., Paolantoni, C., Haussmann, I. U., Kazlauskienė, M., Jacob, D., ... & Roignant, J. Y. (2021). Hakai is required for stabilization of core components of the m6A mRNA methylation machinery. *Nature communications*, 12(1), lk 3778. doi: 10.1038/s41467-021-23892-5

Bitschar, K., Wolz, C., Krismer, B., Peschel, A., & Schitteck, B. (2017). Keratinocytes as sensors and central players in the immune defense against *Staphylococcus aureus* in the skin. *Journal of dermatological science*, 87(3), lk 215-220. doi: 10.1016/j.jdermsci.2017.06.003

Becker, H. F., Motorin, Y., Sissler, M., Florentz, C., & Grosjean, H. (1997). Major identity determinants for enzymatic formation of ribothymidine and pseudouridine in the TΨ-loop of yeast tRNAs. *Journal of molecular biology*, 274(4), lk 505-518. doi: 10.1006/jmbi.1997.1417

- Bharadwaj, U., Kasembeli, M. M., Robinson, P., & Tweardy, D. J. (2020). Targeting janus kinases and signal transducer and activator of transcription 3 to treat inflammation, fibrosis, and cancer: rationale, progress, and caution. *Pharmacological reviews*, 72(2), lk 486-526. doi: 10.1124/pr.119.018440
- Borchardt, E. K., Martinez, N. M., & Gilbert, W. V. (2020). Regulation and function of RNA pseudouridylation in human cells. *Annual review of genetics*, 54(1), lk 309-336. doi: 10.1146/annurev-genet-112618-043830
- Braza, F., Chesne, J., Castagnet, S., Magnan, A., & Brouard, S. (2014). Regulatory functions of B cells in allergic diseases. *Allergy*, 69(11), lk 1454-1463. doi: 10.1111/all.12490
- Bren, G. D., Solan, N. J., Miyoshi, H., Pennington, K. N., Pobst, L. J., & Paya, C. V. (2001). Transcription of the RelB gene is regulated by NF- κ B. *Oncogene*, 20(53), lk 7722-7733. doi: 10.1038/sj.onc.1204868
- Bueren-Calabuig, J. A., G. Bage, M., Cowling, V. H., & Pisiakov, A. V. (2019). Mechanism of allosteric activation of human mRNA cap methyltransferase (RNMT) by RAM: insights from accelerated molecular dynamics simulations. *Nucleic Acids Research*, 47(16), lk 8675-8692. doi: 10.1093/nar/gkz613
- Cai, S., Liu, X., Zhang, C., Xing, B., & Du, X. (2017). Autoacetylation of NAT10 is critical for its function in rRNA transcription activation. *Biochemical and biophysical research communications*, 483(1), lk 624-629. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.12.092
- Carreras-Badosa, G., Maslovskaja, J., Periyasamy, K., ... Rebane, A. (2020). NickFect type of cell-penetrating peptides present enhanced efficiency for microRNA-146a delivery into dendritic cells and during skin inflammation. *Biomaterials*. 262: artikkel 120316. doi: 10.1016/j.biomaterials.2020.120316.
- Carlile, T. M., Rojas-Duran, M. F., Zinshteyn, B., Shin, H., Bartoli, K. M., & Gilbert, W. V. (2014). Pseudouridine profiling reveals regulated mRNA pseudouridylation in yeast and human cells. *Nature*, 515(7525), lk 143-146. doi: 10.1038/nature13802
- Charette, M., & Gray, M. W. (2000). Pseudouridine in RNA: what, where, how, and why. *IUBMB life*, 49(5), lk 341-352. doi: 10.1080/152165400410182
- Chen, M. L., Kao, W. M., Huang, J. Y., Hung, Y. M., & Wei, J. C. C. (2020). Human papillomavirus infection associated with increased risk of new-onset psoriasis: a nationwide population-based cohort study. *International Journal of Epidemiology*, 49(3), lk 786-797. doi: 10.1093/ije/dyaa027
- Chen, L., Wang, W. J., Liu, Q., Wu, Y. K., Wu, Y. W., Jiang, Y., ... & Fan, H. Y. (2022). NAT10-mediated N 4-acetylcytidine modification is required for meiosis entry and progression in male germ cells. *Nucleic acids research*, 50(19), lk 10896-10913. doi: 10.1093/nar/gkac594
- Chiricozzi, A., Guttman-Yassky, E., Suárez-Farinas, M., Nogralles, K. E., Tian, S., Cardinale, I., ... & Krueger, J. G. (2011). Integrative responses to IL-17 and TNF- α in human keratinocytes account for key inflammatory pathogenic circuits in psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology*, 131(3), lk 677-687. doi: 10.1038/jid.2010.340

- Chow, L. T., Gelinas, R. E., Broker, T. R., & Roberts, R. J. (1977). An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA. *Cell*, 12(1), 1k 1-8. doi: 10.1016/0092-8674(77)90180-5
- Chung, C. D., Liao, J., Liu, B., Rao, X., Jay, P., Berta, P., & Shuai, K. (1997). Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science*, 278(5344), 1k 1803-1805. doi: 10.1126/science.278.5344.1803
- Chuong, C. M., Nickoloff, B. J., Elias, P. M., Goldsmith, L. A., Macher, E., Maderson, P. A., ... & Christophers, E. (2002). What is the 'true' function of skin?. *Experimental dermatology*, 11(2), 1k 159-187. doi: 10.1034/j.1600-0625.2002.00112.x
- Cildir, G., Akincilar, S. C., & Tergaonkar, V. (2013). Chronic adipose tissue inflammation: all immune cells on the stage. *Trends in molecular medicine*, 19(8), 1k 487-500. doi: 10.1016/j.molmed.2013.05.001
- Cohn, W. E. (1960). Pseudouridine, a carbon-carbon linked ribonucleoside in ribonucleic acids: isolation, structure, and chemical characteristics. *Journal of Biological Chemistry*, 235(5), 1k 1488-1498.
- Crow, J. M. (2012). Psoriasis uncovered. *Nature*, 492(7429). doi: 10.1038/492S50a
- Cui, L., Ma, R., Cai, J., Guo, C., Chen, Z., Yao, L., ... & Shi, Y. (2022). RNA modifications: importance in immune cell biology and related diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1), 1k 334. doi: 10.1038/s41392-022-01175-9
- Čokić, V. P., Mitrović-Ajtić, O., Beleslin-Čokić, B. B., Marković, D., Buač, M., Diklić, M., ... & Raj, P. K. (2015). Proinflammatory cytokine IL-6 and JAK-STAT signaling pathway in myeloproliferative neoplasms. *Mediators of inflammation*, 2015(1), 1k 453020. doi: 10.1155/2015/453020
- Dahm, R. (2008). Discovering DNA: Friedrich Miescher and the early years of nucleic acid research. *Human genetics*, 122, 1k 565-581. doi: 10.1007/s00439-007-0433-0
- Darnell Jr, J. E. (1997). STATs and gene regulation. *Science*, 277(5332), 1k 1630-1635. doi: 10.1126/science.277.5332.1630
- Davis, F. F., & Allen, F. W. (1957). Ribonucleic acids from yeast which contain a fifth nucleotide. *J Biol Chem*, 227(2), 1k 907-15.
- DeBenedictis, C., Joubert, S., Zhang, G., Barria, M., & Ghohestani, R. F. (2001). Immune functions of the skin. *Clinics in dermatology*, 19(5), 1k 573-585. doi: 10.1016/s0738-081x(00)00173-5
- Deng, M., Zhang, L., Zheng, W., Chen, J., Du, N., Li, M., ... & Chen, Y. (2023). Helicobacter pylori-induced NAT10 stabilizes MDM2 mRNA via RNA acetylation to facilitate gastric cancer progression. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 42(1), 1k 9. doi: 10.1186/s13046-022-02586-w
- Dif, F., Saunier, E., Demeneix, B., Kelly, P. A., & Edery, M. (2001). Cytokine-inducible SH2-containing protein suppresses PRL signaling by binding the PRL receptor. *Endocrinology*, 142(12), 1k 5286-5293. doi: 10.1210/endo.142.12.8549

