

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

MEDITSIINIVALDUSTE VALDKOND
BIO- JA SIIRDEMEDITSIINI INSTITUUT
RNA BIOLOOGIA UURIMISGRUPP

Nahas avaldunud mikroRNA-de ekspressiooni profiilide võrdlev analüüs atoopilise dermatiidi ja psoriaasi korral

Magistritöö

30 EAP

Laura Pajusaar

Juhendajad Prof Ana Rebane

PhD Julia Maslovskaja

TARTU 2020

Nahas avaldunud mikroRNA-de ekspressiooni profiilide võrdlev analüüs atoopilise dermatiidi ja psoriaasi korral

Atoopiline dermatiit ja psoriaas on kroonilised põletikulised nahahaigused, millel leidub sarnasusi molekulaarsetes mehhanismides. MikroRNA-d on 21-25 nukleotiidi pikad üheaheelalised mittekodeerivad RNA-d, mis reguleerivad geeniekspressiooni transkriptsioonijärgselt. Varasemalt on näidatud atoopilise dermatiidi ja psoriaasi patsientide naha miRNA-de ekspressiooni profiilide erinevust kontrollisikutest, kuid need tööd ei kaasa viimaste aastate jooksul avastatud sadu uusi miRNA-sid. Käesolevas töös tuvastati, et atoopilise dermatiidi ja psoriaasi korral on suur osa erinevalt ekspresseerunud miRNA-dest ülesreguleeritud mõlemas haiguses. miR-28-5p, miR-31-5p ja miR-378a-3p ekspressiooni erinevus atoopilise dermatiidi ja psoriaasi patsientide nahas valideeriti RT-qPCR meetodil. Lisaks näidati, et nende kolme miRNA ekspressioon muutub proinflammatoorsete tsütokiinide ja allergeene sisaldava tolmuksüüsi toimele inimese primaarsetes keratinotsüütides.

Märksõnad: atoopiline dermatiit, psoriaas, mikroRNA, põletik, koekultuurid

CERCS: B210 Histoloogia, tsütokeemia, histokeemia, koekultuurid; B500 immunoloogia, seroloogia transplantoloogia; B630 Dermatoloogia, veneroloogia

Comparative analysis of the skin microRNA expression profiles in atopic dermatitis and psoriasis

Atopic dermatitis and psoriasis are chronic inflammatory skin diseases with similarities in their molecular mechanisms. MicroRNAs are 21-25 nucleotides long single-stranded non-coding RNAs that regulate gene expression at the post-transcriptional level. It has previously been shown that the miRNA expression profiles in the skin of atopic dermatitis and psoriasis differ from the controls, however, these studies do not include hundreds of miRNAs discovered during recent years. In the current thesis, we demonstrate that a large proportion of the differentially expressed miRNA-s in the skin is upregulated in both atopic dermatitis and psoriasis. The altered expression of miR-28-5p, miR-31-5p and miR-378a-3p was validated in the skin of atopic dermatitis and psoriasis patients by RT-qPCR. In addition, we show that the expression of these miRNAs is altered in human primary keratinocytes when stimulated with proinflammatory cytokines and house dust mite lysate containing allergens.

Keywords: atopic dermatitis, psoriasis, microRNA, inflammation, tissue culture

CERCS: B210 Histology, cytochemistry, histochemistry, tissue culture; B500 Immunology, serology, transplantation; B630 Dermatology, venerology

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	8
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	9
1.1. Naha ehitus ja barjääri funktsioon	9
1.2. Atoopiline dermatiit ja selle kliiniline pilt	10
1.2.1. Atoopilise dermatiidi geneetika ja tekkepõhjused.....	10
1.2.2. Atoopilise dermatiidi molekulaarsed mehhanismid	12
1.2.3. Ravi võimalused	14
1.3. Psoriaas ja selle kliiniline pilt	15
1.3.1. Psoriaasi geneetika ja riskifaktorid.....	16
1.3.2. Psoriaasi immunoloogilised mehhanismid	17
1.3.3. Ravi võimalused	19
1.4. MikroRNA-de biogenees.....	20
1.4.1. miRNA-de bioloogiline funktsioon.....	22
1.4.2. miRNA-de ekspressioon ja funktsioonid atoopilises dermatiidis ja psoriaasis.....	23
2. EKSPERIMENTAALOSA	26
2.1. Töö eesmärgid	26
2.2. Materjal ja meetodika.....	26
2.2.1. Uuringusse kaasatud invidiidid	26
2.2.2. Inimese primaarsete keratinotsüütide kasvatamine, paljundamine ja stimuleerimine tsütokiinidega	27
2.2.3. RNA eraldus	28
2.2.4. RT-qPCR mRNA tasemete uurimiseks	28
2.2.5. RT-qPCR miRNA tasemete uurimiseks	30
2.2.6. GeneTitan MicroRNA mikrokiip patsientide miRNA-de ekspressiooni profiili uurimiseks.....	31
2.2.7. Statistiline analüüs.....	32
2.3 Tulemused	33
2.3.1. Atoopilise dermatiidi ja psoriaasi patsientide miRNA-de ekspressiooni profiil nahas	33
2.3.2. miR-28-5p, miR-31-5p ja miR-378a-3p valideerimine RT-qPCR meetodiga	35
2.3.3. Proinflammatoorsete tsütokiinide ekspressioon stimuleeritud keratinotsüütides...	37
2.3.4. miR-146a ja valideeritud miRNA-de ekspressioon stimuleeritud keratinotsüütides	38

2.4 Arutelu	41
KOKKUVÕTE	46
SUMMARY	47
TÄNUSÕNAD	48
KASUTATUD KIRJANDUS	49
KASUTATUD VEEBIAADRESSID	60
LISAD	61
LIHTLITSENTS.....	64

KASUTATUD LÜHENDID

- AD – atoopiline dermatiit (*atopic dermatitis*)
- AGO – Argonaut valk (*Argonaute*)
- AMP – antimikroobne peptiid (*antimicrobial peptide*)
- APC – antigeeni esitavad rakud (*antigen presenting cells*)
- BCL2L2 - *Bcl2-like2 protein*
- BPE – veise hüpofüüsi ekstrakti (*bovine pituitary extract*)
- CAF1 – *Chromatine assembly factor 1*
- CCL – kemokiin C-C motiiviga ligand (*C-C motif chemokine ligand*)
- CCR – C-C kemokiini retseptor (*C-C chemokine receptor*)
- CXCL1 – kemokiin C-X-C motiiviga ligand (*C-X-C motif chemokine ligand 1*)
- DC – dendriitrakud (*dendritic cells*)
- DCP2 - *Decapping mRNA 2*
- DGCR8 – *DiGeorge syndrome chromosomal region 8*
- EASI – ekseemi leviku ja raskuse indeks (*Eczema Area and Severity Index*)
- EF1A – elongatsioonifaktor 1-alfa (*elongation factor 1 alpha*)
- FC - ekspressioonitaseme korduse erinevus (*fold change*)
- FDR – valeavastuse määr (*false discovery rate*)
- FERMT1 – *Fermitin family member 1*
- FGFR2 – *Fibroblast growth factor receptor 2*
- FLG – filagriin (*filaggrin*)
- GW182 – 182kDa glütsiin-trüptofaan valk (*glycine-tryptophan protein of 182 kDa*)
- GWAS – ülegenoomsed assotsiatsiooni uuringud (*genome-wide association studies*)
- HDM – kodu tolmulest – (*house dust mite*)
- HLA – *Human leucocyte antigen*
- IFN – interferoon (*interferon*)
- IGA – skoor atoopilise dermatiidi raskusastme hindamiseks (*Investigators' Global Assessment*)
- IgE – immunoglobuliin E (*immunoglobulin E*)
- IGF-1R – *Insulin-like growth factor 1 receptor*
- IL – interleukiin (*interleukin*)
- IL-17R – interleukiin 17 retseptor (*interleukin-17 receptor*)
- iNOS – indutseeritav lämmastikoksiidi süntaas (*inducible nitric oxide synthase*)
- IRAK1 – *interleukin-1 receptor associated kinase 1*

JAK – Janus-kinaas (*Janus kinase*)
KC – keratinotsüüdid (*keratinocytes*)
KIR retseptor – *Killer immunoglobulin like receptor*
LC – Langerhansi rakud (*Langerhans cells*)
mAb – monoklonaalne antikeha (*monoclonal antibody*)
MAPK1 – mitogeeniga aktiveeritav kinaas (*Mitogen-Activated Protein Kinase 1*)
mDC – müeloidne dendriitrakk (*myeloid dendritic cell*)
MHC – peamine koesobivuskompleks (*major histocompatibility complex*)
miR, miRNA – mikroRNA (*microRNA*)
NF-κB – tuumafaktor κB (*nuclear factor kappa B*)
NGS – järgmise põlvkonna sekveneerimine (*next generation sequencing*)
NHEK – normaalsed inimese epidermaalsed keratinotsüüdid (*normal human epidermal keratinocytes*)
NK rakk – loomulik tapjarakk (*natural killer cell*)
NOT1-5 *Negative on TATA 1-5*
PASI – *Psoriasis Area Severity Index*
PBS – fosfaadiga puhverdatud soolalahus (*phosphate buffered saline*)
pDC – plasmatsütoidne dendriitrakk (*plasmacytoid dendritic cell*)
PS – psoriaas (*psoriasis*)
PSORS1 – psoriaasi vastuvõtlikkuse regioon 1 (*Psoriasis susceptibility region 1*)
rEGF – inimese rekombinantne epidermaalne kasvufaktor (*human recombinant epidermal growth factor*)
RISC – RNA-indutseeritud vaigistav kompleks (*RNA-induced silencing complex*)
RNAas – ribonukleaas (*ribonuclease, RNase*)
RT-qPCR – pöördtranskriptsiooni kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon (*reverse transcription quantitative polymerase chain reaction*)
SCORAD – atoopilise dermatiidi skaala (*SCORing Atopic Dermatitis*)
SEM – standardviga (*standard error of the mean*)
SFM – seerumivaba sööde (*serum-free medium*)
SNP – ühenukleotiidne polümorfism (*single nucleotide polymorphism*)
SOCS3 – *Suppressor of cytokine signaling 3*
STAT – *Signal transducer and activator of transcription*
STK40 – seriin/treoniin kinaas 40 (*Serine/threonine kinase 40*)
Tc – tsütotoksiline T-lümfotsüüt (*cytotoxic T cell*)
TGF-β – *Transforming growth factor beta*

Th – abistaja T-lümfotsüüt (*T helper cell*)

Tip-DC – TNF α ja indutseeritavat lämmastikoksiidi süntaasi produtseerivad dendriitrakud

TLR – Tolli-laadne retseptor (*Toll-like receptor*)

TNF α – tuumor-nekroosi faktor alfa (*tumor necrosis factor alpha*)

TRAF6 – *TNF receptor-associated factor 6*

T-rakk – T-lümfotsüüt

TSLP – tüümuse stromaalne lümfopoetiin (*thymic stromal lymphopoietin*)

UTR – mitte-transleeritav regioon (*untranslated region*)

VGEF – vaskulaarse endoteeli kasvufaktor (*vascular endothelial growth factor*)

SISSEJUHATUS

Atoopiline dermatiit on krooniline põletikuline nahahaigus, mis mõjutab elu jooksul kuni viiendikku inimestest arenenud maades (Weidinger ja Novak, 2016). Haiguse kliinilist pilti iseloomustavad naha sügelus ja punakas ketendav lööve (Lyons *et al.*, 2015). Atoopiline dermatiit on multifaktoriaalne haigus, mille tekkemehhanismid ei ole veel täielikult selged, kuid on näidatud, et oluline roll on geneetilistel ja immuunsüsteemi talitluse eripäradel, nahabarjääri kaitsevõimekusel ning erinevatel keskkonnafaktoritel, sealhulgas allergeenidel (Kim *et al.*, 2019). Haiguse patogeneesis on kesksel kohal ülemäärased immuunvastused, mis on vahendatud erinevate abistaja T-lümfotsüütide, peamiselt teist tüüpi abistaja T-lümfotsüütide poolt (Th2 – *T-helper 2 cell*) (Muraro *et al.*, 2016).

Psoriaas on teine väga tuntud krooniline põletikuline nahahaigus, mille keskmine levimus maailmas on 2-4% (Parisi *et al.*, 2013). Selle haiguse kliinilisele pildile on iseloomulikud selgelt piiritletud põletikulised punakad ketendavad laigud, mis on põhjustatud keratinotsüütide hüperproliferasioonist (Griffiths ja Barker, 2007). Sarnaselt atoopilisele dermatiidile on psoriaas multifaktoriaalne haigus, mille tekkepõhjused ei ole lõplikult selged, kuid on teada, et psoriaasi molekulaarses patogeneesis on tähtsal kohal ülemäärased immuunvastused, mis on vahendatud eelkõige Th17 ja vähemal määral Th22 ja Th1 rakkude poolt (Lebwohl, 2003; Woo *et al.*, 2017)

MikroRNA-d on lühikesed (21-25 nukleotiidi) mittekodeerivad RNA-d, mis reguleerivad geenide ekspressiooni transkriptsioonijärgselt, seondudes mittetäieliku komplementaarsuse alusel sihtmärk mRNA-le (Lau *et al.*, 2001; Bartel, 2009). MikroRNA-de funktsioone on kirjeldatud mitmete bioloogiliste protsesside reguleerimisel, nende seas rakkude proliferatsioon, diferentseerumine ja apoptoos ning immuunvastuste regulatsioon (O'Connell *et al.*, 2012; Yi ja Fuchs, 2010). MikroRNA-de häiritud regulatsiooni seostatakse mitmete erinevate haigustega, nende seas ka atoopiline dermatiit ja psoriaas (Lovendorf ja Skov, 2015)

Antud magistritöö eesmärgiks oli teha kindlaks miRNA-de ekspressiooni profiilid atoopilise dermatiidi ja psoriaasi patsientide nahas võrreldes kontrollisikutega, valideerida kiibi andmete põhjal kolme valitud miRNA ekspressiooni erinevused RT-qPCR meetodil ning seejärel uurida, kas nende miRNA-de ekspressioon on mõjutatud põletikulistes nahahaigustes oluliste tsütokiinide ja allergeene sisaldava tolmuksa stimuleeritud keratinotsüütides.

Magistritöö valmis Tartu Ülikooli molekulaar- ja rakubioloogia instituudi biomeditsiini õppekava raames. Eksperimentaalne osa viidi läbi Tartu Ülikooli bio- ja siirdemeditsiini instituudi biomeditsiini osakonna RNA bioloogia uurimisgrupis.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Naha ehitus ja barjääri funktsioon

Nahk on inimese suurim organ, mis on füüsiliseks barjääriks organismi ja väliskeskkonna vahel. Nahabarjääri üheks tähtsamaks ülesandeks on kaitsta organismi erinevate välistegurite eest, sealhulgas UV-kiirguse, kemikaalide ja mikroorganismide eest. Samuti on nahal väga oluline roll, et kaitsta organismi dehüdratatsiooni ehk veekaotuse eest ning reguleerida kehatemperatuuri. Lisaks on nahal ka iseparanemisvõime (Honari ja Maibach, 2014). Nahk jaguneb kihistunud epidermiseks (marrasknahk) ning dermiseks (pärisnahk). (Wickett ja Visscher, 2006).

Epidermis on kõige pealmine nahakiht, mille moodustavad peamiselt erinevates arengufaasides olevad keratinotsüüdid ning see jaguneb neljaks kihiks: basaalkiht, ogakiht, sõmerkiht ja sarvkiht. Basaalkihi moodustavad paljunemisvõimelised keratinotsüüdid, mis arenevad ja muutuvad metaboolselt aktiivseks oga- ja sõmerkihis ning diferentseeruvad lõplikult sarvkihis tuumata korneotsüütideks (Walt, 1989; Wickett ja Visscher, 2006). Keratinotsüüdid on sõmerkihis üksteisega tihedalt seotud tiheliiduste abil ning säilitavad tihedalt paiknemise omaduse ka sarvkihis, millel on naha barjääri funktsioonis kõige olulisem roll (Richmond ja Harris, 2014). Korneotsüüdid koosnevad põhiliselt keratiini filamentidest, mis on seotud filagriini abil (Kezic ja Jakasa, 2016). Filagriin on oluline valk barjääri funktsioonis, mis säilitab sarvkihi struktuuri. Filagriini lagundamisel tekivad produktid, mis on olulised vee sidumisel, naha niisutamisel ja happelise pH taseme hoidmisel, mis on naha barjääri normaalseks toimimiseks tähtsad tegurid (Baroni *et al.*, 2012; Kezic ja Jakasa, 2016).

Epidermise moodustavad suuremas osas keratinotsüüdid ning dermise osa peamiseks rakkudeks on fibroblastid. Lisaks leidub nahas ka teisi rakutüüpe, milleks on melanotsüüdid, Merkeli rakud, leukotsüüdid ning antigeeni esitavad Langerhansi rakud (LC - *Langerhans cells*) ja dendriitrakud (DC – *dendritic cells*) (Brandner *et al.*, 2015). Patogeeni või muu ärritaja nahka sisenemisejärgse immuunvastuse tekitamiseks on vajalikud interaktsioonid immuunrakkude ja keratinotsüütide vahel. Keratinotsüütide pinnal leidub erinevaid patogeene äratundvaid retseptoreid, nende seas näiteks Tolli-laadsed retseptorid (TLR – *Toll-like receptor*), mille kaudu aktiveeritakse tuumafaktor κB (NF- κB – *nuclear factor kappa B*) signaalirada ja hakatakse tootma põletikku soodustavaid mediaatoreid (Baker *et al.*, 2003; Kuo *et al.*, 2013). Vigase nahabarjääri korral satub rohkem patogeene ja allergeene organismi, mis viib tugevama põletikulise vastuseni ning seda on näha atoopilises dermatiidis.

1.2. Atoopiline dermatiit ja selle kliiniline pilt

Atoopiline dermatiit (AD – *atopic dermatitis*) on heterogeenne krooniline põletikuline nahahaigus, mille levimus on viimase 30 aasta jooksul kasvanud ning tänapäeval on see üks levinumaid nahahaiguseid, mõjutades arenenud maades kuni viiendikku populatsioonist elu jooksul (Deckers *et al.*, 2012; Weidinger ja Novak, 2016). Haigus avaldub enamasti juba lapseas ning arvatakse, et maailmas on levimus laste seas 15-20% ning täiskasvanute puhul 2,9-4,9% (Nutten, 2015; Barbarot *et al.*, 2018). Paljud uuringud on näidanud, et AD kujunemisele aitavad kaasa mutatsioonid epidermise terviklikkuse eest vastutavates geenides, nahabarjääri ja immuunsüsteemi ebanormaalne talitus, muutused naha mikrobioomis, keskkond ning elustiil (Kim *et al.*, 2019).

AD olulisemateks kliinilisteks tunnusteks on naha sügelus ning ketendav lööve, mis võib olla akuutne ehk äge või krooniline. Akuutset löövet iseloomustavad sügelevad paapulid, seroosse eksudaadi eritumine ja punetus ning võib esineda ka ketendust. Kroonilisele lööbele on iseloomulik lihhenisatsioon ehk naha haiguslik paksenemus, karedus ja kuivus ning ketendus (Lyons *et al.*, 2015). Lööbe lokalisatsiooni järgi eristatakse kliinilises pildis kolme eaga seotud varianti: imikuea, lapsea ja täiskasvanuea AD. Iseloomulikud lööbekohad imikutel on nägu, jäsemed ja keha, lastel küünarnuki siseküljed ja põlveõndlad, täiskasvanutel lisaks ka käed ja randmed (Weidinger ja Novak, 2016). Umbes 80%-l lastest on haigus kergema kuluga. Sel juhul on kergemateks sümptomiteks näiteks kuivade pigmenteerunud laikude esinemine või käte ekseem. Haigust iseloomustavad veel üldine nahakuivus, mis on tingitud nahabarjääri kahjustustest ja atoopia ehk soodumus allergiate tekkeks (Weidinger ja Novak, 2016).

Sageli eristatakse AD-l kahte vormi – allergiline ja mitteallergiline. Allergilise vormi puhul on IgE antikehade tase tõusnud ning seda põevad 55-85% AD haigetest. Mitteallergilise vormi puhul on vastupidiselt allergilisele vormile IgE antikehade tase normaalne (Schmid *et al.*, 2001). Immunoloogiliselt on AD haigetel normaalsest kõrgem T-lümfotsüütide tase ja repertuaar nii põletikulises kui ka näiliselt terves nahas (Brunner *et al.*, 2017).

1.2.1. Atoopilise dermatiidi geneetika ja tekkepõhjused

Paljud uuringud on näidanud, et AD on väga heterogeenne haigus, mis avaldub keskkonna faktorite mõjul indiviidides, kellel on geneetiline soodumus haiguse tekkeks. Näiteks on haiguse esinemise risk kõrgem kui perekonnas esineb AD või allergilisi haiguseid (Apfelbacher *et al.*, 2011). On tehtud mitmeid uuringuid ka kaksikutega, kus haiguse esinemise tulemused on varieeruvad: monosügootsete kaksikute puhul on näidatud koosinemise riskiks 15-86%

ning disügootsetel kaksikutel 5-41%. Lisaks on geneetiliste faktorite leidmiseks tehtud ka ülegenoomseid assotsiatsiooni uuringuid (GWAS – *Genome-wide association study*) ning on leitud üle 31 haigusega seotud regiooni genoomis (Paternoster *et al.*, 2015; Weidinger *et al.*, 2018). Kõigi uuringute tulemusi arvestades on arvatud, et AD üldine päritavuse risk on 75% (Elmose ja Thomsen, 2015)

Kõige suuremaks teadaolevaks geneetiliseks riskiks peetakse mutatsioone filagriini kodeerivas *FLG* geenis, mis viivad selle valgu ekspressiooni vähenemiseni. Umbes 10% eurooplastest kannavad heterosügootset *FLG* funktsioonikaoga mutatsiooni (*loss-of-function mutation*), mis põhjustab filagriini ekspressiooni vähenemist. Filagriini defitsiidi tõttu on nahabarjäär kahjustunud, mis võimaldab rohkemate allergeenide, antigeenide ning kemikaalide jõudmist organismi (Irvine *et al.*, 2011). Samas on kõik senised juhtkontrolluuringud (*case-control study*) näidanud ka, et *FLG* mutatsioonid on olemas ka isikutel, kellel ekseemi ei esine. Lisaks on näidatud, et suurel osal AD patsientidel puuduvad mutatsioonid *FLG* geenis, mis tähendab, et haiguse tekkes mängivad rolli ka muud geneetilised ja/või keskkonna faktorid (Baurecht *et al.*, 2007; Weidinger *et al.*, 2008)

Lisaks on geneetiliselt AD tekkega seostatud ka polümorfisme mitmetes immuunsüsteemi funktsioonidega seotud geenides, näiteks teist tüüpi abistaja T-lümfotsüütide (Th2 – *T helper 2 cell*) tsütokiinide klasteri geenides 5. kromosoomis. Selles klasteris asuvad geenid, millelt kodeeritakse teist tüüpi immuunvastuse tsütokiine interleukiin(IL)-4 ja IL-13, mille sekreteerimise tulemusel arenevad B-lümfotsüüdid IgE antikehi tootvateks plasmarakkudeks. Sellest klastrist on leitud näiteks kaks ühenukleotiidsset polümorfismi (SNP – *single nucleotide polymorphism*), mille puhul on näidatud seost IL-13 ekspressiooni tõusuga (Paternoster *et al.*, 2012; Weidinger *et al.*, 2013). Need SNP variandid on pigem geneetilised variandid, mis on riskimarkeriteks, kuid ei oma otseselt põhjuslikku rolli haiguse tekkes (Weidinger *et al.*, 2018).

Keskkonna ning elustiili faktorid mängivad AD tekkes suurt rolli. Kõige olulisemaks neist on naha mikroobioomi muutused. AD patsientidel on mikroobide mitmekesisus vähenenud ning 30-100% juhtudest on näha suurenenud *S. aureuse* kolonisatsiooni nahal, mis tihti korreleerub haiguse raskusastmega (Paller *et al.*, 2019). On tehtud ka mõned uuringud, kus näidatud, et linnakeskkonnas elades on suurem risk AD tekkeks kui maal, seda on seotud ka hügieeni hüpoteesiga ja vähese eksponeeritusega UV-kiirgusele (Schram *et al.*, 2010; Flohr ja Mann, 2014). Argieluga seotud faktoritest on arvatud mõju olevat näiteks Läänemaailmale iseloomulikul suhkru- ja rasvarohkel dieedil ning ka kliimal, mille puhul on näidatud, et

soojemas ja päikselisemas kliimas on AD haigete naha seisukord parem kui külmemas ja niiskemas kliimas (Byremo et al., 2006; Suárez-Varela et al., 2008; Ellwood et al., 2013).