- Dick, J. C. (1947). Observations on the elastic tissue of the skin with a note on the reticular layer at the junction of the dermis and epidermis. *Journal of Anatomy*, 81(Pt 3), 1k 201.
- Drazic, A., Myklebust, L. M., Ree, R., & Arnesen, T. (2016). The world of protein acetylation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1864(10), 1k 1372-1401. doi: 10.1016/j.bbapap.2016.06.007
- Dyring-Andersen, B., Løvendorf, M. B., Coscia, F., Santos, A., Møller, L. B. P., Colaço, A. R., ... & Mann, M. (2020). Spatially and cell-type resolved quantitative proteomic atlas of healthy human skin. *Nature Communications*, 11(1), 1k 5587. doi: 10.1038/s41467-020-19383-8
- Eberle, F. C., Brück, J., Holstein, J., Hirahara, K., & Ghoreschi, K. (2016). Recent advances in understanding psoriasis. *F1000Research*, 5, F1000-Faculty. doi: 10.12688/f1000research.7927.1
- Elder, J. T., Bruce, A. T., Gudjonsson, J. E., Johnston, A., Stuart, P. E., Tejasvi, T., ... & Nair, R. P. (2010). Molecular dissection of psoriasis: integrating genetics and biology. *Journal of Investigative Dermatology*, 130(5), 1k 1213-1226. doi: 10.1038/jid.2009.319
- Ellis, C. N., Gorsulowsky, D. C., Hamilton, T. A., Billings, J. K., Brown, M. D., Headington, J. T., ... & Voorhees, J. J. (1986). Cyclosporine improves psoriasis in a double-blind study. *Jama*, 256(22), 1k 3110-3116.
- Endo, T. A., Masuhara, M., Yokouchi, M., Suzuki, R., Sakamoto, H., Mitsui, K., ... & Yoshimura, A. (1997). A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature*, 387(6636), 1k 921-924. doi: 10.1038/43213
- Favre, H., Benhamou, A., Finidori, J., Kelly, P. A., & Edery, M. (1999). Dual effects of suppressor of cytokine signaling (SOCS-2) on growth hormone signal transduction. *FEBS letters*, 453(1-2), 1k 63-66. doi: 10.1016/s0014-5793(99)00681-x
- Fernandes, S., Pinto, G. M., & Cardoso, J. (2011). Particular clinical presentations of psoriasis in HIV patients. *International journal of STD & AIDS*, 22(11), 1k 653-654. doi: 10.1258/ijsa.2011.010525
- Fortier, M. E., Kent, S., Ashdown, H., Poole, S., Boksa, P., & Luheshi, G. N. (2004). The viral mimic, polyinosinic: polycytidylic acid, induces fever in rats via an interleukin-1-dependent mechanism. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 287(4), 1k R759-R766. doi: 10.1152/ajpregu.00293.2004
- Früh, K., & Yang, Y. (1999). Antigen presentation by MHC class I and its regulation by interferon γ . *Current opinion in immunology*, 11(1), 1k 76-81. doi: 10.1016/s0952-7915(99)80014-4
- Fu, D., & Collins, K. (2007). Purification of human telomerase complexes identifies factors involved in telomerase biogenesis and telomere length regulation. *Molecular cell*, 28(5), 1k 773-785. doi: 10.1016/j.molcel.2007.09.023

- Gilaberte, Y., Prieto-Torres, L., Pastushenko, I., & Juarranz, Á. (2016). Anatomy and Function of the Skin. In *Nanoscience in dermatology* (lk. 1-14). Academic Press. doi: 10.1016/B978-0-12-802926-8.00001-X
- Goh, B. K., Chan, R. K., Sen, P., Theng, C. T., Tan, H. H., Wu, Y. J., & Paton, N. I. (2007). Spectrum of skin disorders in human immunodeficiency virus-infected patients in Singapore and the relationship to CD4 lymphocyte counts. *International journal of dermatology*, 46(7), lk 695-699. doi: 10.1111/j.1365-4632.2007.03164.x
- Green, H., Fuchs, E., & Watt, F. (1982). Differentiated structural components of the keratinocyte. In *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* (Vol. 46, lk. 293-301). Cold Spring Harbor Laboratory Press. doi: 10.1101/sqb.1982.046.01.031
- Griffiths, C. E., & Barker, J. N. (2007). Pathogenesis and clinical features of psoriasis. *The Lancet*, 370(9583), lk 263-271. doi: 10.1016/S0140-6736(07)61128-3
- Griffiths, C. E. M., Christophers, E., Barker, J. N. W. N., Chalmers, R. J. G., Chimenti, S., Krueger, G. G., ... & Fry, L. (2007). A classification of psoriasis vulgaris according to phenotype. *British Journal of Dermatology*, 156(2), lk 258-262. doi: 10.1111/j.1365-2133.2006.07675.x
- Griffiths, C. E., Powles, A. V., Leonard, J. N., Fry, L., Baker, B. S., & Valdimarsson, H. (1986). Clearance of psoriasis with low dose cyclosporin. *British medical journal (Clinical research ed.)*, 293(6549), lk 731. doi: 10.1136/bmj.293.6549.731
- Grosjean, H. (2005). Modification and editing of RNA: historical overview and important facts to remember. In *Fine-tuning of RNA functions by modification and editing* (lk. 1-22). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. doi: 10.1007/b106848
- Gustilo, E. M. (2009). Post-transcriptional modifications of the tRNA anticodon stem and loop (ASL) affect the ability of tRNA to bind synonymous codons. North Carolina State University.
- Hald, A., Andrés, R. M., Salskov-Iversen, M. L., Kjellerup, R. B., Iversen, L., & Johansen, C. (2013). STAT1 expression and activation is increased in lesional psoriatic skin. *British Journal of Dermatology*, 168(2), lk 302-310. doi: 10.1111/bjd.12049
- Hamma, T., & Ferré-D'Amaré, A. R. (2006). Pseudouridine synthases. *Chemistry & biology*, 13(11), lk 1125-1135. doi: 10.1016/j.chembiol.2006.09.009
- Harhaj, E. W., & Sun, S. C. (1999). Regulation of RelA subcellular localization by a putative nuclear export signal and p50. *Molecular and cellular biology*, 19(10), lk 7088-7095. doi: 10.1128/MCB.19.10.7088
- Harper, E. G., Guo, C., Rizzo, H., Lillis, J. V., Kurtz, S. E., Skorcheva, I., ... & Blauvelt, A. (2009). Th17 cytokines stimulate CCL20 expression in keratinocytes in vitro and in vivo: implications for psoriasis pathogenesis. *Journal of Investigative Dermatology*, 129(9), lk 2175-2183. doi: 10.1038/jid.2009.65
- Havran, W. L., & Jameson, J. M. (2010). Epidermal T cells and wound healing. *The Journal of Immunology*, 184(10), lk 5423-5428. doi: 10.4049/jimmunol.0902733

- Hawkes, J. E., Chan, T. C., & Krueger, J. G. (2017). Psoriasis pathogenesis and the development of novel targeted immune therapies. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 140(3), 645-653. doi: 10.1016/j.jaci.2017.07.004
- Hayden, M. S., & Ghosh, S. (2008). Shared principles in NF- κ B signaling. *Cell*, 132(3), 344-362. doi: 10.1016/j.cell.2008.01.020
- Hilton, D. J., Richardson, R. T., Alexander, W. S., Viney, E. M., Willson, T. A., Sprigg, N. S., ... & Nicola, N. A. (1998). Twenty proteins containing a C-terminal SOCS box form five structural classes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(1), 114-119. doi: 10.1073/pnas.95.1.114
- Holley, R. W., Everett, G. A., Madison, J. T., & Zamir, A. (1965). Nucleotide sequences in the yeast alanine transfer ribonucleic acid. *Journal of Biological Chemistry*, 240(5), 2122-2128
- Holtkamp, S., Kreiter, S., Selmi, A., Simon, P., Koslowski, M., Huber, C., ... & Sahin, U. (2006). Modification of antigen-encoding RNA increases stability, translational efficacy, and T-cell stimulatory capacity of dendritic cells. *Blood*, 108(13), 4009-4017. doi: 10.1182/blood-2006-04-015024
- Hsieh, C. S., Macatonia, S. E., Tripp, C. S., Wolf, S. F., O'Garra, A., & Murphy, K. M. (1993). Development of TH1 CD4⁺ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science*, 260(5107), 547-549. doi: 10.1126/science.8097338
- Hsu, Y. C., Li, L., & Fuchs, E. (2014). Emerging interactions between skin stem cells and their niches. *Nature medicine*, 20(8), 847-856. doi: 10.1038/nm.3643
- Huang, H., Weng, H., Deng, X., & Chen, J. (2020). RNA modifications in cancer: functions, mechanisms, and therapeutic implications. *Annual Review of Cancer Biology*, 4(1), 221-240. doi: 10.1146/annurev-cancerbio-030419-033357
- Ikeuchi, Y., Kitahara, K., & Suzuki, T. (2008). The RNA acetyltransferase driven by ATP hydrolysis synthesizes N⁴-acetylcytidine of tRNA anticodon. *The EMBO journal*, 27(16), 2194-2203. doi: 10.1038/emboj.2008.154
- Iozzo, R. V. (2005). Basement membrane proteoglycans: from cellar to ceiling. *Nature reviews Molecular cell biology*, 6(8), 646-656. doi: 10.1038/nrm1702
- Ishizaki, M., Muromoto, R., Akimoto, T., Sekine, Y., Kon, S., Diwan, M., ... & Matsuda, T. (2014). Tyk2 is a therapeutic target for psoriasis-like skin inflammation. *International immunology*, 26(5), 257-267. doi: 10.1093/intimm/dxt062
- Israël, A. (2010). The IKK complex, a central regulator of NF- κ B activation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(3), a000158. doi: 10.1101/cshperspect.a000158
- Jackman, J. E., & Alfonzo, J. D. (2013). Transfer RNA modifications: nature's combinatorial chemistry playground. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 4(1), 35-48. doi: 10.1002/wrna.1144
- Jeffares, D. C., Poole, A. M., & Penny, D. (1998). Relics from the RNA world. *Journal of molecular evolution*, 46, 18-36. doi: 10.1007/pl00006280

- Jia, G., Fu, Y. E., Zhao, X. U., Dai, Q., Zheng, G., Yang, Y., ... & He, C. (2011). N⁶-methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO. *Nature chemical biology*, 7(12), lk 885-887. doi: 10.1038/nchembio.687
- Johnston, A., Xing, X., Guzman, A. M., Riblett, M., Loyd, C. M., Ward, N. L., ... & Gudjonsson, J. E. (2011). IL-1F5,-F6,-F8, and-F9: a novel IL-1 family signaling system that is active in psoriasis and promotes keratinocyte antimicrobial peptide expression. *The Journal of Immunology*, 186(4), lk 2613-2622. doi: 10.4049/jimmunol.1003162
- Johnston, A., Xing, X., Wolterink, L., Barnes, D. H., Yin, Z., Reingold, L., ... & Gudjonsson, J. E. (2017). IL-1 and IL-36 are dominant cytokines in generalized pustular psoriasis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 140(1), lk 109-120. doi: 10.1016/j.jaci.2016.08.056
- Jordan, C. T., Cao, L., Roberson, E. D., Pierson, K. C., Yang, C. F., Joyce, C. E., ... & Bowcock, A. M. (2012). PSORS2 is due to mutations in CARD14. *The American Journal of Human Genetics*, 90(5), lk 784-795. doi: 10.1016/j.ajhg.2012.03.012
- Jühling, F., Mörl, M., Hartmann, R. K., Sprinzl, M., Stadler, P. F., & Pütz, J. (2009). tRNADB 2009: compilation of tRNA sequences and tRNA genes. *Nucleic acids research*, 37(suppl_1), D159-D162. doi: 10.1093/nar/gkn772
- Karikó, K., Muramatsu, H., Welsh, F. A., Ludwig, J., Kato, H., Akira, S., & Weissman, D. (2008). Incorporation of pseudouridine into mRNA yields superior nonimmunogenic vector with increased translational capacity and biological stability. *Molecular therapy*, 16(11), lk 1833-1840. doi: 10.1038/mt.2008.200
- Karin, M., & Delhase, M. (2000). The I κ B kinase (IKK) and NF- κ B: key elements of proinflammatory signalling. In *Seminars in immunology* (Vol. 12, No. 1, lk. 85-98). Academic Press. doi: 10.1006/smim.2000.0210
- Kersse, K., Bertrand, M. J., Lamkanfi, M., & Vandenabeele, P. (2011). NOD-like receptors and the innate immune system: coping with danger, damage and death. *Cytokine & growth factor reviews*, 22(5-6), lk 257-276. doi: 10.1016/j.cytogfr.2011.09.003
- Kim, E. J., Park, J. I., & Nelkin, B. D. (2005). IFI16 is an essential mediator of growth inhibition, but not differentiation, induced by the leukemia inhibitory factor/JAK/STAT pathway in medullary thyroid carcinoma cells. *Journal of Biological Chemistry*, 280(6), lk 4913-4920. doi: 10.1074/jbc.M410542200
- Knuckles, P., Lence, T., Hausmann, I. U., Jacob, D., Kreim, N., Carl, S. H., ... & Roignant, J. Y. (2018). Zc3h13/Flacc is required for adenosine methylation by bridging the mRNA-binding factor Rbm15/Spenito to the m⁶A machinery component Wtap/F1 (2) d. *Genes & development*, 32(5-6), lk 415-429. doi: 10.1101/gad.309146.117
- Kolarsick, P. A., Kolarsick, M. A., & Goodwin, C. (2011). Anatomy and physiology of the skin. *Journal of the Dermatology Nurses' Association*, 3(4), lk 203-213. doi: 10.1097/JDN.0b013e3182274a98
- Kryczek, I., Bruce, A. T., Gudjonsson, J. E., Johnston, A., Aphale, A., Vatan, L., ... & Zou, W. (2008). Induction of IL-17⁺ T cell trafficking and development by IFN- γ : mechanism and pathological relevance in psoriasis. *The Journal of Immunology*, 181(7), lk 4733-4741. doi: 10.4049/jimmunol.181.7.4733