1.2.2. Atoopilise dermatiidi molekulaarsed mehhanismid

AD on väga komplekssete patofüsioloogiliste mehhamismidega haigus, kus saab eristada nii akuutset ehk ägedat kui ka kroonilist faasi. AD-l on kirjeldatud mitmeid erinevaid vorme ning fenotüüpe vanuse, haiguse kroonilisuse, rahvuse ja IgE antikehade taseme järgi ning erinevaid endotüüpe molekulaarsete mehhanismide põhjal (Czarnowicki *et al.*, 2019). Lihtsustatult on välja pakutud molekulaarse patogeneesi iseloomustamiseks kaks endotüüpi, kus esimese korral on keskne roll 2. tüüpi immuunvastusel, mille eest vastutavad Th2 rakud ning teise endotüübi korral mängivad rolli veel lisaks Th2 rakkudele ka Th1, Th17 ja Th22 rakud ning epidermaalse barjääri kahjustused (Muraro *et al.*, 2016). Th2 rakkudel on oluline roll akuutses faasis ning kroonilises faasis lisanduvad ka teised Th rakutüübid.

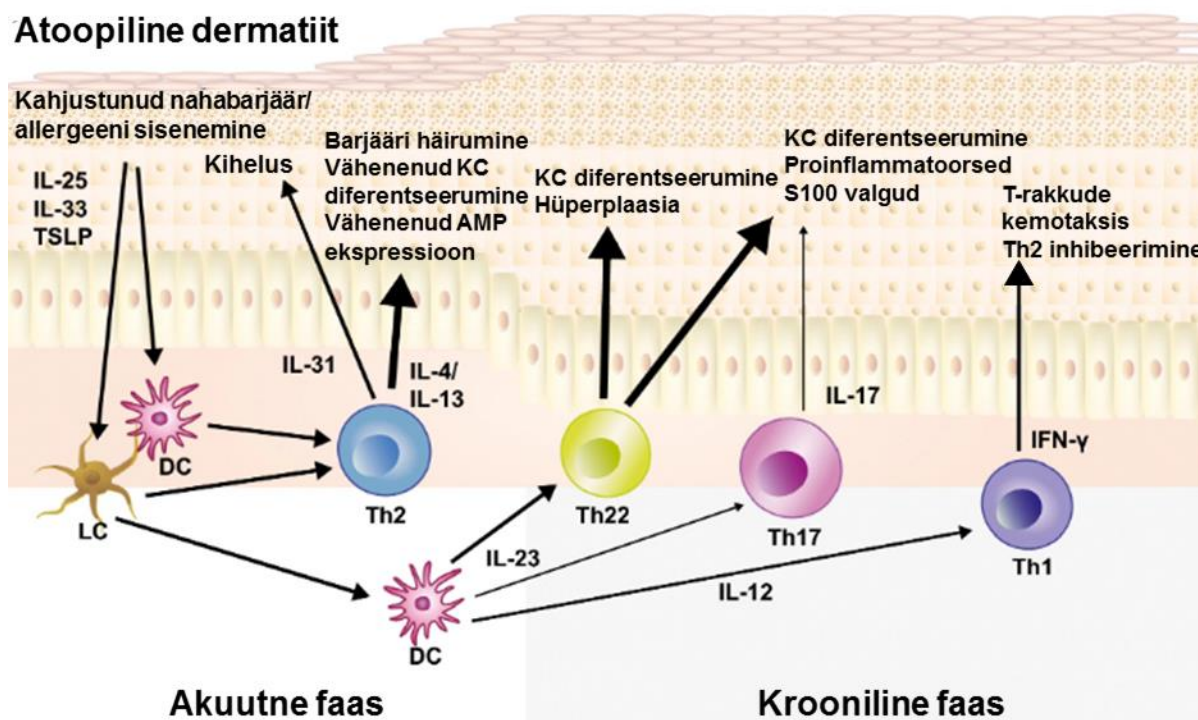
AD patsientide kahjustunud nahabarjäär võimaldab allergeenidel lihtsamini organismi pääseda. Nahabarjäär võib olla kahjustunud nii geneetilise eelsoodumuse, näiteks *FLG* mutatsioonide, kui ka kihelusest tingitud sügamise tõttu, mis põhjustab mehaanilise trauma. Selle tulemusel hakatakse keratinotsüütides tootma põletikku soodustavaid mediaatoreid nagu näiteks IL-1 β , IL-25, IL-33 ja tuumase strooma lümfoetiini (TSLP – *thymic stromal lymphopoietin*) ning algatatakse akuutne faas (Joonis 1) (Weidinger *et al.*, 2018). Keratinotsüütides toodetud proinflammatoorsete mediaatorite, näiteks TSLP toimel aktiveeruvad DC rakud, mis stimuleerivad T-rakkude diferentseerumist Th2 rakkudeks (Soumelis *et al.*, 2002). DC ja LC on ka antigeeni presenteerivad rakud (APC – *antigen presenting cell*), mis püüavad allergeeni sisenemisel selle molekuli kinni ning esitlevad T-rakkudele, mille tulemusel hakkavad rakud tootma Th2 omaseid tsütokiine (Humeniuk *et al.*, 2017). Allergeeniks võib olla näiteks kodu tolmulest (HDM – *house dust mite*), millel on tuvastatud mitu võimalikku antigeeni, mille suhtes on AD patsiendid tundlikud (Nakamura et al., 2006; Banerjee et al., 2015).

Th2 toodavad erinevaid tsütokiine, nende seas IL-4, IL-13 ja IL-31 (Brandt, 2011). Need tsütokiinid mõjutavad keratinotsüütide diferentseerumist ja proliferereerumist ning on näidatud, et nende tõttu väheneb nahabarjääri toimimiseks oluliste valkude, seehulgas filagriini ekspressioon (Danso *et al.*, 2014). Lisaks on ka näidatud, et IL-4 ning IL-13 supresseerivad antimikroobsete peptiidide (AMP – *antimicrobial peptide*) tootmist, mis annab bakteritele, näiteks *S. aureusele* võimaluse nahka koloniseerida (Ong *et al.*, 2002). IL-31 on veel seotud AD löövetele omase sügeluse ja kiheluse tekkega (Gittler *et al.*, 2012). Suurele osale AD patsientidest on iseloomulik kõrgem IgE tase, mis võib olla põhjustatud sellest, et IL-4 ning IL-

13 aktiveerivad B-rakke, mis arenevad IgE antikehi tootvateks plasmarakkudeks (Leung *et al.*, 2004).

AD-s on näidatud veel ka teiste Th rakkude olulisust. Akuutses ja kroonilises faasis osalevad Th22 toodavad IL-22, mille puhul on näidatud toimet keratinotsüütide proliferatsioonile ja epidermaalse hüperplaasia tekkele. Lisaks on akuutses faasis näidatud suurenenud proinflammatoorsete S100 valkude taset. On arvatud, et S100 valkude tase võib olla ülesreguleeritud IL-22 ja IL-17 koostoimel (Gittler *et al.*, 2012). Seejuures on Th17 omale IL-17 AD-s palju vähem ekspresseeritud kui psoriaasis ning funktsioon AD-s on rohkem seotud AMP, sealhulgas S100 valkude tootmise indutseerimisega (Guttman-Yassky *et al.*, 2008). Kroonilist põletikku iseloomustab immuunvastuse tugevnemine ning Th1 rakkude aktiveerumine ja lisandumine põletikukoldeksesse, kus nad toodavad peamiselt IFN- γ (Gittler *et al.*, 2012).

Atoopiline dermatiit



Joonis 1. Atoopilise dermatiidi patogenees. Kahjustunud nahabarjääri ja allergeeni sisenemise tulemusel hakkavad keratinotsüüdid (KC) tootma tsütokiine IL-25, IL-33 ja TSLP, mis aktiveerivad DC ja LC. Seejärel aktiveerunud DC ja LC stimuleerivad Th2 rakkude ning tsütokiinide IL-4, IL-13 ja IL-31 tootmist. Nimetatud tsütokiinid põhjustavad edasisi barjääri kahjustusi, muutusi keratinotsüütide geeniekspressioonis ja kihelustunnet. Kroonilises faasis lisanduvad Th1, Th17 ja Th22 rakud, mis samuti stimuleerivad keratinotsüütide tootmist proinflammatoorseid mediaatoreid, mis omakorda meelitavad immuunrakke põletikukoldeksesse. Lisaks mõjutavad tsütokiinid keratinotsüütide diferentseerumist ja indutseerivad epidermise paksenemist. Modifitseeritud ja tõlgitud Guttman-Yassky *et al.*, 2018 järgi.

1.2.3. Ravi võimalused

Olenevalt haiguse raskusastmest, kasutatakse AD ravis nii lokaalset ehk paikset kui ka süsteemset ravi. Kliinilistes uuringutes kasutatakse AD raskusastme hindamiseks erinevaid skooore, enim kasutatavamad neist on näiteks AD skaala SCORAD (*SCORing Atopic Dermatitis*), ekseemi leviku ja raskuse indeks EASI (*Eczema Area and Severity Index*) ja IGA (*Investigators' Global Assessment*) (Rehal ja Armstrong, 2011). SCORAD ja EASI arvutamisel arvestatakse lööbe sümptomeid kehal ning SCORAD-i arvutamisel arvestatakse ka patsiendi hinnangut nahasügelusele ja magamatusele (Kunz et al., 1997; Hanifin et al., 2001). IGA skooriga hinnatakse haiguse üldist raskust ajahetkel, kasutades selleks kuuepunktulist skaalat (0=„puhas“ nahk, 1=peaaegu „puhas“ nahk, 2=kerge, 3=mõõduka, 4=raske ja 5=väga raske kuluga haigus) (Rehal ja Armstrong, 2011).

AD puhul on ravi suunatud sümptomite leevendamisele. Selleks on kasutusel erinevaid ravivõtteid, mis on enamasti suunatud kas naha barjääri taastamisele (kreemid, salvid), põletikuliste protsesside maha surumisele (immuunsupressiivsed ravimid, fototeraapia) või haiguse patogeneesis oluliste tsütokiinide või nende retseptorite inhibeerimisele (bioloogiline ravi). Üldjuhul ravitakse kerge kuni mõõduka haiguse raskusastmega patsiente lokaalselt ehk paiksel, näiteks kreemidega (Lucky *et al.*, 1997). Niisutavate baaskreemide kasutamine on AD ravis oluline ning nende kasutamine võib leevendada sagedast glükokortikosteroidide sisaldavate kreemide kasutamise vajadust (Lodén, 2003). Lisaks glükokortikosteroididele kasutatakse lokaalses ravis ka kaltsineuriini inhibiitoreid, näiteks takroliimuse salvi (Wollenberg *et al.*, 2008). Kergemate ja mõõdukate juhtude korral on võimalus rakendada ka fototeraapiat. On tehtud ka uuring, kus on näidatud patsientide IL-5, IL-13 ja IL-31 ekspressiooni vähenemist pärast kuuenädalast ultraviolettkiirguse (UV-A1) teraapiat (Gambichler *et al.*, 2008).

Raskematel juhtudel kasutatakse süsteemsete ravimitena ka suukaudseid ravimeid, näiteks immuunsupressiivset tsüklosporiini (Ring *et al.*, 2012). Potentsiaalseteks ravimiteks on veel Janus-kinaasi (JAK – *Janus kinase*) inhibiitorid, mida võib manustada nii nahale kui ka suukaudselt ning nendega on käimas AD patsientidega mitu kliinilist uuringut (Solimani *et al.*, 2019). Üheks selliseks ravimiks on näiteks suukaudne JAK inhibiitor baricitinib, mis on praegu kasutusel ka reumatoidartriidi ravis. Baricitinib moduleerib proinflammatoorsete tsütokiinide signaaliradu ning selle kasutamisel on näidatud AD patsientide EASI skoori vähenemist 50% võrra 16 nädala jooksul (Guttman-Yassky *et al.*, 2019).

Mõõduka kuni väga raske AD korral on näidustatud ka bioloogiline ravi. Dupilumab on esimene bioloogiline ravim, mis AD ravis kasutusele võeti. Tegemist on rekombinantse inimese

IgG4 monoklonaalse antikehaga (mAb – *monoclonal antibody*), mis seondub IL-4R α retseptoriga ja pärsib seeläbi IL-4 ja IL-13 vahendatud signaaliülekanne (Beck *et al.*, 2014). Ravimitööstus on aastate jooksul palju arenenud ning tehtud on mitmeid erinevaid kliinilisi uuringuid, et arendada AD jaoks uusi potentsiaalseid bioloogilisi ravimeid (Baghoomian *et al.*, 2020). Kliinilisi uuringuid on tehtud näiteks IL-13 vastaste antikehadega (tralokinumab ja lebrizumab), mis andsid lubavaid tulemusi IL-13 märklauana kasutamises (Simpson *et al.*, 2018; Wollenberg *et al.*, 2019). Lisaks on tehtud kliinilisi uuringuid ka ustekinumabi (IL-12/23 subühiku p40 vastane mAb) ja secukinumabiga (IL-17A vastane mAb), mida kasutatakse edukalt psoriaasi ravis, kuid AD korral ei ole kummagi puhul nähtud märkimisväärseid tulemusi (Khattry *et al.*, 2017; Ungar *et al.*, 2020)

1.3. Psoriaas ja selle kliiniline pilt

Psoriaas (PS – *psoriasis*) on krooniline immuunsüsteemi poolt vahendatud põletikuline nahahaigus, mille esinemissagedus populatsioonis on keskmiselt 2-4% (Griffiths ja Barker, 2007; Parisi *et al.*, 2013). Enamasti avaldub PS varajases täiskasvanueas, kuid umbes kolmandikul patsientidest lööb haigus välja enne 16. eluaastat (Lowes *et al.*, 2007; Raychaudhuri ja Gross, 2000). PS on multifaktoriaalne haigus, kus mängivad olulist rolli naha rakkude ja immuunsüsteemi interaktsioonid ning mille avaldumist mõjutavad ka geneetilised ning keskkonnafaktorid (Lebwohl, 2003).

PS-l eristatakse mitut erinevat vormi, millest enamlevinud on krooniline naastuline psoriaas ehk *psoriasis vulgaris*, mida esineb umbes 90% patsientidest (Griffiths ja Barker, 2007). Haiguse kliinilist pilti iseloomustavad selgelt piiritletud sümmeetrilised punased või roosad põletikulised ketendavad laigud, mis on põhjustatud keratinotsüütide hüperprolifereerumisest (Feldman ja Clark, 1998; Griffiths ja Barker, 2007). Lööbelises nahas on basaalkihi rakkude proliferatsiooni kiirus suurenenud, mis viib naha paksenemiseni ning selle omaduse järgi on võimalik eristada õhemate või paksemate naastudega PS-i (Christensen *et al.*, 2006; Nestle *et al.*, 2009). Löövet võib esineda igal pool, kuid kõige sagedamateks kohtadeks on peanahk, kere ja jäsemed. Sümptomitena võivad esineda ka sügelemine, põletustunne ja valu (Greb *et al.*, 2016).

PS ei mõjuta ainult nahka, vaid on süsteemne põletik ning sellega on seostatud ka mitmeid kaasuvaid haiguseid. Enamlevinumaks kaasnevaks haiguseks on psoriaatiline artriit ehk liigesepõletik, mida esineb olenevalt uuringust 11-30% haigetest (Gelfand *et al.*, 2005; Mease *et al.*, 2013). Kaasuvateks haigusteks võivad olla veel näiteks kardiovaskulaarsed haigused,

Crohni tõbi, diabeet, metaboolne sündroom ja depressioon (Griffiths ja Barker, 2007; Ogdie *et al.*, 2015).

1.3.1. Psoriaasi geneetika ja riskifaktorid

Nii geneetilised kui ka keskkonnafaktorid mõjutavad PS tekkimist. Geneetilise tausta olulisust on näidatud mitmete uuringutega perekondade ning ka kaksikute seas (Gupta *et al.*, 2014). Monosügootsetel kaksikutel on näidatud haiguse koosesinemise tõenäosuseks 65-72% ja disügootsetel 15-30% (Wuepper *et al.*, 1990; Lønnberg *et al.*, 2013). On arvatud, et PS üldine geneetiline päritavuse risk on hinnanguliselt 66% ning ülejäänud 34% eest vastutavad erinevad keskkonnafaktorid (Grjibovski *et al.*, 2007). Geneetiliste faktorite leidmiseks teostatud GWAS uuringutega on nüüdseks tuvastatud juba üle 63 lookuse, mida on haigusega seostatud (Tsoi *et al.*, 2017; Rahmati *et al.*, 2020).

Kõige tugevamat seost on näidatud PSORS1 (*Psoriasis susceptibility locus 1*) ehk PS vastuvõtlikkuse lookuses 1, mis asub 6. kromosoomil peamise koesobivuskompleksi (MHC - *major histocompatibility complex*) regioonis (Sagoo *et al.*, 2004). Sellest piirkonnast on leitud 11 geeni, mille seas on PS-ga kõige tugevamat seost näidatud HLA (*human leucocyte antigen*) alleeli *HLA-Cw6* puhul. HLA-C on MHC I tüüpi molekul, mis esitleb antigeene T-rakkudele ja reguleerib loomulike tapjarakkude (NK rakud – *natural killer cells*) aktiivsust KIR retseptorite (KIR – *killer immunoglobuline like receptors*) kaudu (Nair *et al.*, 2006). Sõltuvalt KIR retseptorist, võivad need interaktsioonid NK rakke aktiveerida või inhibeerida. On võimalik, et *Cw6* alleelil on efekt HLA-C ekspressioonile või aktiivsusele, mis põhjustab immuunsüsteemi ebanormaalsel talitust, mis võib omakorda viia PS tekkeni (Gupta *et al.*, 2014). *Cw6*-positiivsetel ehk alleeli kandjatel on näidatud PS varasemat avaldumist, ulatuslikumat löövet kätel, jalgadel ja kehal ning raskemat haiguse kulgu kui *Cw6*-negatiivsetel patsientidel (Gudjonsson *et al.*, 2006). GWAS uuringute tulemuste analüüsimisel on leitud lisaks mitmele lookusele ka juba üle 126 PS-ga seostatud geeni ning geeniradade analüüsiga on näidatud, et enamik neist geenidest osalevad immuunsüsteemiga seotud signaaliradades, näiteks NF- κ B (Nanda *et al.*, 2020; Rahmati *et al.*, 2020). Leitud geenide hulka kuuluvad näiteks ka *IL-23R*, *TYK2* (*tyrosine kinase 2*) ja *TNFSF15* (*TNF superfamily member 15*), mis on olulised IL-23/Th17 teljel (Dand *et al.*, 2017).

PS puhul on teada ka mõned keskkonna või elustiilifaktorid, mis võivad haiguse kulgu mõjutada. Haiguse ägenemist on näidatud näiteks M-proteiini tootvatest streptokokkidest põhjustatud kurgu infektsioonide korral (Gudjonsson *et al.*, 2003). Uuringutega on näidatud, et suurem kehamassiindeks (>26) korreleerub PS raskusastmega ning suitsetamine, alkoholi

suurem tarbimine ning stress tõstavad PS-i esinemise riski. Stressirohked elusündmused võivad samuti PS patsientidel esile kutsuda haiguse ägenemist (Naldi et al., 2005; Murray et al., 2009; Verhoeven et al., 2009).

1.3.2. Psoriaasi immunoloogilised mehhanismid

PS patsientidel võivad lööbe kujunemist põhjustada erinevad faktorid, nende seas näiteks erinevatest kemikaalidest või tsütokiinidest põhjustatud põletik, bakteriaalsed infektsioonid ja naha füüsiline vigastus, mida tuntakse Koebneri fenomenina (Bowcock ja Krueger, 2005; Kalayciyan *et al.*, 2007). Sarnaselt AD-le on ka PS T-lümfotsüütide poolt vahendatud haigus. Varasemalt on arvatud, et PS-i peamiseks põhjustajaks on keratinotsüütide ebanormaalne epidermaalne diferentseerumine koos keratinotsüütide suurenenud paljunemisega. Hiljem leiti, et keratinotsüütide suurenenud paljunemist põhjustab immuunsüsteemi aktivatsioon nahas, mille eest vastutavad suures osas abistaja T-rakud (Krueger, 2002). Haiguse molekulaarses patogeneesis omavad põhilist rolli Th1, Th17, Th22 ja nahas paiknevad kaasasündinud immuunrakud, mis tähendab, et nii kaasasündinud kui ka omandatud immuunsüsteemi interaktsioonid on haiguse tekkel olulised (Woo *et al.*, 2017).

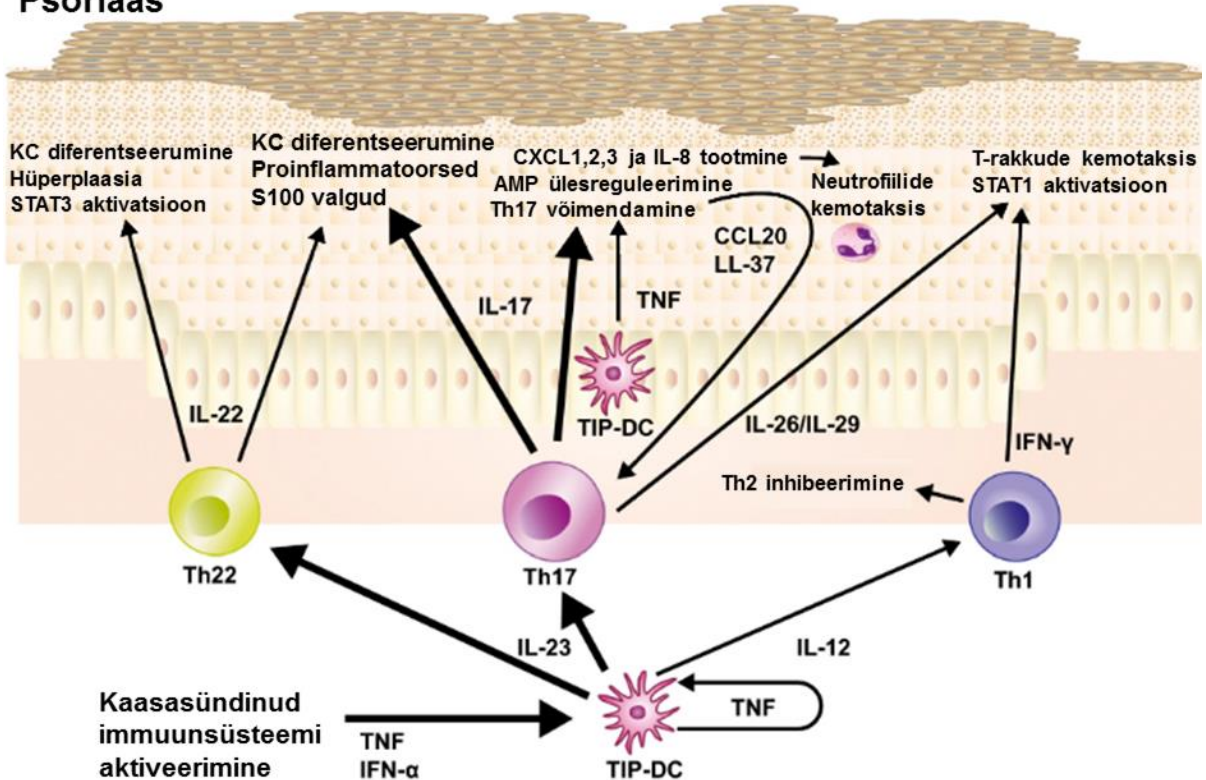
PS omase lööbe tekke algatamist on näidatud TNF- α ja indutseeritava lämmastikoksiidi süntaasi (iNOS - *inducible nitric oxide synthase*) tootvate DC (Tip-DC) aktiveerumisega, mis toodavad TNF- α ja IL-23 ning indutseerivad Th17 tüüpi immuunvastuse tekkimist (Joonis 2) (Dainichi *et al.*, 2018). Tip-DC aktiveeruvad kaasasündinud immuunsüsteemi aktivatsiooni tõttu toodetud IFN- α ja TNF- α toimel. Kaasasündinud immuunsüsteemi aktiveerimisel üheks võimalikuks mehhanismiks on plasmatsütoidsete DC (pDC - *plasmacytoid dendritic cell*) aktiveerumine keratinotsüütide poolt toodetud AMP, näiteks katelitsidiini LL-37 ja kahjustunud rakkudest pärit DNA komplekside seondumine pDC pinnal asuvate TLR retseptoritega, mille tulemusel produktseeritakse IFN- α (Morizane *et al.*, 2012). IFN- α stimuleerib müeloidseid DC (mDC - *myeloid dendritic cells*) ja Tip-DC tootma teisi proinflammatoorseid tsütokiine, sealhulgas IL-12, IL-23 ja TNF- α , mis suunavad naiivseid T-rakke diferentseeruma erinevateks Th populatsioonideks (Blanco *et al.*, 2008).