- Kudrin, P., Singh, A., Meierhofer, D., Kuśnierczyk, A., & Ørom, U. A. V. (2024). N4-acetylcytidine (ac4C) promotes mRNA localization to stress granules. *EMBO reports*, 25(4), lk 1814-1834. doi: 10.1038/s44319-024-00098-6
- Kudrin, P., Meierhofer, D., Vågbø, C. B., & Ørom, U. A. V. (2021). Nuclear RNA-acetylation can be erased by the deacetylase SIRT7. *BioRxiv*, 2021-04. doi: 10.1101/2021.04.06.438707
- Kumbhar, B. V., Kamble, A. D., & Sonawane, K. D. (2013). Conformational preferences of modified nucleoside N (4)-acetylcytidine, ac 4 C occur at “wobble” 34th position in the anticodon loop of tRNA. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 66, lk 797-816. doi: 10.1007/s12013-014-0382-x
- Kupper, T. S., & Fuhlbrigge, R. C. (2004). Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences. *Nature Reviews Immunology*, 4(3), lk 211-222. doi: 10.1038/nri1310
- Kurth, H. M., & Mochizuki, K. (2009). 2'-O-methylation stabilizes Piwi-associated small RNAs and ensures DNA elimination in *Tetrahymena*. *Rna*, 15(4), lk 675-685. doi: 10.1261/rna.1455509
- Larrieu, D., Britton, S., Demir, M., Rodriguez, R., & Jackson, S. P. (2014). Chemical inhibition of NAT10 corrects defects of laminopathic cells. *Science*, 344(6183), lk 527-532. doi: 10.1126/science.1252651
- Leonard, W. J., & O'Shea, J. J. (1998). Jaks and STATs: biological implications. *Annual review of immunology*, 16(1), lk 293-322. doi: 10.1146/annurev.immunol.16.1.293
- Li, W. X. (2008). Canonical and non-canonical JAK–STAT signaling. *Trends in cell biology*, 18(11), lk 545-551. doi: 10.1016/j.tcb.2008.08.008
- Li, X., Zhu, P., Ma, S., Song, J., Bai, J., Sun, F., & Yi, C. (2015). Chemical pulldown reveals dynamic pseudouridylation of the mammalian transcriptome. *Nature chemical biology*, 11(8), lk 592-597. doi: 10.1038/nchembio.1836
- Li, Y., Xu, X. L., Zhao, D., Pan, L. N., Huang, C. W., Guo, L. J., ... & Wang, J. (2015). TLR 3 ligand poly IC attenuates reactive astrogliosis and improves recovery of rats after focal cerebral ischemia. *CNS neuroscience & therapeutics*, 21(11), lk 905-913. doi: 10.1111/cns.12469
- Lin, S., Liu, Q., Lelyveld, V. S., Choe, J., Szostak, J. W., & Gregory, R. I. (2018). Mettl1/Wdr4-mediated m7G tRNA methylome is required for normal mRNA translation and embryonic stem cell self-renewal and differentiation. *Molecular cell*, 71(2), lk 244-255. doi: 10.1016/j.molcel.2018.06.001
- Liu, H. Y., Liu, Y. Y., Yang, F., Zhang, L., Zhang, F. L., Hu, X., ... & Li, D. Q. (2020). Acetylation of MORC2 by NAT10 regulates cell-cycle checkpoint control and resistance to DNA-damaging chemotherapy and radiotherapy in breast cancer. *Nucleic acids research*, 48(7), lk 3638-3656. doi: 10.1093/nar/gkaa130
- Liu, H., Ling, Y., Gong, Y., Sun, Y., Hou, L., & Zhang, B. (2007). DNA damage induces N-acetyltransferase NAT10 gene expression through transcriptional activation. *Molecular and cellular biochemistry*, 300, lk 249-258. doi: 10.1007/s11010-006-9390-5

- Liu, B., Liao, J., Rao, X., Kushner, S. A., Chung, C. D., Chang, D. D., & Shuai, K. E. (1998). Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(18), 10626-10631. doi: 10.1073/pnas.95.18.10626
- Liu, N., & Pan, T. (2016). N6-methyladenosine–encoded epitranscriptomics. *Nature structural & molecular biology*, 23(2), 98-102. doi: 10.1038/nsmb.3162
- Liu, X., Tan, Y., Zhang, C., Zhang, Y., Zhang, L., Ren, P., ... & Du, X. (2016). NAT10 regulates p53 activation through acetylating p53 at K120 and ubiquitinating Mdm2. *EMBO reports*, 17(3), 349-366. doi: 10.15252/embr.201540505
- Liu, R., Wubulikasimu, Z., Cai, R., Meng, F., Cui, Q., Zhou, Y., & Li, Y. (2023). NAT10-mediated N4-acetylcytidine mRNA modification regulates self-renewal in human embryonic stem cells. *Nucleic Acids Research*, 51(16), 8514-8531. doi: 10.1093/nar/gkad628
- Liu, J., Yue, Y., Han, D., Wang, X., Fu, Y., Zhang, L., ... & He, C. (2014). A METTL3–METTL14 complex mediates mammalian nuclear RNA N6-adenosine methylation. *Nature chemical biology*, 10(2), 93-95. doi: 10.1038/nchembio.1432
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ΔΔCT method. *Methods*, 25(4), 402-408. doi: 10.1006/meth.2001.1262
- Long, Y., Ren, Y., Wei, Q., Mobet, Y., Liu, Y., Zhao, H., ... & Yi, P. (2023). NAT10-mediated RNA acetylation enhances HNRNPUL1 mRNA stability to contribute cervical cancer progression. *International Journal of Medical Sciences*, 20(8), 1079. doi: 10.7150/ijms.83828
- Lorenz, V. N., Schön, M. P., & Seitz, C. S. (2014). c-Rel downregulation affects cell cycle progression of human keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology*, 134(2), 415-422. doi: 10.1038/jid.2013.315
- Lu, L., Berkey, K. A., & Casero, R. A. (1996). RGF GIGS is an amino acid sequence required for acetyl coenzyme A binding and activity of human spermidine/spermine N1-acetyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*, 271(31), 18920-18924. doi: 10.1074/jbc.271.31.18920
- Luo, J., Cao, J., Chen, C., & Xie, H. (2023). Emerging role of RNA acetylation modification ac4C in diseases: current advances and future challenges. *Biochemical Pharmacology*, 115628. doi: 10.1016/j.bcp.2023.115628
- Manna, S. K., & Ramesh, G. T. (2005). Interleukin-8 induces nuclear transcription factor-κB through a TRAF6-dependent pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 280(8), 7010-7021. doi: 10.1074/jbc.M410994200
- Mattick, J. S. (2004). RNA regulation: a new genetics?. *Nature Reviews Genetics*, 5(4), 316-323. doi: 10.1038/nrg1321
- McGeachy, M. J., Cua, D. J., & Gaffen, S. L. (2019). The IL-17 family of cytokines in health and disease. *Immunity*, 50(4), 892-906. doi: 10.1016/j.immuni.2019.03.021

- McGrath, J. A., Eady, R. A. J., & Pope, F. M. (2004). Anatomy and organization of human skin. *Rook's textbook of dermatology*, 1, 3-2. doi: 10.1002/9780470750520.ch3
- Meyer, K. D., & Jaffrey, S. R. (2014). The dynamic epitranscriptome: N 6-methyladenosine and gene expression control. *Nature reviews Molecular cell biology*, 15(5), lk 313-326. doi: 10.1038/nrm3785
- Michalek, I. M., Loring, B., & John, S. M. (2016). Global report on psoriasis. World Health Organization.
- Miossec, P., & Kolls, J. K. (2012). Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation. *Nature reviews Drug discovery*, 11(10), lk 763-776. doi: 10.1038/nrd3794
- Motorin, Y., & Helm, M. (2011). RNA nucleotide methylation. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 2(5), lk 611-631. doi: 10.1002/wrna.79
- Murphy, M., Kerr, P., & Grant-Kels, J. M. (2007). The histopathologic spectrum of psoriasis. *Clinics in dermatology*, 25(6), lk 524-528. doi: 10.1016/j.clindermatol.2007.08.005
- Nada, H. R., El Sharkawy, D. A., Elmasry, M. F., Rashed, L. A., & Mamdouh, S. (2018). Expression of Janus Kinase 1 in vitiligo & psoriasis before and after narrow band UVB: a case-control study. *Archives of dermatological research*, 310, lk 39-46. doi: 10.1007/s00403-017-1792-6
- Naka, T., Narazaki, M., Hirata, M., Matsumoto, T., Minamoto, S., Aono, A., ... & Kishimoto, T. (1997). Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. *Nature*, 387(6636), lk 924-929. doi: 10.1038/43219
- Nestle, F. O., Conrad, C., Tun-Kyi, A., Homey, B., Gombert, M., Boyman, O., ... & Gilliet, M. (2005). Plasmacytoid predendritic cells initiate psoriasis through interferon- α production. *Journal of Experimental Medicine*, 202(1), lk 135-143. doi: 10.1084/jem.20050500
- Oeckinghaus, A., & Ghosh, S. (2009). The NF- κ B family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 1(4), a000034. doi: 10.1101/cshperspect.a000034
- O'Shea, J. J., Schwartz, D. M., Villarino, A. V., Gadina, M., McInnes, I. B., & Laurence, A. (2015). The JAK-STAT pathway: impact on human disease and therapeutic intervention. *Annual review of medicine*, 66(1), lk 311-328. doi: 10.1146/annurev-med-051113-024537
- Ouyang, W., Huang, Z., Wan, K., Nie, T., Chen, H., & Yao, H. (2024). ac4C RNA modification in Cancer: Unraveling Multifaceted Roles and Promising Therapeutic Horizons. *Cancer Letters*, lk 217159. doi: 10.1016/j.canlet.2024.217159
- Ovaere, P., Lippens, S., Vandenabeele, P., & Declercq, W. (2009). The emerging roles of serine protease cascades in the epidermis. *Trends in biochemical sciences*, 34(9), lk 453-463. doi: 10.1016/j.tibs.2009.08.001
- Palazzo, A. F., & Lee, E. S. (2015). Non-coding RNA: what is functional and what is junk?. *Frontiers in genetics*, 6, 2. doi: 10.3389/fgene.2015.00002

- Pandolfini, L., Barbieri, I., Bannister, A. J., Hendrick, A., Andrews, B., Webster, N., ... & Kouzarides, T. (2019). METTL1 promotes let-7 MicroRNA processing via m7G methylation. *Molecular cell*, 74(6), 1278-1290. doi: 10.1016/j.molcel.2019.03.040
- Panzer, U., Zahner, G., Wienberg, U., Steinmetz, O. M., Peters, A., Turner, J. E., ... & Schneider, A. (2008). 15-Deoxy- Δ 12, 14-prostaglandin J2 inhibits INF- γ -induced JAK/STAT1 signalling pathway activation and IP-10/CXCL10 expression in mesangial cells. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 23(12), 3776-3785. doi: 10.1073/pnas.97.9.4844
- Park, S. H., Kim, K. E., Hwang, H. Y., & Kim, T. Y. (2003). Regulatory Effect of SOCS on NF- κ B Activity in Murine Monocytes/Macrophages. *DNA and cell biology*, 22(2), 131-139. doi: 10.1089/104454903321515931
- Pasparakis, M., Haase, I., & Nestle, F. O. (2014). Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. *Nature reviews immunology*, 14(5), 289-301. doi: 10.1038/nri3646
- Peng, C., Ouyang, Y., Lu, N., & Li, N. (2020). The NF- κ B signaling pathway, the microbiota, and gastrointestinal tumorigenesis: recent advances. *Frontiers in Immunology*, 11, 1387. doi: 10.3389/fimmu.2020.01387
- Pezet, A., Favre, H., Kelly, P. A., & Edery, M. (1999). Inhibition and restoration of prolactin signal transduction by suppressors of cytokine signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 274(35), 24497-24502. doi: 10.1074/jbc.274.35.24497
- Ping, X. L., Sun, B. F., Wang, L. U., Xiao, W., Yang, X., Wang, W. J., ... & Yang, Y. G. (2014). Mammalian WTAP is a regulatory subunit of the RNA N6-methyladenosine methyltransferase. *Cell research*, 24(2), 177-189. doi: 10.1038/cr.2014.3
- Rademaker, M., Agnew, K., Anagnostou, N., Andrews, M., Armour, K., Baker, C., ... & Wong, L. C. (2019). Psoriasis and infection. A clinical practice narrative. *Australasian Journal of Dermatology*, 60(2), 91-98. doi: 10.1111/ajd.12895
- Ramanathan, A., Robb, G. B., & Chan, S. H. (2016). mRNA capping: biological functions and applications. *Nucleic acids research*, 44(16), 7511-7526. doi: 10.1093/nar/gkw551
- Richmond, J. M., & Harris, J. E. (2014). Immunology and skin in health and disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 4(12), a015339. doi: 10.1101/cshperspect.a015339
- Rodrigues, M., Kosaric, N., Bonham, C. A., & Gurtner, G. C. (2019). Wound healing: a cellular perspective. *Physiological reviews*, 99(1), 665-706. doi: 10.1152/physrev.00067.2017
- Roundtree, I. A., Evans, M. E., Pan, T., & He, C. (2017). Dynamic RNA modifications in gene expression regulation. *Cell*, 169(7), 1187-1200. doi: 10.1016/j.cell.2017.05.045
- Rzany, R., Naldi, N., Schäfer, S., Stern, S., & Williams, W. (1998). The diagnosis of psoriasis: diagnostic criteria. *British Journal of Dermatology*, 138(5), 917-917. doi: 10.1046/j.1365-2133.1998.02245.x
- Sabat, R., Philipp, S., Höflich, C., Kreutzer, S., Wallace, E., Asadullah, K., ... & Wolk, K. (2007). Immunopathogenesis of psoriasis. *Experimental dermatology*, 16(10), 779-798. doi: 10.1111/j.1600-0625.2007.00629.x

- Safra, M., Nir, R., Farouq, D., Slutskin, I. V., & Schwartz, S. (2017). TRUB1 is the predominant pseudouridine synthase acting on mammalian mRNA via a predictable and conserved code. *Genome research*, 27(3), 1k 393-406. doi: 10.1101/gr.207613.116
- Sano, S., Chan, K. S., Carbajal, S., Clifford, J., Peavey, M., Kiguchi, K., ... & DiGiovanni, J. (2005). Stat3 links activated keratinocytes and immunocytes required for development of psoriasis in a novel transgenic mouse model. *Nature medicine*, 11(1), 1k 43-49. doi: 10.1038/nm1162
- Sas-Chen, A., Thomas, J. M., Matzov, D., Taoka, M., Nance, K. D., Nir, R., ... & Schwartz, S. (2020). Dynamic RNA acetylation revealed by quantitative cross-evolutionary mapping. *Nature*, 583(7817), 1k 638-643. doi: 10.1038/s41586-020-2418-2
- Schumacher, C., Clark-Lewis, I., Baggiolini, M., & Moser, B. (1992). High-and low-affinity binding of GRO alpha and neutrophil-activating peptide 2 to interleukin 8 receptors on human neutrophils. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(21), 1k 10542-10546. doi: 10.1073/pnas.89.21.10542
- Sears, C., Olesen, J., Rubin, D., Finley, D., & Maniatis, T. (1998). NF- κ B p105 processing via the ubiquitin-proteasome pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 273(3), 1k 1409-1419. doi: 10.1074/jbc.273.3.1409
- Sharma, S., Langhendries, J. L., Watzinger, P., Kötter, P., Entian, K. D., & Lafontaine, D. L. (2015). Yeast Kre33 and human NAT10 are conserved 18S rRNA cytosine acetyltransferases that modify tRNAs assisted by the adaptor Tan1/THUMP1. *Nucleic acids research*, 43(4), 1k 2242-2258. doi: 10.1093/nar/gkv075
- Sharma, S., Marchand, V., Motorin, Y., & Lafontaine, D. L. (2017). Identification of sites of 2'-O-methylation vulnerability in human ribosomal RNAs by systematic mapping. *Scientific reports*, 7(1), 1k 11490. doi: 10.1038/s41598-017-09734-9
- Shen, Q., Zheng, X., McNutt, M. A., Guang, L., Sun, Y., Wang, J., ... & Zhang, B. (2009). NAT10, a nucleolar protein, localizes to the midbody and regulates cytokinesis and acetylation of microtubules. *Experimental cell research*, 315(10), 1k 1653-1667. doi: 10.1016/j.yexcr.2009.03.007
- Shi, H., Wei, J., & He, C. (2019). Where, when, and how: context-dependent functions of RNA methylation writers, readers, and erasers. *Molecular cell*, 74(4), 1k 640-650. doi: 10.1016/j.molcel.2019.04.025
- Singh, T. P., Zhang, H. H., Hwang, S. T., & Farber, J. M. (2019). IL-23- and imiquimod-induced models of experimental psoriasis in mice. *Current protocols in immunology*, 125(1), e71. doi: 10.1002/cpim.71
- Skapenko, A., Leipe, J., Lipsky, P. E., & Schulze-Koops, H. (2005). The role of the T cell in autoimmune inflammation. *Arthritis research & therapy*, 7, 1k 1-11 doi: 10.1186/ar1703
- Sleiman, S., & Dragon, F. (2019). Recent advances on the structure and function of RNA acetyltransferase Kre33/NAT10. *Cells*, 8(9), 1k 1035. doi: 10.3390/cells8091035