Th1 rakkudega seostatakse tsütokiine IFN- γ , IL-2 ja IL-12, millest viimane suunab naiivseid T-rakke diferentseeruma Th1 rakkudeks (Jacob *et al.*, 2003). Ka Th1 rakud ise toodavad IFN- γ , mis aktiveerib mDC rakke tootma tsütokiine IL-1 β ja IL-23, mis omakorda suunavad Th17 populatsiooni arengut ja migreerumist nahka ning see on oluline T-rakkude kemotaksises (Kryczek *et al.*, 2008). Ühtlasi põhjustab IFN- γ keratinotsüütides transkriptsioonifaktori STAT1 (*Signal transducer and activator of transcription 1*) liikumise tuuma (Hald *et al.*, 2013)

IL-23 stimuleerimise toimet toodavad Th17 rakud PS-i põletikus olulisi tsütokiine, sealhulgas IL-17, mis aktiveerib keratinotsüüte produtseerima erinevaid AMP, kemokiine ja proinflammatoorseid tsütokiine. Nende seas kemokiin C-X-C motiiviga ligand 1 (CXCL1 – *C-X-C motif chemokine ligand 1*) ja IL-8, mis soodustavad neutrofiilide liikumist kudedesse. (Nograles et al., 2008; Chiricozzi et al., 2014). Lisaks toodavad keratinotsüüdid ka kemokiin C-C motiiviga ligandi 20 (CCL20 – *C-C motif chemokine ligand 20*), mis meelitab Tip-DC ja Th17 rakke põletikukoldesse (Harper et al., 2009; Chan et al., 2018). TNF- α mõjul suureneb keratinotsüütides IL-17R (*interleukin-17 receptor*) ekspressioon, mis omakorda tugevdab IL-17A efekti ja võimendab Th17 vastust (Johnston et al., 2014). Samuti on näidatud, et IL-17A võib aidata kaasa keratinotsüütide hüperproliferaatsioonile (Shi et al., 2011). Th17 rakkude poolt toodetud IL-26 ja IL-29 aktiveerivad samuti keratinotsüütides STAT1, mis soodustab mitmete kemokiinide produktsiooni (Chan et al., 2018).

Th22 rakud toodavad IL-22, mis indutseerib samuti põletikuliste tsütokiinide tootmist keratinotsüütides (Boniface et al., 2005). Lisaks aitab IL-22 kaasa PS iseloomuliku fenotüübi tekkimisele, põhjustades keratinotsüütide suurenenud proliferaatsiooni ja takistades epidermise diferentseerumist läbi STAT3 transkriptsioonifaktori aktivatsiooni (Wolk et al., 2006; Calautti et al., 2018). Sarnaselt AD-le, stimuleerivad IL-22 ja IL-17 antimikroobsete S100 valkude tootmist ka PS-s (Gittler et al., 2012).

Psoriaas



Joonis 2. Psoriaasi patogeneesi mehhanismid. Kaasasündinud immuunsüsteemi aktiveerimise tulemusel stimuleeritakse IL-23 tootvad Tip-DC, mis omakorda indutseerivad IL-17 produtseerivaid Th17 rakke. IL-17 indutseerib keratinotsüüte (KC) tootma neutrofiile meelitavaid kemokiine ning AMP ekspressiooni. Th22 rakud mõjutavad KC diferentseerumisega seotud geenide avaldumist ja nende poolt toodetav IL-22 initsieerib hüperplaasiat. IL-17 ja IL-22 mõjutavad keratinotsüütide diferentseerumist ja proinflammatoorsete mediaatorite tootmist. Modifitseeritud ja tõlgitud Guttman-Yassky *et al.*, 2018 järgi.

1.3.3. Ravi võimalused

PS ei saa välja ravida, kuid on võimalik sümptomeid leevendada. Ravi sõltub haiguse raskusastmest, mida määratakse enamasti kliinilise pildi alusel, kasutades selleks erinevaid mõõdikuid. Üheks laialdaselt kasutatavaks mõõdikuks on PASI (*Psoriasis Severity Area Index*), mille abil hinnatakse lööbe punetust, induratsiooni ehk naha paksenemist, ketendust ja lööbe ulatust kehal. Lihtsamalt saab PS patsiente jagada haiguse kulu alusel kahte gruppi: kerge (*mild*) ning mõõdukas (*moderate*) kuni raske (*severe*) (Mrowietz *et al.*, 2011).

Ravi eesmärgiks on põletiku leevendamine ning kergema PS korral kasutatakse enamasti nahale kantavaid ehk lokaalseid ravimeid, vahel koostöös fototeraapiaga. Sarnaselt AD-le kuuluvad paiksete ravimite hulka näiteks glükokortikosteroidid, kaltsineuriini inhibiitorid ja ka D-vitamiini analoogid (Arnone *et al.*, 2019). Mõõdukas kuni raske PS vajab tihtipeale süsteemset ravi ning seda rakendatakse eraldi või koos fototeraapiaga. Üheks süsteemse ravi võimaluseks

on tsüklosporiin, mida võib kasutada perioodiliselt ja lühiajaliselt (Ho *et al.*, 2001). Kuna PS puhul võib esineda ka kaasuvaid haiguseid, siis tuleb ravimi valikul ka neid arvesse võtta. Näiteks psoriaatilise artriidiga patsientide ravis kasutatakse süsteemse ravimina metotreksaati (Coates ja Helliwell, 2016). Lisaks on ka PS ravis näidatud JAK inhibiitorite võimalikku toimet ning käivitatud mitu kliinilist uuringut, kus uuritakse suukaudsete JAK inhibiitorite efektiivsust (Solimani *et al.*, 2019).

PS ravis on bioloogilised ravimitega saavutatud paremaid tulemusi kui AD ravis. Haiguse ravis kasutatavate bioloogiliste ravimite peamiseks märklaudadeks on näiteks TNF- α ja IL-23/Th17 telg. TNF- α vastased antikehad olid esimeste bioloogiliste ravimite seas, mis PS ravis kasutusele võeti. Üheks selliseks on näiteks infliximab, mille puhul on näidatud PASI skoori kuni 90% paranemist (Reich *et al.*, 2005). Lisaks on kasutusel ka teisi TNF- α vastaseid antikehi, nagu näiteks adalimumab (Strober *et al.*, 2018). Hiljem lisandusid ka teised bioloogilised ravimid, mille märklauaks on IL-23/Th17 teljel olulised komponendid. Haiguse ravis kasutatakse veel näiteks ustekinumabi (IL-12 ja IL-23 ühise alaühiku p40 vastane mAb) ja secukinumabi (IL-17A vastane mAb), millest viimane on andnud edukamaid tulemusi (Bagel *et al.*, 2018).

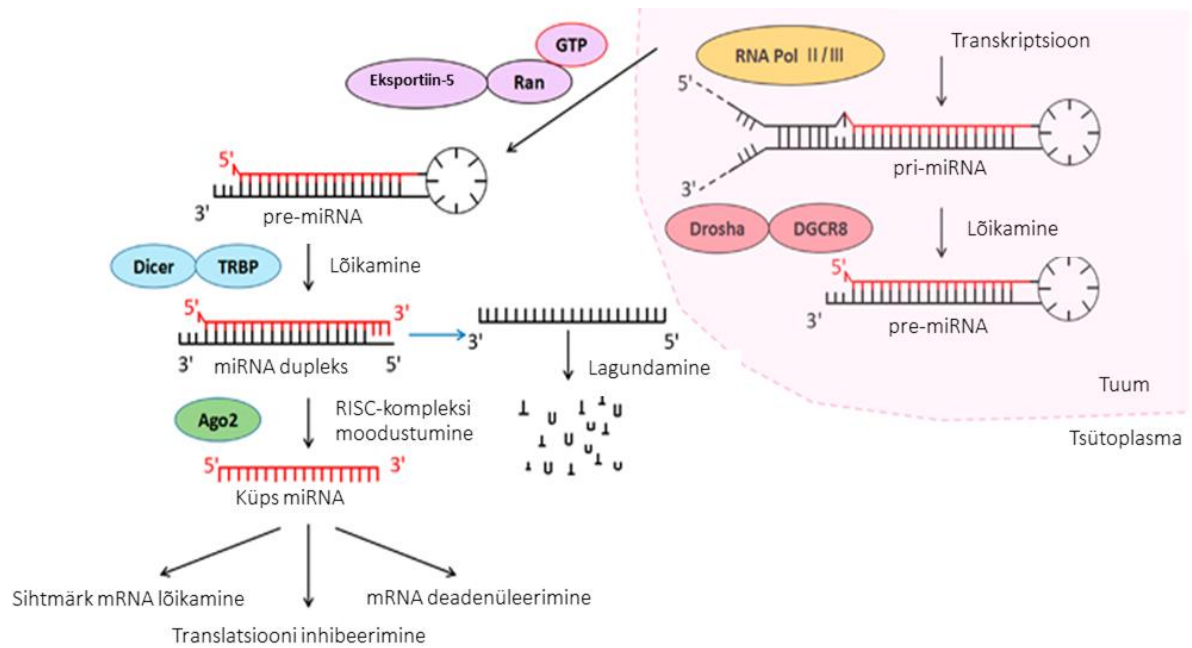
1.4. MikroRNA-de biogenees

MikroRNA-d (miRNA-d) on lühikesed üheaheelised mittekodeerivad RNA-d, mis reguleerivad geenide ekspressiooni transkriptsioonijärgselt. Nende pikkus jääb enamasti vahemikku 21-25 nukleotiidi (Lau *et al.*, 2001). Esimene miRNA *lin-4* avastati 1993. aastal *C. elegans*is, kus kirjeldati tema funktsiooni LIN-14 valgu taseme regulatsioonis (Lee *et al.*, 1993). Nüüdseks on ainuüksi inimeses teada üle 2600 miRNA (miRBase andmebaas, väljalase 22.1). Nende funktsioone on kirjeldatud mitmete arenguprotsesside reguleerimisel, sealhulgas rakkude proliferatsioonil, diferentseerumisel ja apoptoosis (Yi ja Fuchs, 2010). Lisaks on miRNA-de rolli kirjeldatud ka stressi- ning immuunvastuste regulatsioonis (Leung ja Sharp, 2010; O'Connell *et al.*, 2012). Üldreeglina miRNA-d represseerivad geenide ekspressiooni seondudes osalise komplementaarsuse alusel oma sihtmärkjärjestusele, mille tagajärjel vastav mRNA degradeeritakse või represseeritakse translatsiooni (Bartel, 2009). MikroRNA-de ebanormaalset regulatsiooni on näidatud mitmetes erinevates haigustes, nende seas ka põletikulised nahahaigused (Lovendorf ja Skov, 2015).

MikroRNA-sid kodeerivad alad on jaotunud üle kogu genoomi ning neid transkribeeritakse iseseisvatelt geenidelt, valke kodeerivate geenide intronitest või eksonitest ning ka erineva suurusega miRNA geeniklastrite poolt. Lisaks on leitud geenide intronitest miRNA-de klastreid

(Rodriguez *et al.*, 2004). Enam kui pooled loomseid miRNA-sid paiknevad valke kodeerivate või mittekodeerivate geenide intronites ning on transkribeeritud RNA polümeraas II poolt (Joonis 3) (Kim ja Kim, 2007). Esmaseid pikki juuksenõela-taolisi struktuure sisaldavaid transkripte nimetatakse pri-miRNA-deks ning sarnaselt mRNA-le on ka neile lisatud 5' otsa metüülguanosiini struktuur ja 3' otsa polüA saba (Cai *et al.*, 2004). Pri-miRNA-d töödeldakse tuumas, kus RNAas III tüüpi ensüüm Drosha koostöös kofaktoriga DGCR8 (*DiGeorge syndrome chromosomal region 8*) moodustavad mikroprotsessor-kompleksi, mis lõikab välja ~70 nukleotiidi pikkuse juuksenõelastruktuuriga prekursor miRNA ehk pre-miRNA (Han *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2003). Seejärel transporditakse pre-miRNA Ekspordiin-5 ja Ran-GTP (*Ras-related nuclear protein*) kompleksi vahendusel tsütoplasmasse (Bohnsack *et al.*, 2004). On näidatud, et leidub ka grupp 7-metüülguanosiini (m⁷G)-struktuuriga miRNA-sid, millel on alternatiivne biogeneesi rada, kus osaleb protsessingus Ekspordiin-5 asemel Ekspordiin-1 (Martinez *et al.*, 2017).

Tsütoplasmas seondub pre-miRNA-ga RNAas III tüüpi ensüüm Dicer, mis lõikab välja umbes 22 nukleotiidi pikkuse miRNA dupleksi (Bernstein *et al.*, 2001). Dicer võib seonduda pre-miRNA nii 3' üleulatuvale otsale ja lõigata miRNA dupleksist teatud kauguselt kui ka 5' fosforüleeritud otsale ja lõigata ~22 nukleotiidi kauguselt (Park *et al.*, 2011). Lõikamise järel Dicer vabaneb ning miRNA dupleks seondub Argonaut (AGO) perekonna valguga, milleks enamasti on Argonaut-2 (AGO2) (Meister *et al.*, 2004). Selles etapis toimub ka miRNA juhtahela valimine, mis sõltub 5' otsa termodünaamilisest stabiilsusest. Enamasti saab juhtahelaks ebastabiilsema 5' otsaga ahel ning teine ahel lagundatakse (Khvorova *et al.*, 2003; Schwarz *et al.*, 2003). Teise ahela lagundamise järel valmib RNA-indutseeritud vaigistamise kompleks (RISC – *RNA-induced silencing complex*), kus lisaks AGO2 valgule on oluliseks komponendiks GW182 (*glycine-tryptophan protein of 182 kDa*) valk (Eulalio *et al.*, 2008).



Joonis 3. MikroRNA-de biogeneesi rada. Esmalt transkribeeritakse miRNA geenidelt RNA polümeraas II poolt pri-miRNA-d, mis lõigatakse tuumas Drosha-DGCR8 kompleksi poolt lühemateks pre-miRNA-deks. Eksportiin-5 vahendusel transporditakse pre-miRNA-d tsütoplasmasse, kus Dicer lõikab ära terminaalse ligu ning alles jääb miRNA dupleks. Seejärel liitub AGO2 valk küpse miRNA-ga ning moodustub RISC kompleks, mis on võimeline seonduma sihtmärk-mRNA-ga. Modifitseeritud ja tõlgitud Wu *et al.*, 2018 järgi.

1.4.1. miRNA-de bioloogiline funktsioon

MikroRNA-de peamiseks funktsiooniks on reguleerida geenide ekspressiooni transkriptsioonijärgselt ning seda teevad nad moodustunud RISC kompleksi abil. Enim kirjeldatud mehhanismi esimeseks sammuks on miRNA sihtmärkjärjestuse ära tundmine, mis asub mRNA 3' mittetransleeritavas piirkonnas (UTR – *untranslated region*). Sihtmärgile seondumine toimub Watson-Crick komplementaarsuse alusel miRNA-l asuva seemnejärjestuse (*seed sequence*) järgi, milleks loetakse miRNA 5' otsa 2. kuni 8. nukleotiidi. (Lewis *et al.*, 2003, 2005)

Täieliku komplementaarsuse korral sihtmärk mRNA lagundatakse, sest AGO2 viib läbi mRNA endonukleaasse lõikamise. Siiski sihtmärgid on enamasti vaid osaliselt komplementaarsed, mis põhjustab mRNA translatsiooni inhibeerimise ja mRNA deadenüleerimise (Huntzinger ja Izaurralde, 2011). Viimasel juhul toimub esmalt mRNA deadenüleerimine CAF1-CCR4-NOT1 deadenülaasi kompleksi poolt, mis koosneb valkudest CAF1 (*Chromatine assembly factor 1*), CCR4 (*C-C chemokine receptor type 4*) ja NOT1 kuni NOT5 (*Negative on TATA 1-5*) (Piao *et al.*, 2010). Seejärel eemaldatakse metüülguanosiini struktuur DCP2 (*decapping mRNA 2*)

ensüümi vahendusel ja transkript lagundatakse 5'-3' suunalise eksonukleaasi abil (Behm-Ansmant *et al.*, 2006; Piao *et al.*, 2010).

1.4.2. miRNA-de ekspressioon ja funktsioonid atoopilises dermatiidis ja psoriaasis

AD ja PS patsientide nahas on tervetest inimestest erinev miRNA-de ekspressiooni profiil, mida näidati esmakordselt 2007. aastal mikrokiibi analüüsiga (Sonkoly *et al.*, 2007). Selles uuringus näidati AD ja PS patsientide miRNA-de ekspressiooni olulist erinevust nahas võrreldes tervete kontrollproovidega. Lisaks näidati nii erinevusi kui ka sarnasusi AD ja PS patsientide lööbelise naha miRNA-de ekspressioonimustrite vahel. Nüüdseks on avaldatud ka mitmeid töid, mis käsitlevad miRNA-de erinevaid funktsioone seoses AD ja/või PS-ga.

Üheks miRNA-ks, mille olulisust on näidatud mõlemas põletikulises nahahaiguses, on miR-146a, mille puhul on tegemist põletikulisi protsesse stimuleeriva transkriptsioonifaktori NF- κ B signaaliraja negatiivse regulaatoriga. miR-146a hakatakse ekspresseerima NF- κ B signaaliraja aktiveerumise tulemusel ning on näidatud, et miR-146a reguleerib omakorda signaaliraja aktiivsust, inhibeerides raja olulisi liikmeid IRAK1 (*IL-1 receptor-associated kinase*) ja TRAF6 (*TNF receptor-associated factor 6*) (Taganov *et al.*, 2006). Lisaks reguleerib miR-146a IRAK1 ja TRAF6 kaudu ka TNF- α signaalirada (Sonkoly *et al.*, 2008). AD patsientide nahast pärit keratinotsüütides on näidatud miR-146a suurenenud ekspressiooni. Kuna miR-146a üleekspressioon inhibeerib keratinotsüütides põletikuliste tsütokiinide, näiteks CCL5 (*C-C motif chemokine ligand 5*) ja IL-8 tootmist, on miR-146a funktsioon AD puhul tõenäoliselt põletikku pärssiv (Rebane *et al.*, 2014). Samuti on näidatud, et PS iseloomulike tsütokiinide tootmine põhjustab miR-146a suurenenud ekspressiooni, mis eeldatavasti võib viia põletikuliste protsesside inhibeerimiseni ja keratinotsüütide hüperproliferaatsiooni maha surumiseni. Üheks PS-ga seotud miR-146a märklaudgeeniks on FERMT1 (*fermitin family member 1*), mis on oluline regulaator keratinotsüütide proliferatsiooniregulatsioonis ja normaalse naha struktuuri moodustumises (Hermann *et al.*, 2017).

AD puhul on näidatud ka mitmete teiste miRNA-de funktsioone. Näiteks on näidatud AD patsientide lööbelises ja näiliselt terves nahas miR-10a-5p kõrgeenenud ekspressiooni võrreldes tervete kontrollidega. miR-10a-1 on võime mõjutada keratinotsüütide rakutsükli ja inhibeerida proliferatsiooni, mis omakorda võib viia nahabarjääri funktsiooni häireteni (Vaher *et al.*, 2019). Samuti on arvatud, et ka miR-29b kõrgeenenud ekspressioon võib AD-ga seostatud nahabarjääri ebanormaalsele funktsioneerimisele kaasa aidata. On näidatud, et miR-29b vahendab IFN- γ -indutseeritud apoptoosi keratinotsüütides sihtmärkgeeni BCL2L2 (*Bcl2-like2 protein*) kaudu, mis kodeerib anti-apoptoetilist valku (Gu *et al.*, 2017). NF- κ B raja reguleerimisel on lisaks

miR-146a-le on näidatud miR-124 võimalikku funktsiooni, sest miR-124 üleekspressioonil nähti proinflammatoorsete tsütokiinide tootmise vähenemist keratinotsüütides. Seetõttu arvatakse ka, et miR-124 üleekspressioonil võiks olla terapeutiline potentsiaal AD ravis (Yang *et al.*, 2017). Lisaks on terapeutilist potentsiaali pakutud välja miR-143 puhul, sest selle üleekspressioonil väheneb IL-13 mõju epidermaalsetes keratinotsüütides. Arvatakse, miR-143 üheks oluliseks sihtmärgiks on IL-13 retseptori alamühik IL-13R α 1 ja seetõttu väheneb IL-13 (Zeng *et al.*, 2016). AD puhul on näidatud ka miR-155 üleekspressiooni nahas CD4⁺ T-rakkudes. Ühe miR-155 märklaudgeenina tuvastati CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*), mis toimib T-rakkude aktivatsiooni negatiivse regulaatorina ning selle inhibeerimisel on immuunvastus tugevam, seega käitub miR-155 AD-s põletikulisi protsesse võimendavalt (Sonkoly *et al.*, 2010).

PS patsientide nahas on tuvastatud miR-21 kõrgeks ekspresseeritud ekspressioon. Inimese primaarseid T-rakke kasvatades on näidatud, et selle üleekspressioon *in vitro* surub maha T-rakkude apoptoosi, mis võib olla üheks põhjuseks, miks T-rakkude hulk on suurenenud PS patsientide nahas (Meisgen *et al.*, 2012). Samuti on PS puhul täheldatud miR-31 kõrgemat ekspressiooni nahas, mis viib põletikuliste tsütokiinide suurenenud tootmiseni, soodustab leukotsüütide liikumist nahka ja võimendab seeläbi põletikulisi protsesse. Seejuures on näidatud, et tsütokiinide ekspressiooni tõus keratinotsüütides leiab aset seetõttu, et miR-31 inhibeerib STK40 (*serine/threonine kinase 40*), mis on NF- κ B negatiivne regulaator (Xu *et al.*, 2013). MiR-203 on PS patsientide nahas kõrgelt ekspresseerunud ning selle üheks märklauaks on SOCS3 (*Suppressor of cytokine signaling 3*), mis on STAT3 negatiivne regulaator (Sonkoly *et al.*, 2007). On näidatud, et pidevalt aktiivne STAT3 võib viia PS-le omaste naastude tekkeni ning seega on miR-203-l PS korral põletikulisi protsesse pärssiv toime (Sano *et al.*, 2005).

Mõnedel juhtudel on PS ja AD korral tuvastatud ka miRNA-de ekspressiooni vähenemist. Üheks selliseks on näiteks miR-99a, mille ekspressioon on allareguleeritud keratinotsüütides ja epidermise pealmistes kihtides. On näidatud, et miR-99a üheks sihtmärkgeeniks on IGF-1R (*Insulin-like growth factor 1 receptor*), mis on keratinotsüütide proliferatsiooni positiivne regulaator basaalkihis ning teadaolevalt stimuleerib hüperkeratoosi (Lerman *et al.*, 2011). PS patsientide keratinotsüütides on täheldatud ka miR-125b vähenenud ekspressiooni. Kuna miR-125b reguleerib keratinotsüütide proliferatsiooni ja diferentseerumist osaliselt läbi FGFR2 (*Fibroblast growth factor receptor 2*), võib miR-125b ekspressiooni vähenemine soodustada haigusele iseloomulikke keratinotsüütide hüperprolifereerumist ja hälbinud diferentseerumist (Xu *et al.*, 2011).

PS-s eraldi on miRNA-de ekspressiooni profiile kirjeldatud rohkem kui AD puhul. Näiteks on tehtud mikrokiibi uuring PS patsientide lööbelise ja mittelööbelise naha proovides võrreldes kontrollisikutega, kus PS patsientide lööbelises nahas leiti kontrollisikutega võrreldes 42 ülesreguleeritud ja viis allareguleeritud miRNA-d, samas kui mittelööbelises leiti vastavalt üheksa üles- ja üks allareguleeritud miRNA (Zibert *et al.*, 2010). Järgmise põlvkonna sekveneerimisega (NGS – *next generation sequencing*) tuvastati PS patsientide nahast 125 kontrollidest erinevalt ekspresseerunud miRNA-d, millest 90 olid üles- ja 35 allareguleeritud (Joyce *et al.*, 2011). NGS on kasutatud ka PS lööbelise ja mittelööbelise epidermise ja dermise võrdlemiseks ning näidati, et lööbelises epidermises leidis 24 ja dermises 37 erinevalt reguleeritud miRNA-d (Løvendorf *et al.*, 2015). Hiljuti kirjeldati ka NGS meetodil miRNA-de ekspressiooni profiili keratinotsüütides, mis olid puhastatud PS patsientide nahast ning sel viisil tuvastati 104 kontrollidest erineva ekspressiooniga miRNA-d (Srivastava *et al.*, 2019). AD patsientide nahas on miRNA-de profiili oluliselt vähem uuritud. Mikrokiibi analüüsil on tuvastatud 44 kontrollidest erinevalt ekspresseerunud miRNA-d, millest 10 olid üles- ja 34 allareguleeritud (Sunkoly *et al.*, 2010). Kuigi tehnoloogiad on arenenud ja haiguste patogeneesis on tuvastatud sarnasusi, ei ole viimastel aastatel AD ja PS miRNA-de ekspressiooni profiili omavahel võrreldud.