- Song, M. M., & Shuai, K. (1998). The suppressor of cytokine signaling (SOCS) 1 and SOCS3 but not SOCS2 proteins inhibit interferon-mediated antiviral and antiproliferative activities. *Journal of Biological Chemistry*, 273(52), 1k 35056-35062. doi: 10.1074/jbc.273.52.35056
- Song, C. X., Yi, C., & He, C. (2012). Mapping recently identified nucleotide variants in the genome and transcriptome. *Nature biotechnology*, 30(11), 1k 1107-1116. doi: 10.1038/nbt.2398
- Spallotta, F., Cencioni, C., Straino, S., Sbardella, G., Castellano, S., Capogrossi, M. C., ... & Gaetano, C. (2013). Enhancement of lysine acetylation accelerates wound repair. *Communicative & integrative biology*, 6(5), e25466. doi: 10.4161/cib.25466
- Szegedi, A., Aleksza, M., Gonda, A., Irinyi, B., Sipka, S., Hunyadi, J., & Antal-Szalmás, P. (2003). Elevated rate of Thelper1 (TH1) lymphocytes and serum IFN- γ levels in psoriatic patients. *Immunology letters*, 86(3), 1k 277-280.
- Starr, R., Willson, T. A., Viney, E. M., Murray, L. J., Rayner, J. R., Jenkins, B. J., ... & Hilton, D. J. (1997). A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature*, 387(6636), 1k 917-921. doi: 10.1038/43206
- Stuart, P. E., Nair, R. P., Ellinghaus, E., Ding, J., Tejasvi, T., Gudjonsson, J. E., ... & Elder, J. T. (2010). Genome-wide association analysis identifies three psoriasis susceptibility loci. *Nature genetics*, 42(11), 1k 1000-1004. doi: 10.1038/ng.693
- Su, R., Dong, L., Li, Y., Gao, M., He, P. C., Liu, W., ... & Chen, J. (2022). METTL16 exerts an m6A-independent function to facilitate translation and tumorigenesis. *Nature cell biology*, 24(2), 1k 205-216. doi: 10.1038/s41556-021-00835-2
- Sun, S. C. (2011). Non-canonical NF- κ B signaling pathway. *Cell research*, 21(1), 1k 71-85. doi: 10.1038/cr.2010.177
- Sun, S. C. (2012). The noncanonical NF- κ B pathway. *Immunological reviews*, 246(1), 1k 125-140. doi: 10.1111/j.1600-065X.2011.01088.x
- Sun, S. C., Chang, J. H., & Jin, J. (2013). Regulation of nuclear factor- κ B in autoimmunity. *Trends in immunology*, 34(6), 1k 282-289. doi: 10.1016/j.it.2013.01.004
- Sun, S. C., & Ley, S. C. (2008). New insights into NF- κ B regulation and function. *Trends in immunology*, 29(10), 1k 469-478. doi: 10.1016/j.it.2008.07.003
- Sun, S. C., & Liu, Z. G. (2011). A special issue on NF- κ B signaling and function. *Cell research*, 21(1), 1k 1-2. doi: 10.1038/cr.2011.1
- Suzuki, R., Sakamoto, H., Yasukawa, H., Masuhara, M., Wakioka, T., Sasaki, A., ... & Yoshimura, A. (1998). CIS3 and JAB have different regulatory roles in interleukin-6 mediated differentiation and STAT3 activation in M1 leukemia cells. *Oncogene*, 17(17), 1k 2271-2278. doi: 10.1038/sj.onc.1202143
- Zaccara, S., Ries, R. J., & Jaffrey, S. R. (2019). Reading, writing and erasing mRNA methylation. *Nature reviews Molecular cell biology*, 20(10), 1k 608-624. doi: 10.1038/s41580-019-0168-5

- Zachau, H. G., Dütting, B., & Feldmann, H. (1966). The structures of two serine transfer ribonucleic acids. doi: 10.1515/bchm2.1966.347.1.212
- Zhang, H., & Sun, S. C. (2015). NF- κ B in inflammation and renal diseases. *Cell & bioscience*, 5, 1k 1-12. doi: 10.1186/s13578-015-0056-4
- Zhao, X., Yang, Y., Sun, B. F., Shi, Y., Yang, X., Xiao, W., ... & Yang, Y. G. (2014). FTO-dependent demethylation of N6-methyladenosine regulates mRNA splicing and is required for adipogenesis. *Cell research*, 24(12), 1k 1403-1419. doi: 10.1038/cr.2014.151
- Zheng, G., Dahl, J. A., Niu, Y., Fedorcsak, P., Huang, C. M., Li, C. J., ... & He, C. (2013). ALKBH5 is a mammalian RNA demethylase that impacts RNA metabolism and mouse fertility. *Molecular cell*, 49(1), 1k 18-29. doi: 10.1016/j.molcel.2012.10.015
- Zheng, J., Tan, Y., Liu, X., Zhang, C., Su, K., Jiang, Y., ... & Du, X. (2022). NAT10 regulates mitotic cell fate by acetylating Eg5 to control bipolar spindle assembly and chromosome segregation. *Cell Death & Differentiation*, 29(4), 1k 846-860. doi: 10.1038/s41418-021-00899-5
- Zheng, Z., Zhang, L., Cui, X. L., Yu, X., Hsu, P. J., Lyu, R., ... & Huang, H. (2020). Control of early B cell development by the RNA N6-methyladenosine methylation. *Cell Reports*, 1k 31(13). doi: 10.1016/j.celrep.2020.107819
- Zhou, Z., Hamming, O. J., Ank, N., Paludan, S. R., Nielsen, A. L., & Hartmann, R. (2007). Type III interferon (IFN) induces a type I IFN-like response in a restricted subset of cells through signaling pathways involving both the Jak-STAT pathway and the mitogen-activated protein kinases. *Journal of virology*, 81(14), 1k 7749-7758. doi: 10.1128/JVI.02438-06
- Zhu, Z., Xing, X., Huang, S., & Tu, Y. (2021). NAT10 promotes osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells by mediating N4-acetylcytidine modification of Gremlin 1. *Stem Cells International*, 2021(1), 8833527. doi: 10.1155/2021/8833527
- Takahashi, Y., Carpino, N., Cross, J. C., Torres, M., Parganas, E., & Ihle, J. N. (2003). SOCS3: an essential regulator of LIF receptor signaling in trophoblast giant cell differentiation. *The EMBO journal*. doi: 10.1093/emboj/cdg057
- Takashima, A., Matsue, H., Bergstresser, P. R., & Ariizumi, K. (1995). Interleukin-7—Dependent Interaction of Dendritic Epidermal T Cells with Keratinocytes. *Journal of investigative dermatology*, 105(1), S50-S53. doi: 10.1111/1523-1747.ep12315288
- Tardu, M., Jones, J. D., Kennedy, R. T., Lin, Q., & Koutmou, K. S. (2019). Identification and quantification of modified nucleosides in *Saccharomyces cerevisiae* mRNAs. *ACS chemical biology*, 14(7), 1k 1403-1409. doi: 10.1021/acscchembio.9b00369
- Thalalla Gamage, S., Sas-Chen, A., Schwartz, S., & Meier, J. L. (2021). Quantitative nucleotide resolution profiling of RNA cytidine acetylation by ac4C-seq. *Nature protocols*, 16(4), 1k 2286-2307. doi: 10.1038/s41596-021-00501-9
- Thomas, G. E. O. R. G. E., Gordon, J. U. L. I. A. N., & Rogg, H. A. R. A. L. D. (1978). N4-Acetylcytidine. A previously unidentified labile component of the small subunit of eukaryotic ribosomes. *Journal of Biological Chemistry*, 253(4), 1k 1101-1105. doi: 10.1016/S0021-9258(17)38117-6

- Thorley, A. J., Goldstraw, P., Young, A., & Tetley, T. D. (2005). Primary human alveolar type II epithelial cell CCL20 (macrophage inflammatory protein-3 α)–induced dendritic cell migration. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 32(4), 1k 262-267. doi: 10.1165/rcmb.2004-0196OC
- Tonel, G., & Conrad, C. (2009). Interplay between keratinocytes and immune cells—recent insights into psoriasis pathogenesis. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 41(5), 1k 963-968. doi: 10.1016/j.biocel.2008.10.022
- Trewavas, A. J., & Malhó, R. (1997). Signal perception and transduction: the origin of the phenotype. *The Plant Cell*, 9(7), 1k 1181. doi: 10.1105/tpc.9.7.1181
- Tsoi, L. C., Rodriguez, E., Degenhardt, F., Baurecht, H., Wehkamp, U., Volks, N., ... & Weidinger, S. (2019). Atopic dermatitis is an IL-13–dominant disease with greater molecular heterogeneity compared to psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology*, 139(7), 1k 1480-1489. doi: 10.1016/j.jid.2018.12.018
- Tsoi, L. C., Spain, S. L., Knight, J., Ellinghaus, E., Stuart, P. E., Capon, F., ... & Trembath, R. C. (2012). Identification of 15 new psoriasis susceptibility loci highlights the role of innate immunity. *Nature genetics*, 44(12), 1k 1341-1348. doi: 10.1038/ng.2467
- Tsuruta, D. (2009). NF- κ B links keratinocytes and lymphocytes in the pathogenesis of psoriasis. *Recent patents on inflammation & allergy drug discovery*, 3(1), 1k 40-48. doi: 10.2174/187221309787158399
- Vallabhapurapu, S., & Karin, M. (2009). Regulation and function of NF- κ B transcription factors in the immune system. *Annual review of immunology*, 27(1), 1k 693-733. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132641
- Van Nuffel, E., Schmitt, A., Afonina, I. S., Schulze-Osthoff, K., Beyaert, R., & Hailfinger, S. (2017). CARD14-mediated activation of paracaspase MALT1 in keratinocytes: implications for psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology*, 137(3), 1k 569-575. doi: 10.1016/j.jid.2016.09.031
- Wang, Y., Huang, J., & Jin, H. (2022). Reduction of methyltransferase-like 3-mediated RNA N6-methyladenosine exacerbates the development of psoriasis vulgaris in imiquimod-induced psoriasis-like mouse model. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(20), 12672. doi: 10.3390/ijms232012672
- Wang, N., Tang, H., Wang, X., Wang, W., & Feng, J. (2017). Homocysteine upregulates interleukin-17A expression via NSun2-mediated RNA methylation in T lymphocytes. *Biochemical and biophysical research communications*, 493(1), 1k 94-99. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.09.069
- Wang, X., Feng, J., Xue, Y., Guan, Z., Zhang, D., Liu, Z., ... & Yin, P. (2016). Structural basis of N 6-adenosine methylation by the METTL3–METTL14 complex. *Nature*, 534(7608), 1k 575-578. doi: 10.1038/nature18298
- Wang, B., Zhang, J., Li, G., Xu, C., Yang, L., Zhang, J., ... & Liu, B. (2023). N-acetyltransferase 10 promotes cutaneous wound repair via the NF- κ B-IL-6 axis. *Cell Death Discovery*, 9(1), 324. doi: 10.1038/s41420-023-01628-2

Wang, X., Zhao, B. S., Roundtree, I. A., Lu, Z., Han, D., Ma, H., ... & He, C. (2015). N6-methyladenosine modulates messenger RNA translation efficiency. *Cell*, 161(6), 1388-1399. doi: 10.1016/j.cell.2015.05.014

Watanabe, Y. I., & Gray, M. W. (2000). Evolutionary appearance of genes encoding proteins associated with box H/ACA snoRNAs: cbf5p in *Euglena gracilis*, an early diverging eukaryote, and candidate Gar1p and Nop10p homologs in archaeobacteria. *Nucleic acids research*, 28(12), 2342-2352. doi: 10.1093/nar/28.12.2342

Watkins, L. R., Maier, S. F., & Goehler, L. E. (1995). Immune activation: the role of pro-inflammatory cytokines in inflammation, illness responses and pathological pain states. *Pain*, 63(3), 289-302. doi: 10.1016/0304-3959(95)00186-7

Wiener, D., & Schwartz, S. (2021). The epitranscriptome beyond m6A. *Nature Reviews Genetics*, 22(2), 119-131. doi: 10.1038/s41576-020-00295-8

Woese, C. R. (1967). The genetic code: The molecular basis for genetic expression. doi: 10.1073/pnas.55.4.966

Wong, R., Geyer, S., Weninger, W., Guimberteau, J. C., & Wong, J. K. (2016). The dynamic anatomy and patterning of skin. *Experimental dermatology*, 25(2), 92-98. doi: 10.1111/exd.12832

Woodley, D. T. (2017). Distinct fibroblasts in the papillary and reticular dermis: implications for wound healing. *Dermatologic clinics*, 35(1), 95-100. doi: 10.1016/j.det.2016.07.004

Wu, Z., Neufeld, H., Torlakovic, E., & Xiao, W. (2018). Uev1A-Ubc13 promotes colorectal cancer metastasis through regulating CXCL1 expression via NF- κ B activation. *Oncotarget*, 9(22), 15952. doi: 10.18632/oncotarget.24640

Xiao, W., Adhikari, S., Dahal, U., Chen, Y. S., Hao, Y. J., Sun, B. F., ... & Yang, Y. G. (2016). Nuclear m6A reader YTHDC1 regulates mRNA splicing. *Molecular cell*, 61(4), 507-519. doi: 10.1016/j.molcel.2016.01.012

Xiao, G., Harhaj, E. W., & Sun, S. C. (2001). NF- κ B-inducing kinase regulates the processing of NF- κ B2 p100. *Molecular cell*, 7(2), 401-409. doi: 10.1016/s1097-2765(01)00187-3

Xing, X., Liang, Y., Sarkar, M. K., Wolterink, L., Swindell, W. R., Voorhees, J. J., ... & Gudjonsson, J. E. (2016). IL-17 responses are the dominant inflammatory signal linking inverse, erythrodermic, and chronic plaque psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology*, 136(12), 2498-2501. doi: 10.1016/j.jid.2016.07.008

Yan, Q., Zhou, J., Wang, Z., Ding, X., Ma, X., Li, W., ... & Lu, C. (2023). NAT10-dependent N⁴-acetylcytidine modification mediates PAN RNA stability, KSHV reactivation, and IFI16-related inflammasome activation. *Nature Communications*, 14(1), 6327. doi: 10.1038/s41467-023-42135-3

Yanaba, K., Kamata, M., Ishiura, N., Shibata, S., Asano, Y., Tada, Y., ... & Sato, S. (2013). Regulatory B cells suppress imiquimod-induced, psoriasis-like skin inflammation. *Journal of leukocyte biology*, 94(4), 563-573. doi: 10.1189/jlb.1112562

Yasukawa, H., Misawa, H., Sakamoto, H., Masuhara, M., Sasaki, A., Wakioka, T., ... & Yoshimura, A. (1999). The JAK-binding protein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop. *The EMBO journal*. doi: 10.1093/emboj/18.5.1309

Yeo, H., Lee, Y. H., Koh, D., Lim, Y., & Shin, S. Y. (2020). Chrysin inhibits NF- κ B-dependent CCL5 transcription by targeting I κ B kinase in the atopic dermatitis-like inflammatory microenvironment. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(19), 1k 7348. doi: 10.3390/ijms21197348

Yildirim, I., Kierzek, E., Kierzek, R., & Schatz, G. C. (2014). Interplay of LNA and 2'-O-methyl RNA in the structure and thermodynamics of RNA hybrid systems: a molecular dynamics study using the revised AMBER force field and comparison with experimental results. *The journal of physical chemistry B*, 118(49), 1k 14177-14187. doi: 10.1021/jp506703g

Yousef, H., Alhajj, M., & Sharma, S. (2017). *Anatomy, skin (integument), epidermis*.