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

Seoses NGS-põhiste meetodite kiire arenguga on eelmisel aastakümnel inimese rakkudes detekteeritud sadu uusi mikroRNA-sid. On teada, et atoopilise dermatiidi ja psoriaasi patsientide nahas on tervetest indiviididest erinev miRNA-de profiil, kuid viimastel aastatel ei ole avaldatud töid, kus psoriaasi ja atoopilise dermatiidi naha miRNA ekspressiooni profiile käsitletakse kõrvuti. Sellest lähtuvalt olid antud töö eesmärgid:

- kirjeldada võrdlevalt atoopilise dermatiidi ja psoriaasi patsientide ning kontrollisikute naha miRNA-de ekspressiooni profiilid;
- valideerida vähemalt kolme diferentsiaalselt ekspresseerunud miRNA ekspressioon atoopilise dermatiidi ja psoriaasi patsientide ning kontrollisikute nahas RT-qPCR meetodil;
- uurida, kas valitud miRNA-de ekspressioon muutub põletikulistes nahahaigustes oluliste tsütokiinidega ning allergeene sisaldava tolmulesta lüsaadiga stimuleerimisel keratinotsüütides.

2.2. Materjal ja meetoodika

2.2.1. Uuringusse kaasatud indiviidid

Käesolevas magistritöös kasutati katsetes patsientidelt ja kontrollisikutelt pärinevaid naha biopsiaid. Kõiki katses osalenud isikuid informeeriti eelnevalt katse eesmärkidest ning nad allkirjastasid kirjaliku nõusolekuvormi kinnitamaks uuringus osalemist. Uurimistöö on heaks kiidetud Tartu Ülikooli inimuuringute eetika komitee poolt (protokolli number: 267/T-8, koosolek: 20.02.2017).

Uuringusse värvati 12 AD ja 12 PS patsienti ning 9 kontrollisikut. Täpsemad patsientide andmed on toodud Tabelis 1. Uuringus osalenud isikud diagnoositi, nende sobivust hinnati ning naha biopsiad koguti Tartu Ülikooli Nahahaiguste kliinikus Prof Külli Kingo, Dr Viljar Jaksi ning Dr Kristi Abrami poolt. Kõikidel värvatud PS patsientidel oli diagnoositud krooniline naastuline psoriaas ehk *psoriasis vulgaris*. Kontrollisikud olid isikud, kellel ei esinenud perekonnas AD ega PS. Igalt katses osalenud isikult võeti naha biopsia (3-4 mm diameetriga). AD ja PS patsientidelt võeti biopsia ainult lööbelisest nahast. Nahaproovid külmutati kuival jääl ja hoiti -80°C juures RNA eraldamiseni.

Tabel 1. Uuringusse värvatud indiviidide üldised kliinilised andmed

	Osalejate arv	Sugu naine/mees	Vanus (keskmine ± SEM)	Haiguse raskusaste (IGA*, PASI#)
Kontrollisikud	9	4/5	38 ± 9 min 27; max 51	-
Atoopilise dermatiidi patsiendid	12	7/5	37,5 ± 17 min 19; max 70	IGA 3: 6 patsienti IGA 4: 2 patsienti Pole teada: 4 patsienti
Psoriaasi patsiendid	12	3/9	45,7 ± 13 min 26; max 63	PASI 11,0 ± 5 min 4,7; max 19,4

IGA* (*Investigator's Global Assessment*) skoor (0-5) atoopilise dermatiidi raskuse hindamiseks; PASI# (*Psoriasis Area Severity Index*) skoor (0-72) psoriaasi raskuse hindamiseks.

2.2.2. Inimese primaarsete keratinotsüütide kasvatamine, paljundamine ja stimuleerimine tsütokiinidega

Käesolevas töös kasutati täiskasvanud doonoritelt pärit primaarseid normaalseid inimese epidermaalseid keratinotsüüte (*NHEK – Normal Human Epidermal Keratinocytes*) (PromoCell, Saksamaa). Rakke kasvatati 10 cm läbimõõduga koekultuuri tassidel *Keratinocyte-SFM* söötmes (Gibco, USA) 37°C ja 5% CO₂ juures. Söötmele lisati 500 ml kohta 2,5 µg inimese rekombinantset epidermaalset kasvufaktorit (*rEGF – human recombinant epidermal growth factor*), 25 mg veise hüpofüüsi ekstrakti (*BPE – bovine pituitary extract*), penitsilliini ja streptomütsiini 1:1000 (Lonza, Šveits). Rakkude passeerimiseks kasutati Trüpsiin-EDTA 2x lahust (trüpsiin-EDTA (*Ethylenediaminetetraacetic Acid*): 0,05% trüpsiini ja 0,02% EDTA-d). Trüpsiini inaktiveerimiseks kasutati 1x Trüpsiini neutraliseerivat lahust 2:1 trüpsiini suhtes (Invitrogen, USA). Katsetes kasutatavad rakud olid passaažinumbriga kuus kuni seitse.

24 tundi enne stimuleerimist plaaditi rakud 12 kannuga plaatidele 60-80% konfluentsusega. Rakke stimuleeriti 24 tundi kasutades tsütokiine: IL-4, IL-17A ja IFN-γ. Lisaks kasutati rakkude stimuleerimiseks kodu tolmulesta (*HDM – house dust mite*) ekstrakti nii (*D. Pteronyssinus* XPB70D3A25 Lot #30923) eraldi kui ka lisatuna tsütokiinidele. Stimuleerimiseks kasutatud ainete lõppkontsentratsioonid söötme lahuses on välja toodud tabelis 2. 24 tunni möödudes eemaldati rakkudelt sööde, rakud pesti PBS-iga ja lisati 300 µl QIAzol Lysis reagenti (Qiagen, Saksamaa) ning hoiti -20°C juures kuni RNA eraldamiseni. Stimulatsioonid viidi läbi kolmes korduses.

Tabel 2. Inimese primaarsete keratinotsüütide stimuleerimiseks kasutatud reagensid

Tsütokiinid	Lõppkontsentratsioon lahuses	Tootja	Riik
IL-4	40 ng/ml	Peptrotech	USA
IL-17A	10 ng/ml	Peptrotech	USA
IFN- γ	10 ng/ml	R&D Systems	USA
HDM	50 μ g/ml	Stallergenes Greer	Suurbritannia

2.2.3. RNA eraldus

2.2.3.1. RNA eraldus inimese primaarsetest keratinotsüütidest

Inimese primaarsetest keratinotsüütidest RNA eraldamiseks kasutati Total RNA Zol-Out™ komplekti (A&A Biotechnology, Poola). Rakulüsaat QiaZol Lysis reagentiga koguti 1,5 ml tuubidesse. Seejärel lisati 66 μ l kloroformi (AppliChem, Saksamaa), segati *vortex* meetodil 20 sekundit, inkubeeriti 3 minutit ning tsentrifugeeriti 4°C 12 000 x g juures 15 minutit. Pärast tsentrifugeerimist eraldati vesifaas ning lisati 1 volüüm isopropanooli, segati ning kanti kolonnidele. Edasine RNA eraldus tehti vastavalt tootja protokollile (Total RNA Zol-Out™ komplekt). RNA elueeriti kolonnilt 100 μ l milliQ vees. Saadud RNA kontsentratsioon ja puhtus mõõdeti NanoDrop 2000c spektrofotomeetril (Thermo Scientific, USA).

2.2.3.2. RNA eraldus naha biopsiatest

Naha biopsiatele lisati 900 μ l QIAzol Lysis reagenti ning kude homogeniseeriti kasutades Precellys lüüsiuube ja masinat (Bertin Instruments, Prantsusmaa). RNA eraldamiseks kasutati miRNeasy Mini komplekti (Qiagen, Saksamaa) vastavalt tootja protokollile. Kontsentratsiooni ja RNA puhtuse mõõtmiseks kasutati Nanodrop 2000c spektrofotomeetrit. Kontrollisikute, atoopilise dermatiidi ja psoriaasi patsientide naha biopsiatest RNA eralduse teostas Helen Vaher.

2.2.4. RT-qPCR mRNA tasemete uurimiseks

Esmalt teostati pöördtranskriptaasi reaktsioon, et sünteesida RNA-le vastav komplementaarne DNA (cDNA). Reaktsioonis sisalduv RNA kontsentratsioon jäi keskmiselt vahemikku 15-25 ng/ μ l. Esimese etapina segati proove jääle inkubeerides kokku Oligo(dT) (TAG Copenhagen, Taani) ja nukleotiidide segu (dNTP) (Thermo Scientific, USA), pipeteeriti 96 kannuga plaadile ning lisati RNA. Sekundaarstruktuuride eemaldamiseks kuumutati segu 5 minutit 65°C juures ning asetati proovid uuesti jääle. Seejärel lisati reaktsioonisegusse 5x RT puhver, RevertAid

revertaas (200 ühikut/ μ l) ning RNAasi inhibiitor RiboLock (40 ühikut/ μ l) (Thermo Scientific, USA). Reaktsiooni täpsed kogused on välja toodud tabelis 3. Pöördtranskriptsioon viidi läbi termotsükleris Mastercycler® nexus (Eppendorf, Saksamaa) 1 tund 42°C juures ning reaktsioon peatati kuumutades 10 minutit 75°C juures. Sünteesitud cDNA lahjendati lõppmahuni 400 μ l ning säilitati kasutamiseni -20°C juures.

Tabel 3. Reaktsioonisegu koostis

Komponent	Kogus 1 proovi kohta
RNA proov	11,5 μ l
100 μ M Oligo dT	1 μ l
10 μ M dNTP segu	2 μ l
5x RT puhver	4 μ l
Revertaas (200 U/ μ)	1 μ l
Rnaasi inhibiitor (40 U/ μ l)	0,5 μ l

Teise etapina viidi läbi kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon (qPCR). Ühe reaktsioonisegu lõppmaht oli 12 μ l, mis sisaldas 6 μ l lahjendatud cDNA-d, 2,4 μ l 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR segu (Solis Biodyne, Eesti), 1 μ l 4 μ M F+R (Forward + Reverse) praimereid, mille järjestused on välja toodud tabelis 5, ja 2,6 μ l mQ vett. Proovid pipeteeriti 384 kannuga plaadile ning iga proov mõõdeti kolmes korduses. Reaktsioon viidi läbi ViiA7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA) masinat kasutades, programm on välja toodud tabelis 4. Saadud tulemuste normaliseerimiseks kasutati referentsgeenina EF1A (*Elongation factor 1-alpha*) ning analüüsiti võrdleva Ct väärtuste meetodil.

Tabel 4. mRNA qPCR programm

Etapp	Temperatuur (°C)	Aeg	Korduste arv
Ensüümi aktiveerimine	95	15 minutit	1
Denatureerimine	95	15 sekundit	40
Produkti paljundamine	60	1 minut	
Dissotsiatsioon	95	15 sekundit	1
	60	1 minut	1
	95	15 sekundit	1

Tabel 5. qPCR praimerid

Praimer	Produkti pikkus (nt)		Järjestus
EF1A	94	F	5' CCACCTTTGGGTCGCTTTGCTGT 3'
		R	5' TGCCAGCTCCAGCAGCCTTCTT 3'
IL-1a	119	F	5' GCTGAAGGAGATGCCTGAGATA 3'
		R	5' ACAAGTTTGGATGGGCAACTG 3'
IL-1b	105	F	5' AGAAGTACCTGAGCTCGCCA 3'
		R	5' TGGAAGGAGCACTTCATCTGT 3'
IL-8	147	F	5' GCAGCTCTGTGTGAAGGTGCAGTT 3'
		R	5' TTCTGTGTTGGCGCAGTGTGGTC 3'
CXCL1	75	F	5' TTGCCTCAATCCTGCATCCC 3'
		R	5' GGTCAGTTGGATTTGTCACTGT 3'

2.2.5. RT-qPCR miRNA tasemete uurimiseks

Esimese etapina teostati igale miRNA-le vastava cDNA süntees terminaalise lingu pöördtranskriptsiooni (*Spem-loop RT*) meetodil, kus kasutatakse primereid, mis seonduvad spetsiifiliselt igale miRNA-le 8 nukleotiidi abil nende 3'-poolses alas. Töös kasutati 5x TaqMan® MicroRNA Assay (Life Technologies, USA) primereid miRNA-dele miR-28-5p, miR-31-5p, miR-146a, miR-378a-3p ning let-7a ja RNU48, mida kasutati tulemuste normaliseerimiseks. Esmalt segati kokku segu iga praimeriga jaoks, mille komponendid on toodud tabelis 6. Praimerisegu pipeteeriti 4 µl 96 kannuga plaadile ning lisati 2 µl RNA proovi, mille kontsentratsioon jäi keratinotsüütide proovides vahemikku 30-50 ng ning patsiendi proovides 40 ng. Plaat kaeti kilega, segati *vortex* meetodil ning tsentrifuugiti. Pöördtranskriptsioon viidi läbi Mastercycler® nexus (Eppendorf, Saksamaa) instrumendis 30 minutit 16°C, 30 minutit 42°C juures ning reaktsioon peatati 10 minutit 80°C juures. cDNA säilitati -20°C juures edasise kasutamiseni.

Tabel 6. Reaktsioonisegu koostis

Komponent	Kogus 1 proovi kohta
mQ vesi	2,07 µl
10x RT puhver	0,6 µl
100 mM dNTP segu	0,028 µl
RNAasi inhibiitor (20 ühikut/µ)	0,1 µl
RT ensüüm (50 ühikut/µl)	0,2 µl
5x RT praimer	1 µl
RNA proov	2 µl

Teise etapina teostati kvantitatiivse PCR-i reaktsioon kasutades ViiA7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA) masinat, mille programm on toodud tabelis 7. Esmalt segati kokku reaktsioonisegu, mis sisaldas 4,4 µl 5x HOT FIREPol® Probe qPCR Mix Plus, 11,6 µl mQ vett ning 1 µl 20x TaqMan® MicroRNA Assay (Life Technologies, USA) vastavat praimerit. Seejärel lisati 17 µl reaktsioonisegu igale 96-kannulisel plaadil olevale 6 µl cDNA proovile, segati ning fuugiti põhja. Segu pipeteeriti 10 µl kaupa 384-kannulisele plaadile ning iga proov mõõdeti kahes korduses. Saadud tulemused normaliseeriti, primaarsete keratinotsüütide proovide normaliseerimiseks kasutati referentsgeeni let-7a ning patsientide proovide normaliseerimisel kasutati referentsgeeni RNU48. Tulemused analüüsiti võrdleva Ct väärtuste meetodil.

Tabel 7. miRNA qPCR programm

Etapp	Temperatuur (°C)	Aeg	Korduste arv
Ensüümi aktiveerimine	95	15 minutit	1
Denatureerimine	95	15 sekundit	40
Pikendamine	60	1 minut	

2.2.6. GeneTitan MicroRNA mikrokiip patsientide miRNA-de ekspressiooni profiili uurimiseks

Naha biopsiatest eraldatud RNA lahjendati kontsentratsioonini 50ng/µl ning töösse võeti 400 ng ehk 8 µl. Esimese etapina teostati RNA polüadenüleerimise reaktsioon 37°C juures 15 minutit. Seejärel lisati RNA-le märgis kasutades *FlashTag Biotin HSR* märgise komplekti

(Affymetrix, USA) ning inkubeeriti 30 minutit toatemperatuuril. Etapid teostati vastavalt tootjapoolsele protokollile. Proovidele lisati hübriidsatsiooni kokteil (Affymetrix, USA), inkubeeriti termotsükleris segu 99°C juures 5 minutit ja seejärel 5 minutit 45°C. MikroRNA-de ekspressiooni profiili määramiseks kanti proovid mikrokiibi 4.1 hübriidsatsiooni plaadile (Affymetrix, USA) ning sisestati GeneTitan™ multi-kanal instrumenti (Thermo Fisher Scientific, USA), kus inkubeeriti proove 48°C 60 rpm juures 16-18 tundi. Pärast hübriidiseerimist toimus kiipide värvimine, pesemine ja skanneerimine vastavalt instrumendi protokollile. Mikrokiibi kvaliteedikontroll ja andmete normaliseerimine teostati *Transcriptome Analysis Console* programmis (Applied Biosystems, USA). Tulemused normaliseeriti *Robust Multi-array Average* (RMA) meetodil, mis sisaldas: taustamüra korrektuuri; skaalaühiku standardiseerimist terve mikrokiibi ulatuses; igale sondile vastava intensiivsuse arvutamist, et määrata suhteline ekspressioon logaritmilisel skaalal ning normaliseeritud andmete kokkuvõtvat analüüsi igale miRNA-le vastava signaali intensiivsuse väärtuse arvutamiseks.

2.2.7. Statistiline analüüs

Andmete analüüsimiseks kasutati programme MS Excel ja GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc, USA). Graafikute tegemiseks kasutati programmi GraphPad Prism 6. Tulemuste statistiline analüüs teostati sõltumatute valimite keskväärtuste võrdlemiseks mõeldud T-testi (*Unpaired T-test*) abil. Tulemused loeti statistiliselt olulisteks $P < 0,05$ juures. Joonistel on esitatud katse tulemused koos standardveaga (*standard error of the mean, SEM*). Tähistused joonistel: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$, # $P < 0,05$, ## $P < 0,01$, ### $P < 0,001$ ja ##### $P < 0,0001$.

Mikrokiibi andmete analüüsimiseks kasutati programme *Transcriptome Analysis Console* (Applied Biosystems, USA), MS Excel ning GraphPad Prism 6. MikroRNA-d loeti diferentsiaalselt ekspresseerituks ning kaasati analüüsi, kui olid täidetud järgnevad tingimused:

- $P < 0,05$
- Korrigeeritud P väärtus FDR (*false discovery rate*) ehk valeavastuse määr $< 0,05$
- Ekspressioonitaseme korduse erinevused (FC - *fold change*) > 2 või < -2 .

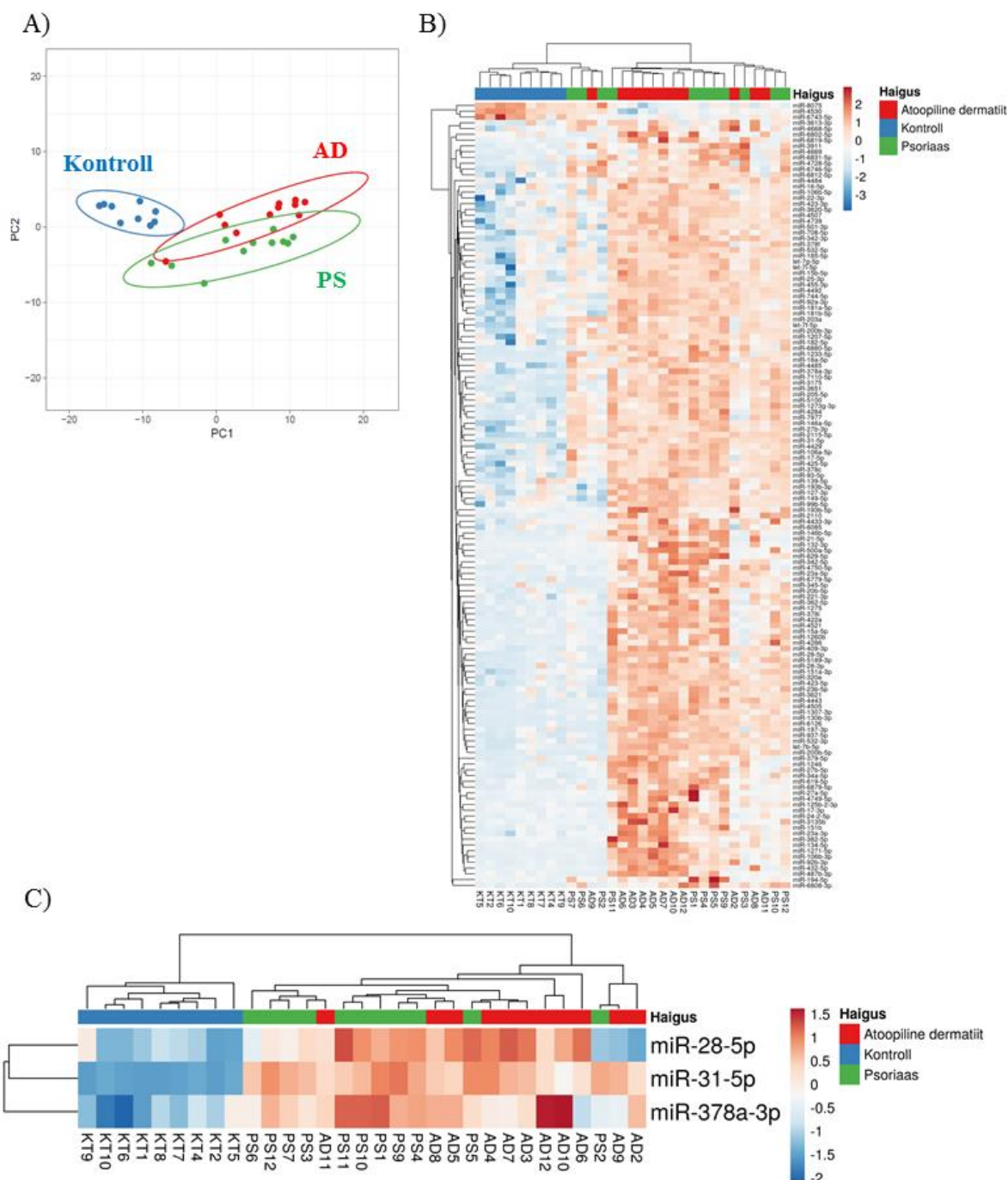
Peakomponentide analüüsi (PCA – *principal component analysis*) ning *heat map*-i tegemiseks kasutati veebiprogrammi ClustVis (Metsalu ja Vilo, 2015). *Heat map*-i hierarhilisel klasterdamisel on kasutatud Manhattani kaugust. Lineaarse regressiooni (*Linear Regression*) analüüs teostati GraphPad Prism 6 programmi kasutades.

2.3 Tulemused

2.3.1. Atoopilise dermatiidi ja psoriaasi patsientide miRNA-de ekspressiooni profiil nahas

Esimeseks uurimistöö eesmärgiks oli kirjeldada võrdlevalt miRNA-de ekspressiooni profiilid AD ja PS patsientide lööbelises nahas ning kontrollisikute nahas. Uuringusse kaasati 9 kontrollisiku, 12 AD ja 12 PS patsiendi naha biopsiate totaalse RNA proovid, millega viidi läbi GeneTitan MicroRNA mikrokiibi analüüs. Mikrokiibi esmase andmete analüüsi viis läbi Dr. Gemma Carreras-Badosa. Edasisisest analüüsist jäeti välja üks AD patsiendi proov remissiooni tõttu ning üks PS patsiendi proov, mis ei läbinud kvaliteedikontrolli.

Joonisel 4A on kujutatud mikrokiibi analüüsi tulemused peakomponentide analüüsi abil, kuhu on kaasatud 11 AD, 11 PS patsienti ja 9 kontrollisikut. Kontrollisikud eristusid selgelt AD ja PS patsientidest (Joonis 4A) ning oli näha suhteliselt ulatuslikku AD ja PS omavahelist kattumist. Edasisel mikrokiibi tulemuste analüüsil leiti 136 miRNA-d, mis on AD ja PS patsientide nahas kontrollisikutega võrreldes diferentsiaalselt ekspresseerunud (P väärtus $< 0,05$, $FDR < 0,05$, $FC > 2$ või < -2). Nende miRNA-de suhtelised ekspressiooni tasemed uuritud proovides on kujutatud *heat map*-il (Joonis 4B) ning keskmise väärtuse numbrilised andmed on toodud tabelis 8 (Lisa 1). Sellest valimist 77 miRNA-d olid diferentsiaalselt ekspresseerunud nii AD kui PS patsientide nahas. Kontrollisikute ja PS patsientidega võrreldes leiti AD patsientide nahast 53 erinevalt ekspresseerunud miRNA-d. PS patsientide nahast leiti kontrollisikute ja AD patsientidega võrreldes neli miRNA-d, mis olid erinevalt ekspresseerunud. Samuti leiti 2 miRNA-d, mis olid erinevalt ekspresseerunud AD ja PS patsiente omavahel võrreldes. Hierarhilise klasteranalüüsi tulemuste alusel klasterdusid kõik kontrollisikud põletikuliste nahahaiguste patsientidest eraldi (Joonis 4B). *Heat map*-il on näha, et enamus analüüsitud miRNA-dest olid AD ja PS patsientide nahas kõrgema ekspressiooniga kui kontrollisikutes (Joonis 4B). Võrreldes kontrollisikutega olid AD ja PS patsientide nahas madalamalt ekspresseerunud vastavalt kolm ja neli miRNA-d. Mikrokiibi analüüsi tulemuste valideerimiseks valiti välja kolm miRNA-d: miR-28-5p, miR-31-5p ja miR-378a-3p. Joonisel 4C on illustreeritud valitud miRNA-de ekspressioon eraldi väiksemal *heat map*-il. Kokkuvõttes näitavad saadud tulemused, et AD ja PS patsientide naha miRNA-de ekspressiooni profiil erineb oluliselt kontrollisikute omast ja suur osa diferentsiaalselt ekspresseerunud miRNA-dest on üles reguleeritud mõlema haiguse patsientide nahas.

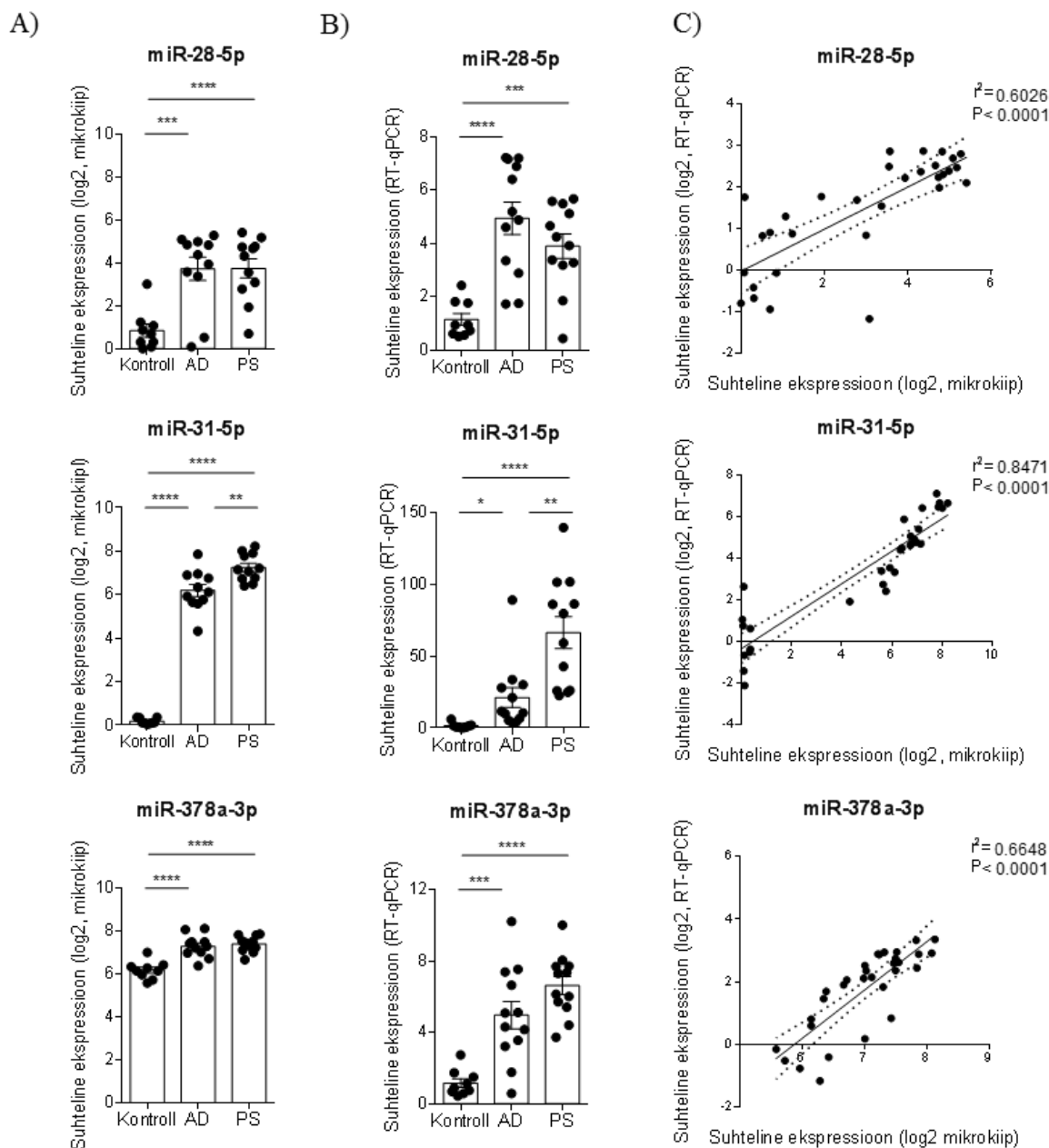


Joonis 4. miRNA-de ekspressiooni profiil on sarnane atoopilise dermatiidi ja psoriaasi patsientide nahas, kuid erineb märkimisväärselt kontrollgrupist. miRNA-de ekspressiooni profiil 11 atoopilise dermatiidi (AD), 11 psoriaasi (PS) patsiendi ning 9 kontrollisiku nahabiopsias. A) Peakomponentide analüüs patsientide ja kontrollisikute grupeerimiseks. Iga täpp tähistab ühte patsienti. B) *Heat map* 136 diferentsiaalselt ekspresseeritud miRNA-ga ($P < 0,05$, korrigeeritud P väärtus $FDR < 0,05$). C) *Heat map* valideerimiseks valitud miRNA-de geeniekspressiooni erinevuste illustreerimiseks. Suhteline geeniekspressioon on keskmistatud üle kogu kiibi ja näidatud \log_2 väärtustena joonisel antud värviskaalale vastavalt. Hierarhilisel klasteranalüüsil kasutati Manhattani kaugust.

2.3.2. miR-28-5p, miR-31-5p ja miR-378a-3p valideerimine RT-qPCR meetodiga

Mikrokiibi tulemuste valideerimisel kasutati samade patsientide RNA proove, millega viidi läbi mikrokiibi analüüs, lisaks kaasati eelnevalt välja jäänud kaks proovi ehk kokku oli analüüsis 9 kontrollisikut, 12 AD ja 12 PS patsiendi proovi. Valitud miRNA-de suhtelise ekspressiooni signaal kontrollisikute ja patsientide nahas mikrokiibi ja RT-qPCR analüüsil on välja toodud Joonisel 5A ja 5B. Kiibi andmete järgi oli miR-28-5p AD ja PS patsientide nahas log₂ skaalal sarnaselt umbes 4,5 korda kõrgemalt ekspresseerunud kui kontrollide nahas. miR-31-5p oli samuti nii AD kui ka PS patsientide nahas oluliselt kõrgema ekspressiooniga kui kontrollisikute nahas, olles seejuures log₂ skaalal vastavalt 32 ja 38 korda kõrgemalt ekspresseerunud. PS patsientides oli miR-31-5p log₂ skaalal ligi 1,2 korda kõrgemalt ekspresseerunud kui AD patsientide nahas ning vahe oli statistiliselt oluline. miR-378a-3p suhteline ekspressioon oli samuti AD ja PS patsientide nahas sarnaselt log₂ skaalal ligikaudu 1,2 korda kõrgema ekspressiooniga kui kontrollisikute nahas (Joonis 5A).

RT-qPCR-i tulemuste järgi oli miR-28-5p suhteline ekspressioon nii AD kui PS patsientide nahas vastavalt ligikaudu 4,5 ja 3,5 korda kõrgem kui kontrollisikute nahas (Joonis 5B). miR-31-5p puhul võis täheldada AD patsientide nahas ligi 13-kordset ning PS patsientide nahas ligi 42-kordset suhtelise ekspressiooni tõusu võrreldes kontrollisikutega. Võrreldes AD-ga oli miR-31-5p suhteline ekspressioon PS patsientide nahas umbes kolm korda kõrgem. miR-378a-3p suhteline ekspressioon oli AD ja PS patsientide nahas vastavalt neli ja kuus korda kõrgem kui kontrollisikutes (Joonis 5B). Järgmisena tehti valitud miRNA-de mikrokiibi ja RT-qPCR-i analüüsi tulemuste põhjal lineaarse regressiooni analüüs, mis näitab statistiliselt olulist positiivset seost ($P < 0,0001$) kahe erineva meetodika tulemuste vahel kõikide analüüsitud miRNA-de puhul (Joonis 5C). Kokkuvõttes näitavad nii miRNA kiibi kui ka valideerimiskatsed, et analüüsitud miRNA-d olid nii AD kui PS patsientide nahas oluliselt kõrgemalt ekspresseerunud. Lisaks tuvastati PS patsientide nahas umbes kolm korda kõrgem miR-31-5p ekspressioon kui AD patsientide nahas.

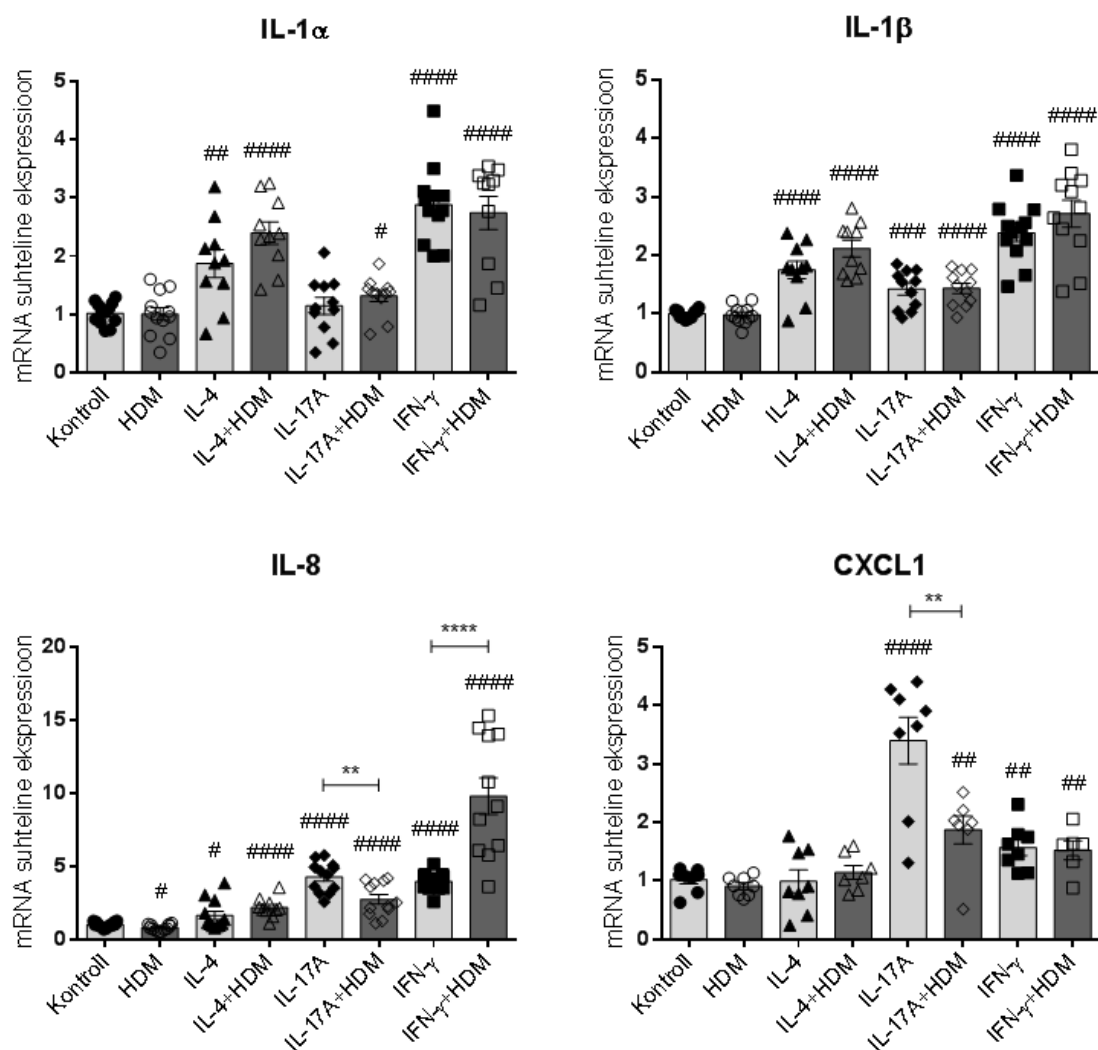


Joonis 5. miR-28-5p, miR-31-5p ja miR-378a-3p valideerimine RT-qPCR meetodiga. (A,B) miR-28-p, miR-31-5p ja miR-378a-3p suhteline ekspressioon atoopilise dermatiidi (AD) ja psoriaasi (PS) patsientide ning kontrollisikute nahas mikrokiibi analüüsil log₂ skaalas (A) ja qPCR meetodiga ning on näidatud lineaarsel skaalal (B). Tulemused on normaliseeritud koduhoidja RNU48 ekspressiooni tasemete ja kontrollväärtuste keskmise suhtes (=1). Veapiirid näitavad standardviga (SEM) ning statistiliseks analüüsis kasutati T-testi (*Unpaired T-test*). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$ (A,B). C) Mikrokiibi ja RT-qPCR tulemuste lineaarse regressiooni analüüs, sisendiks kasutati mõlema meetodi puhul suhteliste ekspressioonide log₂ väärtusi.

2.3.3. Proinflammatoorsete tsütokiinide ekspressioon stimuleeritud keratinotsüütides

Järgmisena sooviti välja selgitada, kas põletikulistes nahahaigustes olulist rolli omavate tsütokiinide IL-4, IL-17A ja IFN- γ ja AD puhul teadaoleva tugevaid allergeene sisaldava tolmulesta lüsaadiga (edaspidi HDM) (Banerjee *et al.*, 2015) stimuleerimine avaldab keratinotsüütides toimet AD-s ja PS-s diferentsiaalselt ekspresseerunud ja valideeritud miRNA-de ekspressioonile. Selleks stimuleeriti keratinotsüüte HDM-i, IL-4, IL-17A ning IFN- γ -ga eraldi ja näidatud tsütokiine kombinatsioonis HDM-iga 24 tundi, seejärel eraldati koguraku RNA. Kõige pealt analüüsiti katsesüsteemi kontrollimiseks põletikuliste tsütokiinide mRNA taset RT-qPCR-iga. Analüüsi valiti tsütokiinid IL-1 α ja IL-1 β ning kemokiinid IL-8 ja CXCL1, sest varasemalt oli keratinotsüütides erinevate stimuleerivate faktorite mõjul näidatud antud tsütokiinide ja kemokiinide ekspressiooni muutust (Teunissen *et al.*, 1998; Nograles *et al.*, 2008; Chiricozzi *et al.*, 2014; Hermann *et al.*, 2017).

Katse tulemustest on näha, et HDM üksinda ei olnud võimeline IL-1 α , IL-1 β , IL-8 ja CXCL1 ekspressiooni stimuleerima, kusjuures IL-8 suhteline ekspressioon vähenes kontrolliga võrreldes (Joonis 6). Rakkude stimuleerimisel IL-4 ja IL-4+HDM kombinatsiooniga oli näha IL-1 α , IL-1 β ja IL-8 sarnast suhtelise ekspressiooni tõusu umbes kuni kaks korda. IL-17A stimuleerimise toimet tõusis keratinotsüütides IL-1 β , IL-8 ja CXCL1 suhteline ekspressioon ning IL-1 α ekspressioonile efekt puudus. Suurimat efekti nähti IL-8 ja CXCL1 puhul, mille ekspressioon oli võrreldes kontrolliga vastavalt neli ja kolm korda tõusnud IL-17A stimuleerimisel. IL-17A ja HDM koostoimel oli näha kõikide proinflammatoorsete tsütokiinide kõrgemat ekspressiooni võrreldes kontrolliga. Lisaks oli näha, et HDM-i lisamine vähendas IL-17A efekti IL-8 ja CXCL1 suhtelisele ekspressioonile, mis langes vastavalt ligikaudu 1,5 ja kaks korda. IFN- γ toimet suurenes oluliselt kõikide uuritud proinflammatoorsete tsütokiinide suhteline ekspressioon, seejuures suurim efekt tuvastati IL-8 puhul, mille suhteline ekspressioon tõusis ligi neli korda. IFN- γ +HDM-iga stimuleerimine tõstis samuti kõikide proinflammatoorsete tsütokiinide suhtelise ekspressiooni taset võrreldes kontrolliga. Seejuures HDM-i lisamisel mõõdeti suurim efekt IL-8 suhtelise ekspressiooni korral, mis oli 2,5 korda kõrgem kui ainult IFN- γ -ga stimuleerides. Rakkude stimuleerimisel oli näha proinflammatoorsete tsütokiinide ja kemokiinide suhtelise ekspressiooni tõusu. HDM-i lisamine vähendas IL-17A efekti IL-8 ja CXCL1 geenide ekspressioonile ning võimendas IFN- γ toimet IL-8 suhtelisele ekspressioonile.

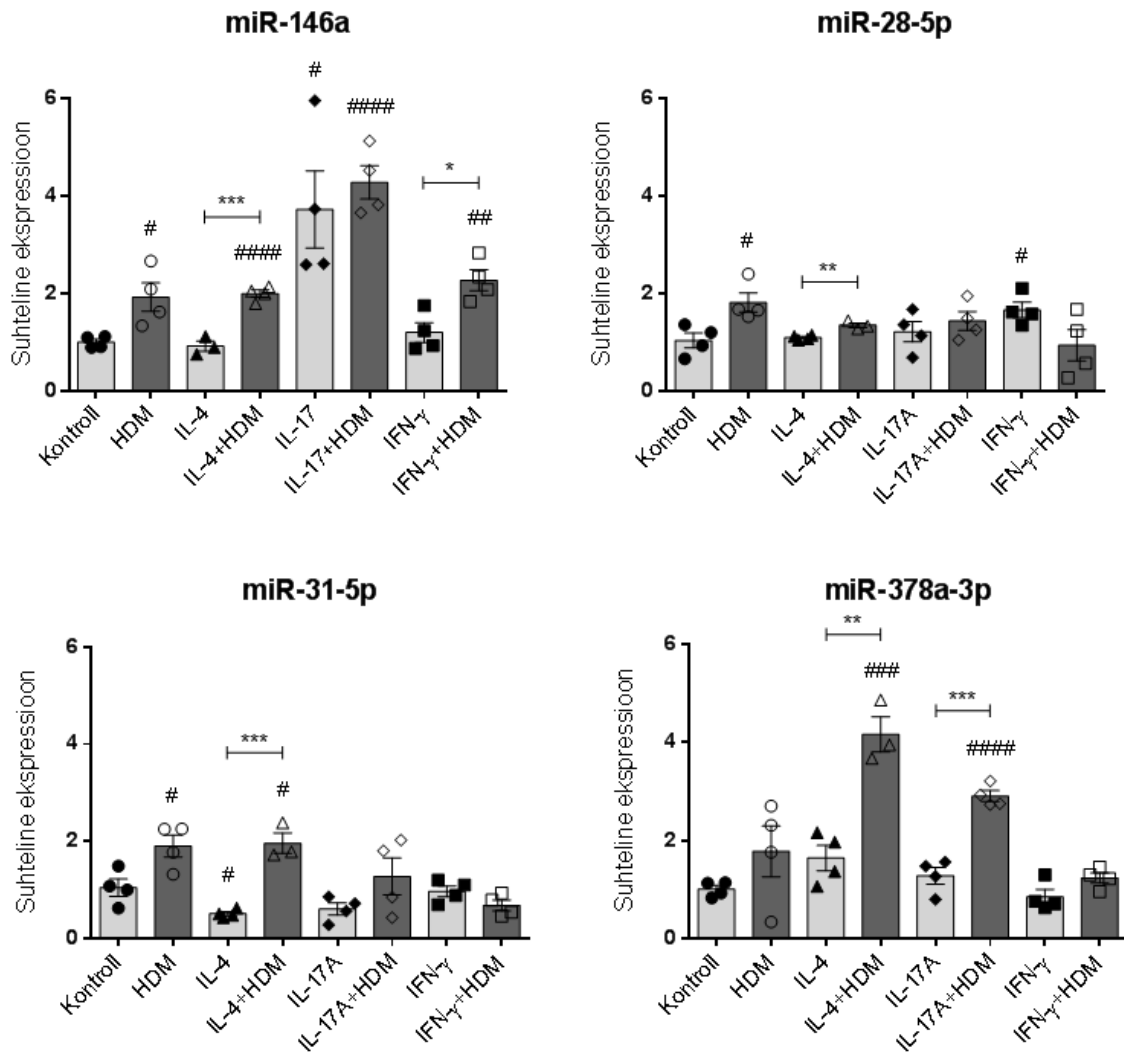


Joonis 6. Tsütokiinide ja kemokiinide suhteline ekspressioon keratinotsüütides põletikulistes nahahaigustes seotud faktoritega stimuleerimisel. Keratinotsüüte stimuleeriti 24 tundi joonisel näidatud tsütokiinide ja tolmulesta ekstraktiga (HDM) ning nende kombinatsioonidega. Näidatud geenide mRNA suhteline ekspressioon tuvastati RT-qPCR meetodiga. Tulemused on normaliseeritud koduhoidja EF1A mRNA ja mittestimuleeritud rakkude (Kontroll) ekspressiooni tasemete suhtes (=1). Graafikutel on esitatud kolme stimulatsiooni keskmised väärtused ja veapiiridena SEM. Tulemuste statistilise olulisuse leidmiseks kasutati T-testi (*Unpaired T-test*). # $P < 0,05$, ## $P < 0,01$, ### $P < 0,001$, #### $P < 0,0001$ vs Kontroll. ** $P < 0,01$ ja **** $P < 0,0001$ näitavad muutusi üksikute topektstimulatsioonide vahel.

2.3.4. miR-146a ja valideeritud miRNA-de ekspressioon stimuleeritud keratinotsüütides

Järgnevalt uuriti, kas valideeritud miRNA-de ekspressioon muutub katsesüsteemis, mis optimeeriti peatükis 2.3.3. Lisaks mõõdeti ka miR-146a ekspressiooni, mille ekspressiooni muutust on varasemalt näidatud erinevate tsütokiinidega stimuleeritud keratinotsüütides (Hermann *et al.*, 2017). Joonisel 7 on näha, et HDM-i lisamisel suurenes miR-146a, miR-28-5p ja miR-31-5p suhteline ekspressioon ligikaudu kaks korda. Stimuleerimine tsütokiiniga

IL-4 ei suurendanud ühegi vaadeldud miRNA taset, kuid vähendas miR-31-5p suhtelist ekspressiooni umbes kaks korda. IL-4+HDM toimet suurenes kõigi nelja miRNA suhteline ekspressioon võrreldes IL-4-ga stimuleeritud rakkudega. Suurimat efekti oli näha miR-31-5p ja miR-378a-3p suhtelisele ekspressioonile, mille tase oli HDM-i lisamise korral vastavalt ligikaudu neli ja 2,5 korda kõrgem kui ainult IL-4-ga stimuleeritud rakkudes. IL-17A toimet suurenes oluliselt ainult miR-146a suhteline ekspressioon ning seda ligikaudu neli korda kontrolliga võrreldes. HDM-i lisamine IL-17A toimet miR-146a puhul ei mõjutanud ning võrreldes kontrolliga oli miR-146a suhteline ekspressioon samuti neli korda tõusnud. miR-378a-3p suhteline ekspressioon oli IL-17A+HDM toimet kontrolliga võrreldes kolm korda kõrgem. HDM-i lisamine suurendas IL-17A toimet miR-378a-3p ekspressioonile, mis oli 2,5 korda kõrgem kui ainult IL-17A-ga stimuleerides. IFN- γ eraldi stimuleeris ainult miR-28-5p suhtelise ekspressiooni suurenemist. IFN- γ +HDM koostoimel suurenes miR-146a suhteline ekspressioon nii kontrolli kui ka IFN- γ toimega võrreldes kaks korda. Antud tulemustest võib järeldada, et kõikide uuritud miRNA-de avaldumine keratinotsüütides on mõjutatud katsesse võetud proinflammatoorsete tsütokiinide toimet. AD seisukohalt on eriti huvipakkuv miR-378a-3p kõrgem ekspressioon IL-4+HDM ja IL-17A+HDM toimet võrreldes ainult IL-4 ja IL-17A-ga stimuleeritud rakkudes.



Joonis 7. miR-146a ja valideeritud miRNA-de suhteline ekspressioon keratinotsüütides muutub põletikulistes nahahaigustes oluliste tsütokiinide ja allergeeniga (HDM) stimuleerimisel. Keratinotsüüte stimuleeriti 24 tundi joonisel näidatud tsütokiinide ja tolmulesta ekstraktiga (HDM) üksi ning näidatud kombinatsioonidega. miRNA suhteline ekspressioon tuvastati RT-qPCR meetodiga. Tulemused on normaliseeritud koduhoidja let-7a väärtuste ja mittestimuleeritud rakkude (Kontroll) ekspressiooni tasemete suhtes (=1). Graafikutel on esitatud veapiiridena SEM. Tulemuste analüüsimiseks kasutati T-testi (*Unpaired T-test*). N=3-4, # P < 0,05, ## P < 0,01, ### P < 0,001, #### P < 0,0001 vs Kontroll. * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001 näitavad muutusi üksikute ja topeltstimulatsioonide vahel.