Yue, Y., Liu, J., & He, C. (2015). RNA N6-methyladenosine methylation in post-transcriptional gene expression regulation. *Genes & development*, 29(13), 1k 1343-1355. doi: 10.1101/gad.262766.115

Yue, Y., Liu, J., Cui, X., Cao, J., Luo, G., Zhang, Z., ... & Liu, J. (2018). VIRMA mediates preferential m6A mRNA methylation in 3' UTR and near stop codon and associates with alternative polyadenylation. *Cell discovery*, 4(1), 1k 10. doi: 10.1038/s41421-018-0019-0

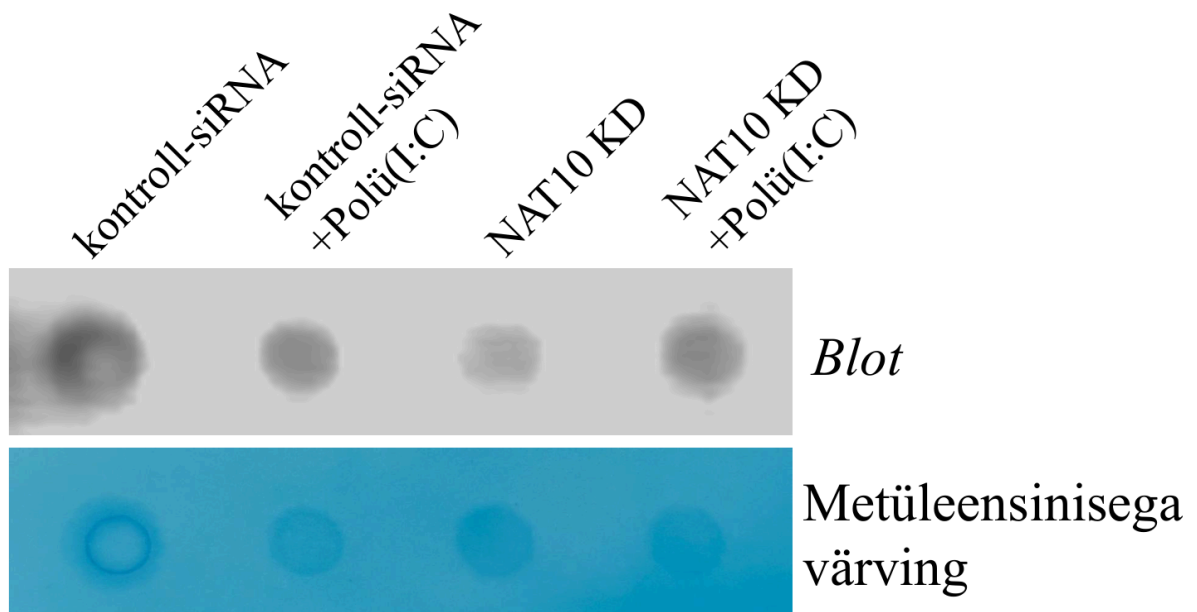
KASUTATUD VEEBIAADRESSID

1. European medicines Agency Assessment report on Comirnaty (Common name: COVID-19 mRNA vaccine) (nucleoside-modified) Procedure No. EMEA/H/C/005735/0000"
https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/comirnaty-epar-public-assessment-report_en.pdf (kasutatud 29.08.2024)
2. CD Genomics <https://rna.cd-genomics.com/acrip-sequencing.html> (kasutatud 15.05.2025)
3. Galaxy <https://usegalaxy.org/> (kasutatud 28.04.2025)
4. GEO andmebaas <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE121212> (kasutatud 29.04.2025)
5. g:Profiler <https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/gost> (kasutatud 28.04.2025)
6. Mayo Clinic
<https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/psoriasis/diagnosis-treatment/drc-20355845> (kasutatud 10.05.2025)
7. Modomics: Modified residues. (i.a). <https://genesilico.pl/modomics/modifications> (kasutatud 09.07.2024)
8. National Cancer Institute: NCI Dictionary of Cancer Terms. (i.a).
<https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/signaling-pathway> (kasutatud 25.03.2025)
9. Venny 2.1.0 <https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/> (kasutatud 28.04.2025)
10. WHO
https://www.who.int/docs/default-source/ncds/psoriasis-info-sheet-3.pdf?sfvrsn=a5d14e81_ (kasutatud 15.03.2025)

LISAD

Lisa 1. Magistritöös kasutatud praimerite loetelu ning nende pärisuunalised ja vastassuunalised järjestused (TAGCopenhagen).

Geen	Pärisuunaline järjestus	Vastassuunaline järjestus
CCL5	5'-AGTCGTCTTTGTCACCCGAAA-3'	5'-TCTCCATCCTAGCTCATCTCCAA-3'
CCL20	5'-CGGCGAATCAGAAGCAAGCAA-3'	5'-GCATTGATGTCACAGCCTTCAT-3'
CXCL1	5'-TTGCCTCAATCCTGCATCCC-3'	5'-GGTCAGTTGGATTTGTCACTGT-3'
CXCL10	5'-AAGCAGTTAGCAAGGAAAGGTCTA-3'	5'-GCCTCTGTGTGGTCCATCC-3'
eEF1A	5'-CCACCTTTGGGTCGCTTTGCTGT-3'	5'-TGCCAGCTCCAGCAGCCTTCTT-3'
IFI16	5'-TTTGTGAATGGGGTGTTTGA-3'	5'-CACCACCACTTCCATCTTCC-3'
IFITM1	5'-CAACACCCTCTTCTTGAAGTGG-3'	5'-GCCGAATACCAGTAACAGGATG-3'
IL-6	5'-AGTCCTGATCCAGTTCCTGC-3'	5'-CTGGCATTGTGGTTGGGTC-3'
IL-8	5'-GCAGCTCTGTGTGAAGGTGCAGTT-3'	5'-TTCTGTGTTGGCGCAGTGTGGTC-3'
JAK1	5'-GTCTTAGACCCCAGCCACAG-3'	5'-CACGATGTGTTTGTGGGAGA-3'
NAT10	5'-GTCAGCACCCTGCTGAGAA-3'	5'-AGCCACTTCTCCACTGCATC-3'
PIAS1	5'-CTGTTTTGCATTTGCCTTGA-3'	5'-AGTCACATTTGGTCCCAGAAA-3'
PIAS3	5'-CACTGTTCCCAACACCATTG-3'	5'-CAACTGCCTCACCAGGTACA-3'
SOCS1	5'-CCCTGGTTGTTGTAGCAGCTT-3'	5'-CAACCCCTGGTTTGTGCAA-3'
SOCS2	5'-GCTCGGTCAGACAGGATGGTA-3'	5'-CAAGAAAGTTCCTTCTGGTGCC-3'
SOCS3	5'-CCTCAGCATCTCTGTGCGGAAGA-3'	5'-GCATCGTACTGGTCCAGGAACT-3'
STAT1	5'-TCAAAATTCCTGGAGCAGGT-3'	5'-GAGGTCATGAAAACGGATGG-3'
STAT3	5'-GATGCTGGAGGAGAGAATCG-3'	5'-GCCGGTCTTGATGACGAG-3'
TNF- α	5'-GCTGCACTTTGGAGTGATCG-3'	5'-TCACTCGGGGTTGAGAGAAGA-3'



Lisa 2. ac4C tasemete analüüs *North-Western blot*-i abil NHEK rakkudes, mis transfekeeriti kontroll- või NAT10 siRNA-ga ning stimuleeriti Polü(I:C)-ga 6 tundi. Täiendavalt teostati membraanile kantud RNA-de võrdse koguse kontrollimiseks metüleensinisega värvimine.

LIHTLITSENTS

Mina, Valeria Naumova,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose “RNA modifikatsiooni ac4C roll inimese epidermaalsete keratinotsüütide rakulises vastuses”, mille juhendaja on Pavel Kudrin,

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada Tartu Ülikooli digitaalarhiivi kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni;
2. annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi kaudu Creative Commonsi litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni;
3. olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile;
4. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Valeria Naumova

20.05.2025