2.4 Arutelu

Atoopiline dermatiit (AD) ja psoriaas (PS) on põletikulised nahahaigused. Olgugi, et tegemist on kliiniliselt erinevate haigustega, on nende molekulaarsetes mehhanismides näidatud ka mitmeid sarnasusi, näiteks Th1, Th17 ja Th22 osalust molekulaarses patogeneesis, millele iseloomulikud tsütokiinid mõjutavad keratinotsüütide diferentseerumist ja soodustavad erinevate proinflammatoorsete mediaatorite tootmist. Peamise molekulaarse erinevusena nende kahe haiguse vahel tuuakse enamasti välja Th2 tüüpi immuunvastuse olulist mõju AD-s (Guttman-Yassky ja Krueger, 2017). Lisaks valke kodeerivatele geenidele mõjutavad mõlema haiguse teket ka reguleerivad RNA-d, millest enim on uuritud miRNA-sid. Varasemate mikrokiibi analüüside korral on tuvastatud nii sarnasusi kui ka erinevusi mõlema haiguse puhul naha miRNA-de ekspressiooni profiilis. Seejuures on näidatud, et AD ja PS patsientide lööbelises nahas esinev miRNA-de ekspressiooni profiil erineb väga oluliselt tervete kontrollisikute nahast (Sonkoly *et al.*, 2007). MikroRNA-de profiili on kirjeldatud varem korduvalt PS-i puhul eraldi erinevatel mikrokiibi platvormidel ja NGS-iga (Zibert *et al.*, 2010; Joyce *et al.*, 2011; Løvendorf *et al.*, 2015; Srivastava *et al.*, 2019). Need tööd on näidanud, et enamik kontrollisikutest erinevalt ekspresseerunud miRNA-dest on PS patsientide nahas ülesreguleeritud. AD-s on miRNA-de ekspressiooni profiili vähem uuritud kui PS-s, kuid Sonkoly *et al.* näitasid 2010. aastal, et võrreldes kontrollisikutega olid enamik mikrokiibil vaadatud miRNA-dest AD patsientide lööbelises allareguleeritud (Sonkoly *et al.*, 2010). Käesoleva töö eesmärgiks oli analüüsida miRNA-de ekspressiooni profiili AD ja PS patsientide nahas võrdlevalt ning leida uusi potentsiaalselt olulisi miRNA-sid, mida tulevikus haiguste kontekstis edasi uurida.

Töös kinnitati, et AD ja PS patsientide nahas leiduv miRNA-de profiil on kontrollisikutest selgelt eristatav ning leiti, et diferentsiaalselt ekspresseerunud miRNA-d on mõlemas uuritud põletikulises nahahaigustes enamasti ülesreguleeritud. Sonkoly *et al.* näitasid 2007. aastal samuti põletikuliste nahahaiguste patsientide naha miRNA-de profiili eristumist kontrollisikutest ning sarnasust mõlema haiguse vahel (Sonkoly *et al.*, 2007). Inimese rakkudest avastatud uute miRNA-de arv on alates 2007. aastast kasvanud mitmekordseks, kuid selles osas ühtivad meie töö tulemused eelnevate tulemustega.

Lisaks näidati Sonkoly *et al.* uuringus, et PS-s oli rohkem erinevalt ekspresseerunud miRNA-sid kui AD-s, seejuures leiti PS ja AD patsientide nahas vastavalt 29 ja 21 kontrollidest erinevalt ekspresseerunud miRNA-d. On huvitav, et meie töö tulemuste põhjal on see vastupidi: võrreldes kontrollisikutega oli AD patsientide nahas rohkem diferentsiaalselt ekspresseerunud

miRNA-sid kui PS patsientide nahas. Analüüsides selgus, et ainult AD patsientide nahas diferentsiaalselt ekspresseerunud miRNA-sid oli 53, samas kui ainult PS patsientides erinevalt ekspresseerunud miRNA-sid oli vaid neli. AD-s diferentsiaalselt ekspresseerunud miRNA-sid oli lausa 13 korda rohkem kui miRNA-sid, mis olid erinevalt ekspresseerunud ainult PS patsientide nahas.

Sonkoly *et al.* on 2010. aastal uurinud ka miRNA-sid AD-s ning tuvastasid mikrokiibil 44 kontrollisikutest erinevat miRNA-d, millest 34 olid AD patsientide nahas allareguleeritud. Välja toodud tulemused on erinevad käesolevas töös näidatud tulemustest, sest meie töös leiti AD-s rohkem üles- kui allareguleeritud miRNA-sid. Käesolevas töös leiti AD-s ülereguleeritud miRNA-sid 129, samas allareguleeritud olid vaid kolm. Kuna AD on väga heterogeenne haigus, siis sellised erinevused võivad tulla näiteks haiguse raskusastme või endotüüpide erinevustest, mis tõttu on eriti oluline arvesse võtta patsientide kliinilist tausta. Kuna indiviidid on erinevad, on valimi suurus samuti oluline. Meie töös analüüsiti mikrokiibil 11 patsienti, kuid Sonkoly *et al.* uuringus tehti mikrokiibi analüüs vaid kolme patsiendi proovidega (Sonkoly *et al.*, 2010).

Meie töö järgmises osas valideeriti kolme miRNA, miR-28-5p, miR-31-5p ja miR-378a-3p suhteline ekspressioon RT-qPCR meetodil ning näidati kahe erineva meetodika tulemuste vahel tugevat seost ja positiivset korrelatsiooni. Kõik kolm miRNA-d olid AD ja PS patsientide nahas oluliselt kõrgemalt avaldunud kui kontrollisikute nahas ning ekspressioonimuster ühtis mikrokiibi andmetega. Sealjuures oli näiteks miR-31-5p PS patsientide nahas oluliselt rohkem ekspresseerunud kui AD patsientide nahas ning seda kinnitati mõlema meetodikaga. Hübridisatsioonil põhinevate tehnoloogiate ehk mikrokiipide puhul on näidatud väiksemat tundlikkust miRNA-de suhtes, kuigi RNA kogus ei tohiks olla limiteeriv faktor. RT-qPCR meetodit peetakse tundlikumaks ja täpsemaks meetodikaks, mille tulemuseks on usaldusväärsemad kvantitatiivsed mõõtmised, isegi kui sisendiks on väiksem kogus RNA-d (Mestdagh *et al.*, 2014). Seetõttu on usaldusväärsete tulemuste saamiseks soovitatav ühe meetodika tulemused teise meetodikaga valideerida, mida antud töös ka tehti.

Antud töös valideeritud miRNA-de ekspressiooni erinevust nii mikrokiibil kui ka sekveneerimisel põhinevate meetodikatega on varasemalt näidatud PS patsientide lööbelises nahas miR-31-5p ja miR-378a-3p puhul (Zibert *et al.*, 2010; Joyce *et al.*, 2011; Løvendorf *et al.*, 2015; Srivastava *et al.*, 2019). Samuti on miR-31-5p kõrgemat ekspressiooni näidatud mikrokiibi uuringuga AD patsientide nahas Sonkoly *et al.* poolt 2010. aastal (Sonkoly *et al.*, 2010). PS-s on miR-31-5p tehtud funktsionaalseid uuringuid, kuid AD kontekstis ei ole miR-

31-5p meile teadaolevalt rohkem uuritud. miR-28-5p diferentsiaalset ekspressiooni ja funktsiooni ning miR-378a-3p funktsiooni ei ole AD ega PS kontekstis varem kirjeldatud.

Edasi viidi antud töös läbi katsed, et kindlaks teha, kas valideeritud miRNA-d on ekspresseerunud inimese primaarsetes keratinotsüütides. Varasemalt oli teada, et miR-31-5p on PS-i patsientide keratinotsüütides üleekspressioneeritud (Xu *et al.*, 2013). Lisaks on näidatud miR-378a-3p kõrgeks ekspresseeritud lasermikrodisseksiooniga eraldatud PS patsientide lööbelises epiderimises (Løvendorf *et al.*, 2015). Kuna AD-s ja PS-s on keratinotsüüdid põletikulises olukorras, siis stimuleeriti inimese primaarseid keratinotsüüte haigustes teadaolevate oluliste tsütokiinide ja allergeene sisaldava HDM ekstraktiga. Stimuleerimise õnnestumise kontrollimiseks mõõdeti esmalt proinflammatoorsete tsütokiinide ekspressiooni ning nendest katsetest oli näha, et kõikide tsütokiinidega stimuleerimine töötas. Lisaks oli näha, et HDM-i lisamine mõjutas IL-17A efekti, millisel juhul oli näha IL-8 ja CXCL1 suhtelise ekspressiooni vähenemist. On huvitav, et samades tingimustes oli miR-146a suhteline ekspressioon kõrgeim just IL-17A ning IL-17A+HDM stimulatsioonil. Varem on näidatud IL-17A-ga stimuleeritud keratinotsüütides IL-8 suhtelise ekspressiooni indutseerimist varajastes ajapunktides (6, 12 ja 24 tundi) ning miR-146a ekspressiooni tõusu hilisemates ajapunktides (24, 48 ja 72 tundi) (Hermann *et al.*, 2017), CXCL1 suhtelise ekspressiooni vähenemist miR-146a üleekspressiooni korral IL-17A stimuleeritud inimese bronhiaalse epiteeli rakkudes (Kivihall *et al.*, 2019). Kuna antud töös stimuleeriti keratinotsüüte 24 tundi, siis varasemalt näidatud tulemusi arvestades võib oletada, et IL-8 ja CXCL1 suhtelise ekspressiooni langus on vähemalt osaliselt põhjustatud miR-146a ekspressiooni tõusust selles ajapunktis. Selle väite kinnituseks oleks vaja teha siiski lisakatseid.

On huvitav, et meie katsetes avaldab HDM toimet proinflammatoorsete tsütokiinide ekspressioonile vaid tsütokiinide juuresolekul, kuid HDM-i mõju miRNA-de ekspressioonile oli näha ka ainult HDM-iga stimuleerimise korral. Varem on HDM-i otsest toimet keratinotsüütidele vähe uuritud ning enamasti on peetud HDM-i allergeenide toime vahendajateks nahas dendriittrakke või Langerhansi rakke (Deckers *et al.*, 2017). Siiski ei ole meie töö puhul võimalik eristada, kas HDM-i puhul toimivad keratinotsüütidele lüsaadis leiduvad allergeenid või endotoksiinid. Varem on Meisgen jt töös tuvastatud, et miR-146a on keratinotsüütides TLR2 indutseeritud põletikuliste vastuste negatiivne regulaator, kusjuures HDM-i ekstraktis on näidatud TLR2 agonistide sisaldumist (Liu *et al.*, 2013; Meisgen *et al.*, 2014). On võimalik, et AD puhul on roll lööbe tekkimisel nii allergeenidel kui ka endotoksiinidel ning see vajaks kindlasti edasi uurimist.

Valideeritud miRNA-dest tuvastati tsütokiinide ja HDM-iga stimuleerimisel kõige väiksemat mõju miR-28-5p ekspressioonile. Varasemalt ei ole seda miRNA-d põletikuliste nahahaiguste kontekstis uuritud, kuid selle kõrgeenenud ekspressioon on tuvastatud aksiaalse spondüloartriidi patsientide CD4⁺ T-rakkudes. Lisaks on näidatud, et miR-28-5p võib omada rolli JAK/STAT signaaliraja reguleerimisel ning üheks tema valideeritud märklaudgeeniks on *MAPK1* (*Mitogen Activated Protein Kinase 1*) (Fogel *et al.*, 2019). See näitab, et miR-28-5p omab siiski võimalikku rolli põletikulistes protsessides ning selle funktsioone tasuks tulevikus põhjalikumalt uurida.

miR-31-5p puhul on varasemalt näidatud üleekspressiooni PS patsientide keratinotsüütides, mille tõttu eeldasime ka ekspressioonitõusu tsütokiinidega stimuleeritud keratinotsüütides. On huvitav, et PS-le iseloomulikud IL-17A ega IFN- γ ei olnud võimelised miR-31-5p ekspressiooni stimuleerima kasutatud ajapunktis. PS-s on patogeneesis oluline roll ka paljudel teistel tsütokiinidel ning koekultuuris on näidatud, et miR-31-5p ekspressioon on keratinotsüütides stimuleeritav TGF- β , kuid mitte IFN- γ toimel (Xu *et al.*, 2013), mis on kooskõlas käesolevas töös nähtud tulemustega. Veel on huvitav, et miR-31-5p puhul näidati olulist ekspressiooni langust IL-4-ga stimuleerides, kuid HDM-i lisamisel tema ekspressioon tõusis nii IL-4 stimuleeritud rakkude kui ka stimuleerimata rakkude puhul. IL-4 ja HDM on iseloomulikud AD-le, mis annab alust oletada, et miR-31-5p võib olla ka AD kontekstis oluline ning selleks tasuks teha funktsionaalseid uuringuid.

miR-378a-3p puhul nähti suurimat efekti ekspressioonile IL-4+HDM stimulatsiooni korral. miR-378a-3p funktsioone on näidatud angiogeneesis ning arvatakse, et see soodustab vaskulaarse endoteeli kasvufaktori (VEGF – *vascular endothelial growth factor*) ekspressiooni ning reguleerib see ka angiopoietiin-1 ja IL-8 ekspressiooni (Krist *et al.*, 2015). PS-le on iseloomulik angiogenees ning lööbelises nahas on näidatud VEGF-i ülesreguleeritud ekspressiooni. Angiogeneesi tõttu on PS iseloomulikud laigud punakad (Heidenreich *et al.*, 2009; Joyce *et al.*, 2011). Bao jt uurisid miRNA-de ekspressiooni IL-4 stimuleeritud keratinotsüütides ning miR-378a-3p oli samuti ülesreguleeritud (Bao *et al.*, 2018). Angiogeneesi on AD-ga seoses vähe uuritud, kuid võib oletada, et see on AD-s samuti suurenenud. Võib spekuloida, et miR-378a-3p omab funktsiooni AD angiogeneesis.

Normaalsest erinevat miRNA-de ekspressioonimustrit on näidatud paljudele haiguste korral (Christopher *et al.*, 2016). AD ja PS on mõlemad multifaktoriaalsed ja oluliselt inimese elukvaliteeti mõjutavad haigused. Meie uuringust selgus, et AD ja PS patsientide nahas on näha rohkem kui saja erineva miRNA kõrgeenenud ekspressiooni. Mõnede miRNA-de puhul on

haigustes põhjuslikke seoseid ja funktsioone uuritud, kuid AD-s ja PS-s ei ole paljude miRNA-de funktsioonid siiski veel selged. Teades haigusele iseloomulike miRNA-de ekspressiooni ja sihtmärke, võib tulevikus tekkida võimalus uuteks suundadeks nende haiguste teraapias, sest miRNA-de ekspressiooni on võimalik nii inhibeerida kui ka üleekspressioneerida (Li ja Rana, 2014).

KOKKUVÕTE

Atoopiline dermatiit ja psoriaas on kroonilised põletikulised nahahaigused, mille patogeneesis on olulised erinevad abistaja T-rakud ja nende poolt toodetud tsütokiinid, mis mõjutavad keratinotsüütide diferentseerumist ja põletikuliste mediaatorite tootmist. MikroRNA-d on lühikesed mittekodeerivad RNA-d, mis reguleerivad geenide ekspressiooni transkriptsioonijärgselt ja seetõttu võivad mõjutada ka atoopilise dermatiidi ja psoriaasi teket ja kulgu.

Käesolevas töös analüüsiti atoopilise dermatiidi ja psoriaasi patsientide nahas avaldunud miRNA-de ekspressiooni profiili. Mikrokiibi analüüsil leiti, et põletikuliste nahahaiguste patsientide nahas avaldunud miRNA-de ekspressiooni profiil on kontrollisikutest selgelt eristatav ning suur osa diferentsiaalselt ekspresseerunud miRNA-dest on mõlema haiguse patsientide nahas ülesreguleeritud. Seejuures leiti atoopilise dermatiidi patsientide nahast rohkem erinevalt ekspresseerunud miRNA-sid kui psoriaasis.

Järgmisena valideeriti töös mikrokiibi tulemused kolme miRNA puhul RT-qPCR meetodiga. Leiti, et miR-28-5p, miR-31-5p ja miR-378a-3p on atoopilise dermatiidi ja psoriaasi patsientide nahas kõrgemalt ekspresseerunud kui kontrollisikute nahas. Seejuures tuvastati psoriaasi patsientide nahas ligikaudu kolm korda kõrgem miR-31-5p ekspressioon kui atoopilise dermatiidi patsientide nahas. Kahe erineva meetodika tulemuste vahel tuvastati lineaarse regressiooni analüüsil oluline positiivne seos kõigi kolme miRNA puhul.

Järgnevalt uuriti valitud miRNA-de ja miR146a ekspressiooni inimese primaarsetes keratinotsüütides, mida stimuleeriti allergeene sisaldava kodu tolmulesta ekstrakti ja põletikulistes nahahaigustes oluliste tsütokiinidega. Stimuleerimise positiivseks kontrolliks mõõdeti ka proinflammatoorsete tsütokiinide ekspressiooni. Tuvastati, et HDM vähendab IL-17A toimet IL-8 ja CXCL-1 ekspressioonile, mis võib osaliselt olla põhjustatud miR-146a ekspressiooni tõusust vaadatud ajapunktis. Valideeritud miRNA-de ekspressiooni analüüsist stimuleeritud keratinotsüütides selgus, et nende avaldumine on mõjutatud katses kasutatud proinflammatoorsete tsütokiinide ning tsütokiinide ja HDM- koostoimel. Atoopilise dermatiidi seisukohalt osutus huvipakkuvaks miR-378a-3p, mille kõrgeimat ekspressiooni nähti IL-4+HDM kombinatsiooniga stimuleeritud keratinotsüütides.

Kokkuvõttes näitavad käesoleva töö tulemused, et miRNA-de ekspressiooni profiil on põletikulistes nahahaigustes kontrollidest selgelt erinev. Võib oletada, et mitmetel erinevalt ekspresseerunud miRNA-del on nii atoopilise dermatiidi kui ka psoriaasi patogeneesis oluline roll, kuid selle välja selgitamiseks oleks vaja teha rohkem funktsionaalseid uuringuid.

Comparative analysis of the skin microRNA expression profiles in atopic dermatitis and psoriasis

Laura Pajusaar

SUMMARY

Atopic dermatitis and psoriasis are chronic inflammatory skin diseases with different clinical features, however, similarities have been found in their molecular mechanisms. Both these diseases are mediated by T-cell, present altered proinflammatory cytokine expression and variable barrier alterations in the skin. MicroRNAs are short non-coding RNAs that regulate gene expression at the post-transcriptional level. It has been shown that atopic dermatitis and psoriasis patients have altered miRNA expression profile in the skin, which is different from healthy controls. However, these studies do not include hundreds of miRNAs discovered during recent years. The aim of this study was to analyze the miRNA expression profile comparatively in atopic dermatitis, psoriasis and healthy controls.

Firstly, our results confirmed the previous findings that the miRNA expression profile in the atopic dermatitis and psoriasis patients skin differs from the profile seen in healthy controls. We showed that a large proportion of the differentially expressed miRNA-s are upregulated in both diseases. Secondly, we validated the increased expression of miR-28-5p, miR-31-5p and miR-378a-3p in atopic dermatitis and psoriasis patients' skin as compared to the control samples by RT-qPCR. A significant positive correlation between the microarray and RT-qPCR results was observed.

Finally we studied the expression of validated miRNAs in keratinocytes. Since the keratinocytes in atopic dermatitis and psoriasis are in inflammatory conditions, we stimulated the cells with house dust mite (HDM) extract containing allergens and cytokines characteristic to atopic dermatitis and psoriasis. We also measured miR-146a expression that has been studied in both diseases earlier. All studied miRNAs, miR-28-5p, miR-31-5p, miR-378a-3p and miR-146a were induced at least one of the used proinflammatory cytokine used. As the expression of miR-378a-3p was highest in the keratinocytes that were stimulated with IL-4+HDM combination, we suggest that the function of miR-378a-3p would be interesting to study in the context of atopic dermatitis.

TÄNUSÕNAD

Eelkõige soovin tänada oma juhendajaid Ana Rebast ja Julia Maslovskajat, kes nõustasid ja suunasid mind katsete läbiviimisel ja töö koostamisel. Eriliselt soovin veel välja tuua Dr. Gemma Carreras-Badosa, kes aitas mind mikrokiibi analüüsi teostamisel, toetas ning nõustas mind alati kui mul tekkis küsimusi. Samuti tänan ka kõiki teisi RNA bioloogia uurimisgrupi liikmeid, kes on mind kahe aasta jooksul õpetanud ja nõustanud. Lisaks soovin tänada Tartu Ülikooli Nahahaiguste kliiniku töötajaid, kes kogusid atoopilise dermatiidi ja psoriaasi patsientide ning tervete kontrollisikute nahaproovid ning Helen Vaherit, kes eraldas RNA antud proovidest.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Apfelbacher, C.J., Diepgen, T.L. ja Schmitt, J. (2011) Determinants of eczema: Population-based cross-sectional study in Germany. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 66, 206–213.
- Arnone, M., Takahashi, M.D.F., de Carvalho, A.V.E., ... Jaime, T.J. (2019) Diagnostic and therapeutic guidelines for plaque psoriasis – Brazilian society of dermatology. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 94, 76–107.
- B. Brandt, E. (2011) Th2 Cytokines and Atopic Dermatitis. *Journal of Clinical & Cellular Immunology*, 02.
- Bagel, J., Nia, J., Hashim, P.W., ... Lebwohl, M. (2018) Secukinumab is Superior to Ustekinumab in Clearing Skin in Patients with Moderate to Severe Plaque Psoriasis (16-Week CLARITY Results). *Dermatology and Therapy*, 8, 571–579.
- Baghoomian, W., Na, C.H. ja Simpson, E.L. (2020) New and Emerging Biologics for Atopic Dermatitis. *American Journal of Clinical Dermatology*, 1–9.
- Baker, B.S., Ovigne, J.M., Powles, A. V., Corcoran, S. ja Fry, L. (2003) Normal keratinocytes express Toll-like receptors (TLRs) 1, 2 and 5: Modulation of TLR expression in chronic plaque psoriasis. *British Journal of Dermatology*, 148, 670–679.
- Banerjee, S., Resch, Y., Chen, K.-W., ... Vrtala, S. (2015) Der p 11 Is a Major Allergen for House Dust Mite-Allergic Patients Suffering from Atopic Dermatitis. *Journal of Investigative Dermatology*, 135, 102–109.
- Bao, L., Chau, C., Bao, J., Tsoukas, M.M. ja Chan, L.S. (2018) IL-4 dysregulates microRNAs involved in inflammation, angiogenesis and apoptosis in epidermal keratinocytes. *Microbiology and Immunology*, 62, 732–736.
- Barbarot, S., Auziere, S., Gadkari, A., Girolomoni, G., Puig, L., Simpson, E.L., Margolis, D.J., de Bruin-Weller, M. ja Eckert, L. (2018) Epidemiology of atopic dermatitis in adults: Results from an international survey. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 73, 1284–1293.
- Baroni, A., Buommino, E., De Gregorio, V., Ruocco, E., Ruocco, V. ja Wolf, R. (2012) Structure and function of the epidermis related to barrier properties. *Clinics in Dermatology*, 30, 257–262.
- Bartel, D.P. (2009) MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell*.
- Baurecht, H., Irvine, A.D., Novak, N., Illig, T., Bühler, B., Ring, J., Wagenpfeil, S. ja Weidinger, S. (2007) Toward a major risk factor for atopic eczema: Meta-analysis of filaggrin polymorphism data. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 120, 1406–1412.
- Beck, L.A., Thaçi, D., Hamilton, J.D., ... Radin, A.R. (2014) Dupilumab Treatment in Adults with Moderate-to-Severe Atopic Dermatitis. *New England Journal of Medicine*, 371, 130–139.
- Behm-Ansmant, I., Rehwinkel, J., Doerks, T., Stark, A., Bork, P. ja Izaurralde, E. (2006) mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes and Development*, 20, 1885–1898.
- Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M. ja Hannon, G.J. (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 409, 363–366.

- Blanco, P., Palucka, A.K., Pascual, V. ja Banchereau, J. (2008) Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 19, 41–52.
- Bohnsack, M.T., Czaplinski, K. ja Görlich, D. (2004) Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA*, 10, 185–191.
- Boniface, K., Bernard, F.-X., Garcia, M., Gurney, A.L., Lecron, J.-C. ja Morel, F. (2005) IL-22 Inhibits Epidermal Differentiation and Induces Proinflammatory Gene Expression and Migration of Human Keratinocytes. *The Journal of Immunology*, 174, 3695–3702.
- Bowcock, A.M. ja Krueger, J.G. (2005) Getting under the skin: The immunogenetics of psoriasis. *Nature Reviews Immunology*, 5, 699–711.
- Brandner, J.M., Zorn-Kruppa, M., Yoshida, T., Moll, I., Beck, L.A. ja De Benedetto, A. (2015) Epidermal tight junctions in health and disease. *Tissue Barriers*, 3.
- Brunner, P.M., Emerson, R.O., Tipton, C., Garcet, S., Khattri, S., Coats, I., Krueger, J.G. ja Guttman-Yassky, E. (2017) Nonlesional atopic dermatitis skin shares similar T-cell clones with lesional tissues. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 72, 2017–2025.
- Byremo, G., Rød, G. ja Carlsen, K.H. (2006) Effect of climatic change in children with atopic eczema. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 61, 1403–1410.
- Cai, X., Hagedorn, C.H. ja Cullen, B.R. (2004) Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *Rna*, 10, 1957–1966.
- Calautti, E., Avalle, L. ja Poli, V. (2018) Psoriasis: A STAT3-centric view. *International Journal of Molecular Sciences*, 19.
- Chan, T.C., Hawkes, J.E. ja Krueger, J.G. (2018) Interleukin 23 in the skin: role in psoriasis pathogenesis and selective interleukin 23 blockade as treatment. *Therapeutic Advances in Chronic Disease*, 9, 111–119.
- Chiricozzi, A., Nograles, K.E., Johnson-Huang, L.M., ... Krueger, J.G. (2014) IL-17 induces an expanded range of downstream genes in reconstituted human epidermis model. *PLoS ONE*, 9.
- Christensen, T.E., Callis, K.P., Papenfuss, J., Hoffman, M.S., Hansen, C.B., Wong, B., Panko, J.M. ja Krueger, G.G. (2006) Observations of psoriasis in the absence of therapeutic intervention identifies two unappreciated morphologic variants, thin-plaque and thick-plaque psoriasis, and their associated phenotypes. *Journal of Investigative Dermatology*, 126, 2397–2403.
- Christopher, A., Kaur, R., Kaur, G., Kaur, A., Gupta, V. ja Bansal, P. (2016) MicroRNA therapeutics: Discovering novel targets and developing specific therapy. *Perspectives in Clinical Research*, 7, 68.
- Coates, L.C. ja Helliwell, P.S. (2016) Methotrexate efficacy in the tight control in psoriatic arthritis study. *Journal of Rheumatology*, 43, 356–361.
- Czarnowicki, T., He, H., Krueger, J.G. ja Guttman-Yassky, E. (2019) Atopic dermatitis endotypes and implications for targeted therapeutics. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 143, 1–11.

- Dainichi, T., Kitoh, A., Otsuka, A., Nakajima, S., Nomura, T., Kaplan, D.H. ja Kabashima, K. (2018) The epithelial immune microenvironment (EIME) in atopic dermatitis and psoriasis. *Nature Immunology*, 19, 1286–1298.
- Dand, N., Mucha, S., Tsoi, L.C., ... Barker, J.N. (2017) Exome-wide association study reveals novel psoriasis susceptibility locus at TNFSF15 and rare protective alleles in genes contributing to type I IFN signalling. *Human Molecular Genetics*, 26, 4301–4313.
- Danso, M.O., Van Drongelen, V., Mulder, A., Van Esch, J., Scott, H., Van Smeden, J., El Ghalbzouri, A. ja Bouwstra, J.A. (2014) TNF- α and Th2 cytokines induce atopic dermatitis-like features on epidermal differentiation proteins and stratum corneum lipids in human skin equivalents. *Journal of Investigative Dermatology*, 134, 1941–1950.
- Deckers, I.A.G., McLean, S., Linssen, S., Mommers, M., van Schayck, C.P. ja Sheikh, A. (2012) Investigating international time trends in the incidence and prevalence of atopic eczema 1990-2010: A systematic review of epidemiological studies. *PLoS ONE*, 7.
- Deckers, J., Sichien, D., Plantinga, M., ... Hammad, H. (2017) Epicutaneous sensitization to house dust mite allergen requires interferon regulatory factor 4-dependent dermal dendritic cells. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 140, 1364-1377.e2.
- Ellwood, P., Asher, M.I., García-Marcos, L., Williams, H., Keil, U., Robertson, C. ja Nagel, G. (2013) Do fast foods cause asthma, rhinoconjunctivitis and eczema? Global findings from the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Phase Three. *Thorax*, 68, 351–360.
- Elmose, C. ja Thomsen, S.F. (2015) Twin Studies of Atopic Dermatitis: Interpretations and Applications in the Filaggrin Era. *Journal of Allergy*, 2015, 1–7.
- Eulalio, A., Huntzinger, E. ja Izaurralde, E. (2008) GW182 interaction with Argonaute is essential for miRNA-mediated translational repression and mRNA decay. *Nature Structural and Molecular Biology*, 15, 346–353.
- Feldman, S.R. ja Clark, A.R. (1998) Psoriasis. *Medical Clinics of North America*, 82, 1135–1144.
- Flohr, C. ja Mann, J. (2014) New insights into the epidemiology of childhood atopic dermatitis. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 69, 3–16.
- Fogel, O., Bugge Tinggaard, A., Fagny, M., ... Tost, J. (2019) Deregulation of microRNA expression in monocytes and CD4+ T lymphocytes from patients with axial spondyloarthritis. *Arthritis Research and Therapy*, 21.
- Gambichler, T., Kreuter, A., Tomi, N.S., Othlinghaus, N., Altmeyer, P. ja Skrygan, M. (2008) Gene expression of cytokines in atopic eczema before and after ultraviolet A1 phototherapy. *British Journal of Dermatology*, 158, 1117–1120.
- Gelfand, J.M., Gladman, D.D., Mease, P.J., Smith, N., Margolis, D.J., Nijsten, T., Stern, R.S., Feldman, S.R. ja Rolstad, T. (2005) Epidemiology of psoriatic arthritis in the population of the United States. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 53, 573.e1-573.e13.
- Gittler, J.K., Shemer, A., Suárez-Fariñas, M., ... Guttman-Yassky, E. (2012) Progressive activation of TH2/TH22 cytokines and selective epidermal proteins characterizes acute and chronic atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 130, 1344–1354.
- Greb, J.E., Goldminz, A.M., Elder, J.T., Lebwohl, M.G., Gladman, D.D., Wu, J.J., Mehta, N.N.,

- Finlay, A.Y. ja Gottlieb, A.B. (2016) Psoriasis. *Nature Reviews Disease Primers*, 2.
- Griffiths, C.E. ja Barker, J.N. (2007) Pathogenesis and clinical features of psoriasis. *Lancet*, 370, 263–271.
- Grjibovski, A., Olsen, A., Magnus, P. ja Harris, J. (2007) Psoriasis in Norwegian twins: contribution of genetic and environmental effects. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 21, 1337–1343.
- Gu, C., Li, Y., Wu, J. ja Xu, J. (2017) IFN- γ -induced microRNA-29b up-regulation contributes to keratinocyte apoptosis in atopic dermatitis through inhibiting Bcl2L2. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 10, 10117.
- Gudjonsson, J.E., Karason, A., Hjaltey Runarsdottir, E., Antonsdottir, A.A., Hauksson, V.B., Jónsson, H.H., Gulcher, J., Stefansson, K. ja Valdimarsson, H. (2006) Distinct Clinical Differences Between HLA-Cw*0602 Positive and Negative Psoriasis Patients – An Analysis of 1019 HLA-C- and HLA-B-Typed Patients. *Journal of Investigative Dermatology*, 126, 740–745.
- Gudjonsson, J.E., Thorarinsson, A.M., Sigurgeirsson, B., Kristinsson, K.G. ja Valdimarsson, H. (2003) Streptococcal throat infections and exacerbation of chronic plaque psoriasis: a prospective study. *British Journal of Dermatology*, 149, 530–534.
- Gupta, R., Debbaneh, M.G. ja Liao, W. (2014) Genetic Epidemiology of Psoriasis. *Current Dermatology Reports*, 3, 61–78.
- Guttman-Yassky, E. ja Krueger, J.G. (2017) Atopic dermatitis and psoriasis: two different immune diseases or one spectrum? *Current Opinion in Immunology*.
- Guttman-Yassky, E., Krueger, J.G. ja Lebwohl, M.G. (2018) Systemic immune mechanisms in atopic dermatitis and psoriasis with implications for treatment. *Experimental Dermatology*, 27, 409–417.
- Guttman-Yassky, E., Lowes, M.A., Fuentes-Duculan, J., ... Krueger, J.G. (2008) Low Expression of the IL-23/Th17 Pathway in Atopic Dermatitis Compared to Psoriasis. *The Journal of Immunology*, 181, 7420–7427.
- Guttman-Yassky, E., Silverberg, J.I., Nemoto, O., ... Simpson, E.L. (2019) Baricitinib in adult patients with moderate-to-severe atopic dermatitis: A phase 2 parallel, double-blinded, randomized placebo-controlled multiple-dose study. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 80, 913-921.e9.
- Hald, A., Andrés, R.M., Salskov-Iversen, M.L., Kjellerup, R.B., Iversen, L. ja Johansen, C. (2013) STAT1 expression and activation is increased in lesional psoriatic skin. *British Journal of Dermatology*, 168, 302–310.
- Han, J., Lee, Y., Yeom, K.H., Kim, Y.K., Jin, H. ja Kim, V.N. (2004) The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes and Development*, 18, 3016–3027.
- Hanifin, J.M., Thurston, M., Omoto, M., Cherill, R., Tofte, S.J., Graeber, M. ja Evaluator Group, T.E. (2001) The eczema area and severity index (EASI): assessment of reliability in atopic dermatitis. *Experimental Dermatology*, 10, 11–18.
- Harper, E.G., Guo, C., Rizzo, H., Lillis, J. V., Kurtz, S.E., Skorcheva, I., Purdy, D., Fitch, E., Iordanov, M. ja Blauvelt, A. (2009) Th17 cytokines stimulate CCL20 expression in keratinocytes in vitro and in vivo: Implications for psoriasis pathogenesis. *Journal of*

Investigative Dermatology, 129, 2175–2183.

Heidenreich, R., Röcken, M. ja Ghoreschi, K. (2009) Angiogenesis drives psoriasis pathogenesis. *International Journal of Experimental Pathology*, 90, 232–248.

Hermann, H., Runnel, T., Aab, A., ... Rebane, A. (2017) miR-146b Probably Assists miRNA-146a in the Suppression of Keratinocyte Proliferation and Inflammatory Responses in Psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology*, 137, 1945–1954.

Ho, V.C.Y., Griffiths, C.E.M., Berth-Jones, J., Papp, K.A., Vanaclocha, F., Dauden, E., Beard, A., Puvanarajan, L. ja Paul, C. (2001) Intermittent short courses of cyclosporine microemulsion for the long-term management of psoriasis: A 2-year cohort study. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 44, 643–651.

Honari, G. ja Maibach, H. (2014) Skin Structure and Function. *Applied Dermatotoxicology* lk 1–10. Elsevier.

Humeniuk, P., Dubiela, P. ja Hoffmann-Sommergruber, K. (2017) Dendritic cells and their role in allergy: Uptake, proteolytic processing and presentation of allergens. *International Journal of Molecular Sciences*, 18.

Huntzinger, E. ja Izaurralde, E. (2011) Gene silencing by microRNAs: Contributions of translational repression and mRNA decay. *Nature Reviews Genetics*, 12, 99–110.

Irvine, A.D., McLean, W.H.I. ja Leung, D.Y.M. (2011) Filaggrin mutations associated with skin and allergic diseases. *New England Journal of Medicine*, 365, 1315–1327.

Jacob, S.E., Nassiri, M., Kerdel, F.A. ja Vincek, V. (2003) Simultaneous measurement of multiple Th1 and Th2 serum cytokines in psoriasis and correlation with disease severity. *Mediators of Inflammation*, 12, 309–313.

Johnston, A., Guzman, A.M., Swindell, W.R., Wang, F., Kang, S. ja Gudjonsson, J.E. (2014) Early tissue responses in psoriasis to the antitumour necrosis factor- α biologic etanercept suggest reduced interleukin-17 receptor expression and signalling. *British Journal of Dermatology*, 171, 97–107.

Joyce, C.E., Zhou, X., Xia, J., Ryan, C., Thrash, B., Menter, A., Zhang, W. ja Bowcock, A.M. (2011) Deep sequencing of small RNAs from human skin reveals major alterations in the psoriasis miRNAome. *Human Molecular Genetics*, 20, 4025–4040.

Kalayciyan, A., Aydemir, E.H. ja Kotogyan, A. (2007) Experimental Koebner Phenomenon in Patients with Psoriasis. *Dermatology*, 215, 114–117.

Kezic, S. ja Jakasa, I. (2016) Filaggrin and Skin Barrier Function. *Current Problems in Dermatology (Switzerland)*, 49, 1–7.

Khattari, S., Brunner, P.M., Garcet, S., ... Guttman-Yassky, E. (2017) Efficacy and safety of ustekinumab treatment in adults with moderate-to-severe atopic dermatitis. *Experimental Dermatology*, 26, 28–35.

Khvorova, A., Reynolds, A. ja Jayasena, S.D. (2003) Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*, 115, 209–216.

Kim, Y.K. ja Kim, V.N. (2007) Processing of intronic microRNAs. *EMBO Journal*, 26, 775–783.

- Kim, J., Kim, B.E. ja Leung, D.Y.M. (2019) Pathophysiology of atopic dermatitis: Clinical implications. *Allergy and Asthma Proceedings*, 40, 84–92.
- Kivihall, A., Aab, A., Soja, J., Sładek, K., Sanak, M., Altraja, A., Jakiela, B., Bochenek, G. ja Rebane, A. (2019) Reduced expression of miR-146a in human bronchial epithelial cells alters neutrophil migration. *Clinical and Translational Allergy*, 9, 62.
- Krist, B., Florczyk, U., Pietraszek-Gremplewicz, K., Józkwicz, A. ja Dulak, J. (2015) The Role of miR-378a in Metabolism, Angiogenesis, and Muscle Biology.
- Krueger, J.G. (2002) The immunologic basis for the treatment of psoriasis with new biologic agents. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 46, 1–26.
- Kryczek, I., Bruce, A.T., Gudjonsson, J.E., ... 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, 4733–4741.
- Kunz, B., Oranje, A.P., Labrèze, L., Stalder, J.-F., Ring, J. ja Taïeb, A. (1997) Clinical Validation and Guidelines for the SCORAD Index: Consensus Report of the European Task Force on Atopic Dermatitis. *Dermatology*, 195, 10–19.
- Kuo, I.H., Yoshida, T., De Benedetto, A. ja Beck, L.A. (2013) The cutaneous innate immune response in patients with atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 131, 266–278.
- Lau, N.C., Lim, L.P., Weinstein, E.G. ja Bartel, D.P. (2001) An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 294, 858–862.
- Lebwohl, M. (2003) Psoriasis. *Lancet* lk 1197–1204. Elsevier Limited.
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., ... Kim, V.N. (2003) The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 425, 415–419.
- Lee, R., Feinbaum, R. ja Ambros, V. (1993) The *C. elegans* Heterochronic Gene *lin-4* Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75, 843–854.
- Lerman, G., Avivi, C., Mardoukh, C., ... Avni, D. (2011) MiRNA expression in psoriatic skin: Reciprocal regulation of hsa-miR-99a and IGF-1R. *PLoS ONE*, 6.
- Leung, D.Y.M., Boguniewicz, M., Howell, M.D., Nomura, I. ja Hamid, Q.A. (2004) New insights into atopic dermatitis. *J Clin Invest.*, 113, 651–657.
- Leung, A.K.L. ja Sharp, P.A. (2010) MicroRNA Functions in Stress Responses. *Molecular Cell*.
- Lewis, B.P., Burge, C.B. ja Bartel, D.P. (2005) Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, 120, 15–20.
- Lewis, B.P., Shih, I.H., Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P. ja Burge, C.B. (2003) Prediction of Mammalian MicroRNA Targets. *Cell*, 115, 787–798.
- Li, Z. ja Rana, T.M. (2014) Therapeutic targeting of microRNAs: Current status and future challenges. *Nature Reviews Drug Discovery*, 13, 622–638.
- Liu, C.F., Drocourt, D., Puzo, G., Wang, J.Y. ja Riviere, M. (2013) Innate Immune Response of Alveolar Macrophage to House Dust Mite Allergen Is Mediated through TLR2/-4 Co-Activation. *PLoS ONE*, 8.

- Lodén, M. (2003) Role of Topical Emollients and Moisturizers in the Treatment of Dry Skin Barrier Disorders. *American Journal of Clinical Dermatology*, 4, 771–788.
- Lønnberg, A.S., Skov, L., Skytthe, A., Kyvik, K.O., Pedersen, O.B. ja Thomsen, S.F. (2013) Heritability of psoriasis in a large twin sample. *British Journal of Dermatology*, 169, 412–416.
- Løvendorf, M.B., Mitsui, H., Zibert, J.R., Røpke, M.A., Hafner, M., Dyring-Andersen, B., Bonfeld, C.M., Krueger, J.G. ja Skov, L. (2015) Laser capture microdissection followed by next-generation sequencing identifies disease-related microRNAs in psoriatic skin that reflect systemic microRNA changes in psoriasis. *Experimental Dermatology*, 24, 187–193.
- Lovendorf, M.B. ja Skov, L. (2015) MiRNAs in inflammatory skin diseases and their clinical implications. *Expert Review of Clinical Immunology*, 11, 467–477.
- Lowes, M.A., Bowcock, A.M. ja Krueger, J.G. (2007) Pathogenesis and therapy of psoriasis. *Nature*, 445, 866–873.
- Lucky, A.W., Leach, A.D., Laskarzewski, P. ja Wenck, H. (1997) Use of an emollient as a steroid-sparing agent in the treatment of mild to moderate atopic dermatitis in children. *Pediatric Dermatology*, 14, 321–324.
- Lyons, J.J., Milner, J.D. ja Stone, K.D. (2015) Atopic Dermatitis in Children: Clinical Features, Pathophysiology, and Treatment. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 35, 161–183.
- Martinez, I., Hayes, K.E., Barr, J.A., Harold, A.D., Xie, M., Bukhari, S.I.A., Vasudevan, S., Steitz, J.A. ja DiMaio, D. (2017) An Exportin-1-dependent microRNA biogenesis pathway during human cell quiescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114, E4961–E4970.
- Mease, P.J., Gladman, D.D., Papp, K.A., ... Alvarez, D. (2013) Prevalence of rheumatologist-diagnosed psoriatic arthritis in patients with psoriasis in European/North American dermatology clinics. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 69, 729–735.
- Meisgen, F., Xu Landén, N., Wang, A., ... Pivarsci, A. (2014) MiR-146a negatively regulates TLR2-induced inflammatory responses in keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology*, 134, 1931–1940.
- Meisgen, F., Xu, N., Wei, T., ... Sonkoly, E. (2012) MiR-21 is up-regulated in psoriasis and suppresses T cell apoptosis. *Experimental Dermatology*, 21, 312–314.
- Meister, G., Landthaler, M., Patkaniowska, A., Dorsett, Y., Teng, G. ja Tuschl, T. (2004) Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Molecular Cell*, 15, 185–197.
- Mestdagh, P., Hartmann, N., Baeriswyl, L., ... Vandesompele, J. (2014) Evaluation of quantitative mirNA expression platforms in the mirNA quality control (mirQC) study. *Nature Methods*, 11, 809–815.
- Metsalu, T. ja Vilo, J. (2015) ClustVis: a web tool for visualizing clustering of multivariate data using Principal Component Analysis and heatmap. *Web Server issue Published online*, 43.
- Morizane, S., Yamasaki, K., Mühleisen, B., Kotol, P.F., Murakami, M., Aoyama, Y., Iwatsuki, K., Hata, T. ja Gallo, R.L. (2012) Cathelicidin antimicrobial peptide LL-37 in psoriasis enables keratinocyte reactivity against TLR9 ligands. *Journal of Investigative Dermatology*, 132, 135–143.

- Mrowietz, U., Kragballe, K., Reich, K., ... Yawalkar, N. (2011) Definition of treatment goals for moderate to severe psoriasis: A European consensus. *Archives of Dermatological Research*, 303, 1–10.
- Muraro, A., Lemanske, R.F., Hellings, P.W., ... Agache, I. (2016) Precision medicine in patients with allergic diseases: Airway diseases and atopic dermatitis - PRACTALL document of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology and the American Academy of Allergy, Asthma & Immunology. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 137, 1347–1358.
- Murray, M.L., Bergstresser, P.R., Adams-Huet, B. ja Cohen, J.B. (2009) Relationship of psoriasis severity to obesity using same-gender siblings as controls for obesity. *Clinical and Experimental Dermatology*, 34, 140–144.
- Nair, R.P., Stuart, P.E., Nistor, I., ... Elder, J.T. (2006) Sequence and haplotype analysis supports HLA-C as the psoriasis susceptibility 1 gene. *American Journal of Human Genetics*, 78, 827–851.
- Nakamura, T., Hirasawa, Y., Takai, T., Mitsuishi, K., Okuda, M., Kato, T., Okumura, K., Ikeda, S. ja Ogawa, H. (2006) Reduction of Skin Barrier Function by Proteolytic Activity of a Recombinant House Dust Mite Major Allergen Der f 1. *Journal of Investigative Dermatology*, 126, 2719–2723.
- Naldi, L., Chatenoud, L., Linder, D., ... La Vecchia, C. (2005) Cigarette smoking, body mass index, and stressful life events as risk factors for psoriasis: Results from an Italian case-control study. *Journal of Investigative Dermatology*, 125, 61–67.
- Nanda, H., Ponnusamy, N., Odumpatta, R., Jeyakanthan, J. ja Mohanapriya, A. (2020) Exploring genetic targets of psoriasis using genome wide association studies (GWAS) for drug repurposing. *3 Biotech*, 10, 1–12.
- Nestle, F.O., Kaplan, D.H. ja Barker, J. (2009) Psoriasis. *New England Journal of Medicine*, 361, 496–509.
- Nogralles, K.E., Zaba, L.C., Guttman-Yassky, E., ... Krueger, J.G. (2008) Th17 cytokines interleukin (IL)-17 and IL-22 modulate distinct inflammatory and keratinocyte-response pathways. *British Journal of Dermatology*, 159, 1092–1102.
- Nutten, S. (2015) Atopic Dermatitis: Global Epidemiology and Risk Factors. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 66, 8–16.
- O’Connell, R.M., Rao, D.S. ja Baltimore, D. (2012) microRNA Regulation of Inflammatory Responses. *Annual Review of Immunology*, 30, 295–312.
- Ogdie, A., Yu, Y.D., Haynes, K., ... Gelfand, J.M. (2015) Risk of major cardiovascular events in patients with psoriatic arthritis, psoriasis and rheumatoid arthritis: A population-based cohort study. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 74, 326–332.
- Ong, P.Y., Ohtake, T., Brandt, C., Strickland, I., Boguniewicz, M., Ganz, T., Gallo, R.L. ja Leung, D.Y.M. (2002) Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. *New England Journal of Medicine*, 347, 1151–1160.
- Paller, A.S., Kong, H.H., Seed, P., Naik, S., Scharschmidt, T.C., Gallo, R.L., Luger, T. ja Irvine, A.D. (2019) The microbiome in patients with atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 143, 26–35.

- Parisi, R., Symmons, D.P.M., Griffiths, C.E.M. ja Ashcroft, D.M. (2013) Global epidemiology of psoriasis: A systematic review of incidence and prevalence. *Journal of Investigative Dermatology*, 133, 377–385.
- Park, J.E., Heo, I., Tian, Y., Simanshu, D.K., Chang, H., Jee, D., Patel, D.J. ja Kim, V.N. (2011) Dicer recognizes the 5' end of RNA for efficient and accurate processing. *Nature*, 475, 201–205.
- Paternoster, L., Standl, M., Waage, J., Baurecht, H., Hotze, M., Strachan, D. P., Curtin, J. A., Bønnelykke, K., Tian, C., Takahashi, A., Esparza-Gordillo, J., Alves, A. C., Thyssen, J. P., den Dekker, H. T., Ferreira, M. A., Altmaier, E., Sleiman, P. M., S. (2015) Multi-ethnic genome-wide association study of 21 , 000 cases and 95 , 000 controls identifies new risk loci for atopic dermatitis. *Nature Genetics*, 47, 1449–1456.
- Paternoster, L., Standl, M., Chen, C.-M., ... Evans, D.M. (2012) Meta-analysis of genome-wide association studies identifies three new risk loci for atopic dermatitis. *Nature Genetics*, 44, 187–192.
- Piao, X., Zhang, X., Wu, L. ja Belasco, J.G. (2010) CCR4-NOT Deadensylates mRNA Associated with RNA-Induced Silencing Complexes in Human Cells. *Molecular and Cellular Biology*, 30, 1486–1494.
- Rahmati, S., Tsoi, L., O’Rielly, D., Chandran, V. ja Rahman, P. (2020) Complexities in Genetics of Psoriatic Arthritis. *Current Rheumatology Reports*, 22, 10.
- Raychaudhuri, S.P. ja Gross, J. (2000) A Comparative Study of Pediatric Onset Psoriasis with Adult Onset Psoriasis. *Pediatric Dermatology*, 17, 174–178.
- Rebane, A., Runnel, T., Aab, A., ... Akdis, C.A. (2014) MicroRNA-146a alleviates chronic skin inflammation in atopic dermatitis through suppression of innate immune responses in keratinocytes. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 134, 836-847.e11.
- Rehal, B. ja Armstrong, A. (2011) Health Outcome Measures in Atopic Dermatitis: A Systematic Review of Trends in Disease Severity and Quality-of-Life Instruments 1985–2010 (toim LL Gluud). *PLoS ONE*, 6, e17520.
- Reich, K., Nestle, F.O., Papp, K., Ortonne, J.P., Evans, R., Guzzo, C., Li, S., Dooley, L.T. ja Griffiths, C.E.M. (2005) Infliximab induction and maintenance therapy for moderate-to-severe psoriasis: A phase III, multicentre, double-blind trial. *Lancet*, 366, 1367–1374.
- Richmond, J.M. ja Harris, J.E. (2014) Immunology and skin in health and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 4.
- Ring, J., Alomar, A., Bieber, T., ... Darsow, U. (2012) Guidelines for treatment of atopic eczema (atopic dermatitis) Part II. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 26, 1176–1193.
- Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J.L. ja Bradley, A. (2004) Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Research*, 14, 1902–1910.
- Rupaimoole, R. ja Slack, F.J. (2017) MicroRNA therapeutics: Towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*, 16, 203–221.
- Sagoo, G.S., Tazi-Ahnini, R., Barker, J.W.N., Elder, J.T., Nair, R.P., Samuelsson, L., Traupe, H., Trembath, R.C., Robinson, D.A. ja Iles, M.M. (2004) Meta-analysis of genome-wide studies of psoriasis susceptibility reveals linkage to chromosomes 6p21 and 4q28-q31 in Caucasian and

- Chinese Hans population. *Journal of Investigative Dermatology*, 122, 1401–1405.
- Sano, S., Chan, K.S., Carbajal, S., Clifford, J., Peavey, M., Kiguchi, K., Itami, S., Nickoloff, B.J. ja DiGiovanni, J. (2005) Stat3 links activated keratinocytes and immunocytes required for development of psoriasis in a novel transgenic mouse model. *Nature Medicine*, 11, 43–49.
- Schmid, P., Simon, D., Simon, H.U., Akdis, C.A. ja Wüthrich, B. (2001) Epidemiology, clinical features, and immunology of the „intrinsic“ (non-IgE-mediated) type of atopic dermatitis (constitutional dermatitis). *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 56, 841–849.
- Schram, M.E., Tedja, A.M., Spijker, R., Bos, J.D., Williams, H.C. ja Spuls, P.I. (2010) Is there a rural/urban gradient in the prevalence of eczema? A systematic review. *British Journal of Dermatology*, 162, 964–973.
- Schwarz, D.S., Hutvágner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N. ja Zamore, P.D. (2003) Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*, 115, 199–208.
- Shi, X., Jin, L., Dang, E., Chang, T., Feng, Z., Liu, Y. ja Wang, G. (2011) IL-17A upregulates keratin 17 expression in keratinocytes through STAT1-and STAT3-dependent mechanisms. *Journal of Investigative Dermatology*, 131, 2401–2408.
- Simpson, E.L., Flohr, C., Eichenfield, L.F., ... Omachi, T.A. (2018) Efficacy and safety of lebrikizumab (an anti-IL-13 monoclonal antibody) in adults with moderate-to-severe atopic dermatitis inadequately controlled by topical corticosteroids: A randomized, placebo-controlled phase II trial (TREBLE). *Journal of the American Academy of Dermatology*, 78, 863-871.e11.
- Solimani, F., Meier, K. ja Ghoreschi, K. (2019) Emerging Topical and Systemic JAK Inhibitors in Dermatology. *Frontiers in Immunology*, 10.
- Sonkoly, E., Janson, P., Majuri, M.L., ... Pivarcsi, A. (2010) MiR-155 is overexpressed in patients with atopic dermatitis and modulates T-cell proliferative responses by targeting cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 126, 581-589.e20.
- Sonkoly, E., Stähle, M. ja Pivarcsi, A. (2008) MicroRNAs: novel regulators in skin inflammation. *Clinical and Experimental Dermatology*, 33, 312–315.
- Sonkoly, E., Wei, T., Janson, P.C.J., ... Pivarcsi, A. (2007) MicroRNAs: Novel Regulators Involved in the Pathogenesis of Psoriasis? (toim J Zimmer). *PLoS ONE*, 2, e610.
- Soumelis, V., Reche, P.A., Kanzler, H., ... Liu, Y.J. (2002) Human epithelial cells trigger dendritic cell-mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nature Immunology*, 3, 673–680.
- Srivastava, A., Meisgen, F., Pasquali, L., Munkhammar, S., Xia, P., Stähle, M., Landén, N.X., Pivarcsi, A. ja Sonkoly, E. (2019) Next-Generation Sequencing Identifies the Keratinocyte-Specific miRNA Signature of Psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology*, 139, 2547-2550.
- Strober, B., Crowley, J., Langley, R.G., Gordon, K., Menter, A., Leonardi, C., Arkan, D. ja Valdecantos, W.C. (2018) Systematic review of the real-world evidence of adalimumab safety in psoriasis registries. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 32, 2126–2133.
- Suárez-Varela, M.M., García-Marcos Alvarez, L., Kogan, M.D., ... Varela, Á.L.S. (2008) Climate and prevalence of atopic eczema in 6- to 7-year-old school children in Spain. *ISAAC*

Taganov, K.D., Boldin, M.P., Chang, K.J. ja Baltimore, D. (2006) NF- κ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 12481–12486.

Teunissen, M.B.M., Koomen, C.W., De Waal Malefyt, R., Wierenga, E.A. ja Bos, J.D. (1998) Interleukin-17 and interferon- γ synergize in the enhancement of proinflammatory cytokine production by human keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology*, 111, 645–649.

Tsoi, L.C., Stuart, P.E., Tian, C., ... Elder, J.T. (2017) Large scale meta-analysis characterizes genetic architecture for common psoriasis associated variants. *Nature Communications*, 8.

Ungar, B., Pavel, A.B., Li, R., ... Guttman-Yassky, E. (2020) Phase 2 Randomized, Double-blind Study of IL-17-Targeting with Secukinumab in Atopic Dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*.

Vaher, H., Runnel, T., Urgard, E., ... Rebane, A. (2019) miR-10a-5p is increased in atopic dermatitis and has capacity to inhibit keratinocyte proliferation. *Allergy*, 74, 2146–2156.

Verhoeven, E.W.M., Kraaimaat, F.W., De Jong, E.M.G.J., Schalkwijk, J., Van De Kerkhof, P.C.M. ja Evers, A.W.M. (2009) Effect of daily stressors on psoriasis: A prospective study. *Journal of Investigative Dermatology*, 129, 2075–2077.

Walt, F.M. (1989) *Terminal differentiation of epidermal keratinocytes*.

Weidinger, S., Beck, L.A., Bieber, T., Kabashima, K. ja Irvine, A.D. (2018) Atopic dermatitis. *Nature Reviews Disease Primers*, 4.

Weidinger, S. ja Novak, N. (2016) Atopic dermatitis. *The Lancet* 1k 1109–1122. Lancet Publishing Group.

Weidinger, S., O'Sullivan, M., Illig, T., ... Kabesch, M. (2008) Filaggrin mutations, atopic eczema, hay fever, and asthma in children. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 121, 1203–1210.

Weidinger, S., Willis-Owen, S.A.G., Kamatani, Y., ... Moffatt, M.F. (2013) A genome-wide association study of atopic dermatitis identifies loci with overlapping effects on asthma and psoriasis. *Human Molecular Genetics*, 22, 4841–4856.

Wickett, R.R. ja Visscher, M.O. (2006) Structure and function of the epidermal barrier. *American Journal of Infection Control*, 34, S98–S110.

Wolk, K., Witte, E., Wallace, E., Döcke, W.D., Kunz, S., Asadullah, K., Volk, H.D., Sterry, W. ja Sabat, R. (2006) IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: A potential role in psoriasis. *European Journal of Immunology*, 36, 1309–1323.

Wollenberg, A., Howell, M.D., Guttman-Yassky, E., Silverberg, J.I., Kell, C., Ranade, K., Moate, R. ja van der Merwe, R. (2019) Treatment of atopic dermatitis with tralokinumab, an anti-IL-13 mAb. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 143, 135–141.

Wollenberg, A., Reitamo, S., Girolomoni, G., Lahfa, M., Ruzicka, T., Healy, E., Giannetti, A., Bieber, T., Vyas, J. ja Deleuran, M. (2008) Proactive treatment of atopic dermatitis in adults with 0.1% tacrolimus ointment. *Allergy*, 63, 742–750.

- Woo, Y.R., Cho, D.H. ja Park, H.J. (2017) Molecular mechanisms and management of a cutaneous inflammatory disorder: Psoriasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 18.
- Wu, H., Deng, Y., Feng, Y., Long, D., Ma, K., Wang, X., Zhao, M., Lu, L. ja Lu, Q. (2018) Epigenetic regulation in B-cell maturation and its dysregulation in autoimmunity. *Cellular and Molecular Immunology*, 15, 676–684.
- Wuepper, K.D., Coulter, S.N. ja Haberman, A. (1990) Psoriasis vulgaris: A genetic approach. *Journal of Investigative Dermatology*, 95, S2–S4.
- Xu, N., Brodin, P., Wei, T., Meisgen, F., Eidsmo, L., Nagy, N., Kemeny, L., Stähle, M., Sonkoly, E. ja Pivarcsi, A. (2011) MiR-125b, a MicroRNA downregulated in psoriasis, modulates keratinocyte proliferation by targeting FGFR2. *Journal of Investigative Dermatology*, 131, 1521–1529.
- Xu, N., Meisgen, F., Butler, L.M., Han, G., Wang, X.-J., Söderberg-Nauclér, C., Stähle, M., Pivarcsi, A. ja Sonkoly, E. (2013) MicroRNA-31 Is Overexpressed in Psoriasis and Modulates Inflammatory Cytokine and Chemokine Production in Keratinocytes via Targeting Serine/Threonine Kinase 40. *The Journal of Immunology*, 190, 678–688.
- Yang, Z., Zeng, B., Wang, C., Wang, H., Huang, P. ja Pan, Y. (2017) MicroRNA-124 alleviates chronic skin inflammation in atopic eczema via suppressing innate immune responses in keratinocytes. *Cellular Immunology*, 319, 53–60.
- Yi, R. ja Fuchs, E. (2010) MicroRNA-mediated control in the skin. *Cell Death and Differentiation*, 17, 229–235.
- Zeng, Y.P., Nguyen, G.H. ja Jin, H.Z. (2016) MicroRNA-143 inhibits IL-13-induced dysregulation of the epidermal barrier-related proteins in skin keratinocytes via targeting to IL-13R α 1. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 416, 63–70.
- Zibert, J.R., Løvendorf, M.B., Litman, T., Olsen, J., Kaczkowski, B. ja Skov, L. (2010) MicroRNAs and potential target interactions in psoriasis. *Journal of Dermatological Science*, 58, 177–185.

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

1. miRNA-de arv inimese genoomis, miRBase andmebaas, külastatud 26.05.2020
<http://www.mirbase.org/cgi-bin/browse.pl?org=hsa>
2. ClustVis programm, külastatud 26.05.2020
<https://biit.cs.ut.ee/clustvis/>

LISAD

Lisa 1. Erinevalt ekspresseerunud miRNA-de profiil atoopilises dermatiidis ja psoriaasis

Tabel 8. Diferentsiaalselt ekspresseerunud miRNA-de väärtused atoopilises dermatiidis ja psoriaasis.

Diferentsiaalselt ekspresseerunud miRNA-d atoopilises dermatiidis ja psoriaasis (vs KT)												
miRNA	AD Avg (log2)	PS Avg (log2)	KT Avg (log2)	FC AD vs KT	P-val AD vs KT	FDR AD vs KT	FC PS vs KT	P-val PS vs KT	FDR PS vs KT	FC Ad vs PS	P-val AD vs PS	FDR AD vs PS
hsa-miR-31-5p	6,2	7,23	0,11	68,05	5,10E-19	3,38E-15	139,7	5,40E-21	3,58E-17	-2,05	0,0007	0,4417
hsa-miR-6126	4,96	4,58	0,07	29,58	1,58E-06	0,0003	22,7	0,0002	0,0125	1,3	0,0765	0,7709
hsa-miR-2115-5p	4,76	4,91	0,3	21,99	5,69E-12	1,89E-08	24,46	6,57E-13	2,18E-09	-1,11	0,2945	0,8611
hsa-miR-146a-5p	5,18	6,44	0,73	21,88	1,99E-07	5,72E-05	52,31	9,49E-10	7,87E-07	-2,39	0,0388	0,7253
hsa-miR-3175	4,67	4,67	0,36	19,79	2,54E-06	0,0004	19,88	1,14E-06	0,0002	-1	0,7641	0,965
hsa-miR-3651	4,8	5,57	0,53	19,32	1,20E-07	4,69E-05	32,95	3,46E-08	1,64E-05	-1,71	0,6282	0,9326
hsa-miR-25-3p	5,28	5,11	1,1	18,14	1,81E-06	0,0003	16,15	9,70E-06	0,0014	1,12	0,5322	0,9206
hsa-miR-7977	4,81	5,99	0,64	18,02	2,05E-05	0,0017	40,81	4,04E-07	9,93E-05	-2,26	0,1487	0,8019
hsa-miR-5100	6,08	6,39	2,05	16,28	1,31E-07	4,84E-05	20,2	9,35E-09	6,07E-06	-1,24	0,3021	0,8611
hsa-miR-532-3p	4,55	3,43	0,55	16,05	2,82E-06	0,0004	7,37	0,0003	0,0152	2,18	0,0892	0,7723
hsa-miR-5189-3p	4,12	3,64	0,14	15,72	1,91E-05	0,0016	11,3	1,57E-05	0,002	1,39	0,9431	0,9905
hsa-miR-200b-3p	4,7	4,56	0,74	15,49	4,21E-07	0,0001	14,09	1,40E-06	0,0003	1,1	0,6494	0,9379
hsa-miR-28-5p	4,48	4,15	0,59	14,86	0,0001	0,0053	11,78	9,74E-05	0,0076	1,26	0,9752	0,9956
hsa-miR-200b-5p	4,23	3,91	0,35	14,8	5,06E-06	0,0006	11,85	0,0003	0,0139	1,25	0,1477	0,8019
hsa-miR-4505	4,08	3,57	0,23	14,39	1,69E-07	5,56E-05	10,11	5,86E-06	0,0009	1,42	0,1876	0,8319
hsa-miR-130b-3p	3,8	2,36	0,11	12,91	1,41E-09	1,87E-06	4,75	1,65E-05	0,002	2,72	0,0009	0,4417
hsa-miR-18a-5p	3,63	3,19	-0,03	12,64	7,34E-06	0,0008	9,32	3,72E-06	0,0006	1,36	0,8005	0,9712
hsa-miR-423-5p	5,06	4,98	1,47	12,08	3,28E-06	0,0004	11,39	2,72E-05	0,0027	1,06	0,434	0,9004
hsa-miR-378f	4,16	5,13	0,57	12,06	0,0004	0,0132	23,6	0,0002	0,0117	-1,96	0,7803	0,9685
hsa-miR-7110-5p	4,83	5,19	1,3	11,55	1,62E-08	1,07E-05	14,87	1,52E-08	8,41E-06	-1,29	0,9807	0,9964
hsa-miR-320e	4,5	4,32	1,02	11,18	4,47E-05	0,0031	9,8	0,0003	0,014	1,14	0,5061	0,9172
hsa-miR-4521	3,46	3,28	0,01	10,94	0,0002	0,0089	9,64	0,0002	0,0123	1,13	0,9766	0,996
hsa-miR-409-3p	4,37	2,97	1,01	10,33	5,94E-07	0,0001	3,9	0,0003	0,0137	2,65	0,0301	0,7161
hsa-miR-4492	6,44	5,88	3,14	9,87	7,06E-08	3,90E-05	6,69	4,74E-07	0,0001	1,48	0,4661	0,9036
hsa-miR-1307-3p	3,6	2,64	0,33	9,65	1,82E-05	0,0016	4,97	0,001	0,0349	1,94	0,1422	0,7993
hsa-miR-378i	4,22	3,91	1,02	9,14	0,0005	0,0155	7,37	0,0003	0,016	1,24	0,8502	0,9769
hsa-miR-151a-3p	4,42	4,13	1,27	8,86	1,84E-07	5,56E-05	7,25	4,73E-06	0,0008	1,22	0,2263	0,8431
hsa-miR-422a	3,68	3,26	0,53	8,86	7,25E-05	0,0042	6,64	0,0002	0,0121	1,33	0,7124	0,9479
hsa-let-7f-5p	5	5,29	1,86	8,84	2,74E-06	0,0004	10,78	3,89E-07	9,91E-05	-1,22	0,4641	0,9036
hsa-miR-1233-5p	3,35	4,82	0,3	8,31	2,10E-06	0,0003	22,96	2,34E-10	2,47E-07	-2,76	0,0009	0,4417
hsa-miR-4485	6,44	6,03	3,41	8,21	2,46E-09	2,72E-06	6,17	3,20E-08	1,63E-05	1,33	0,3046	0,8611
hsa-miR-532-5p	5,26	4,77	2,23	8,18	7,98E-07	0,0002	5,83	0,0002	0,0122	1,4	0,0468	0,7253
hsa-miR-937-5p	3,61	3,95	0,71	7,43	2,26E-05	0,0018	9,44	6,80E-05	0,0057	-1,27	0,6818	0,9396
hsa-miR-6812-5p	5	5,59	2,15	7,2	1,74E-05	0,0015	10,86	1,21E-07	4,00E-05	-1,51	0,069	0,7543
hsa-miR-4443	3,15	3,88	0,33	7,06	3,56E-05	0,0026	11,74	2,67E-05	0,0027	-1,66	0,9152	0,9877
hsa-miR-744-5p	5,77	5,59	2,97	6,97	0,0001	0,0053	6,13	0,0002	0,0108	1,14	0,861	0,9791
hsa-miR-4507	4,55	4,81	1,77	6,87	3,29E-05	0,0025	8,22	0,0004	0,0176	-1,2	0,3605	0,8754
hsa-miR-1246	3,27	3,27	0,52	6,7	0,0004	0,0131	6,7	0,0013	0,0424	-1	0,6342	0,9341
hsa-miR-1260b	3,02	3,65	0,28	6,69	0,0005	0,0151	10,34	0,0001	0,0088	-1,54	0,5808	0,9267
hsa-miR-146b-5p	2,63	1,66	-0,1	6,64	5,16E-05	0,0034	3,38	0,0009	0,0337	1,96	0,2831	0,8611
hsa-miR-708-5p	4,94	5,09	2,29	6,24	0,0003	0,0106	6,94	0,0002	0,0126	-1,11	0,9269	0,9877
hsa-miR-425-5p	5,45	5,35	2,83	6,16	4,19E-07	0,0001	5,75	4,20E-07	9,94E-05	1,07	0,9995	1
hsa-miR-4429	5,14	5,39	2,59	5,86	3,17E-05	0,0024	6,98	8,21E-06	0,0013	-1,19	0,6162	0,9326
hsa-miR-3620-5p	5,03	5,32	2,5	5,8	1,10E-06	0,0002	7,08	6,34E-07	0,0001	-1,22	0,8367	0,9753
hsa-miR-455-3p	6,78	6,01	4,28	5,67	8,46E-07	0,0002	3,33	4,41E-05	0,004	1,7	0,1474	0,8019
hsa-miR-378c	5,54	6,27	3,05	5,64	4,27E-07	0,0001	9,32	9,41E-09	6,07E-06	-1,65	0,1434	0,7993
hsa-miR-362-5p	3,09	2,56	0,64	5,45	0,0001	0,0067	3,79	0,0004	0,0176	1,44	0,7174	0,9489
hsa-miR-6746-5p	3,19	4,04	0,78	5,33	0,0007	0,0179	9,6	1,32E-05	0,0017	-1,8	0,141	0,7993

hsa-miR-4284	2,78	3,28	0,4	5,2	1,14E-05	0,0011	7,35	1,18E-06	0,0002	-1,41	0,4001	0,8921
hsa-miR-34a-5p	3,27	3,47	1,02	4,76	0,0002	0,0099	5,45	0,0003	0,0152	-1,14	0,9413	0,9902
hsa-miR-6085	4,13	3,71	2	4,37	0,001	0,0216	3,28	0,0009	0,0338	1,33	0,9841	0,9967
hsa-miR-27b-5p	2,46	2,55	0,35	4,31	0,0007	0,018	4,6	0,0009	0,0337	-1,07	0,9284	0,9877
hsa-miR-106b-5p	5,6	5,49	3,51	4,25	0,0005	0,0155	3,94	0,0015	0,0467	1,08	0,6887	0,9414
hsa-miR-1275	2,41	2,24	0,35	4,17	0,0001	0,0057	3,7	0,0005	0,0212	1,13	0,5848	0,9274
hsa-miR-6880-5p	2,25	3,05	0,19	4,15	4,43E-06	0,0005	7,21	6,86E-07	0,0001	-1,74	0,4857	0,9113
hsa-let-7g-5p	5,34	5,31	3,32	4,06	0,0001	0,0055	3,97	0,0006	0,0255	1,02	0,5151	0,9174
hsa-miR-4669	2,27	3,05	0,35	3,78	0,0017	0,0334	6,5	0,0001	0,0098	-1,72	0,3317	0,8649
hsa-miR-6879-5p	1,94	2,47	0,1	3,57	0,0009	0,0198	5,14	0,0001	0,0102	-1,44	0,5049	0,9172
hsa-miR-4728-5p	2,56	3,9	0,81	3,37	0,0028	0,0444	8,54	1,74E-07	5,48E-05	-2,53	0,0009	0,4417
hsa-miR-1273g-3p	9,04	9,72	7,39	3,13	4,97E-07	0,0001	5,02	1,01E-08	6,07E-06	-1,61	0,1356	0,7993
hsa-miR-15a-5p	1,55	1,71	0,02	2,91	0,0006	0,0173	3,24	0,0003	0,0161	-1,12	0,8038	0,9714
hsa-miR-27b-3p	7,08	7,42	5,57	2,86	9,73E-08	4,03E-05	3,6	4,93E-08	1,89E-05	-1,26	0,7911	0,9705
hsa-let-7i-5p	6,81	6,63	5,36	2,74	3,68E-06	0,0004	2,41	2,68E-05	0,0027	1,14	0,4625	0,9036
hsa-miR-185-5p	6,54	6,77	5,11	2,69	7,70E-05	0,0044	3,16	0,0002	0,0124	-1,18	0,7159	0,9481
hsa-miR-3911	2,08	2,6	0,67	2,66	0,0024	0,0405	3,81	0,0002	0,0118	-1,43	0,3292	0,8645
hsa-miR-205-5p	10,11	10,1	8,75	2,58	9,33E-08	4,03E-05	2,56	2,20E-07	6,62E-05	1,01	0,7416	0,9564
hsa-miR-1207-5p	5,18	5,4	3,94	2,37	6,52E-05	0,0039	2,75	1,61E-05	0,002	-1,16	0,6045	0,9326
hsa-miR-4286	1,63	2,15	0,39	2,36	0,003	0,0459	3,39	0,0002	0,0107	-1,44	0,2647	0,8591
hsa-miR-93-5p	7,13	7,33	5,94	2,28	8,97E-07	0,0002	2,63	4,61E-07	0,0001	-1,16	0,8013	0,9712
hsa-miR-342-3p	7,46	7,4	6,3	2,24	0,0002	0,0095	2,15	0,001	0,037	1,04	0,5769	0,9267
hsa-miR-378a-3p	7,29	7,43	6,13	2,23	2,99E-06	0,0004	2,45	6,80E-07	0,0001	-1,1	0,5791	0,9267
hsa-miR-182-5p	5,81	5,85	4,67	2,21	0,0002	0,0069	2,27	4,05E-05	0,0037	-1,03	0,6152	0,9326
hsa-miR-17-5p	7,2	7,32	6,12	2,12	8,10E-06	0,0008	2,3	5,13E-08	1,89E-05	-1,09	0,0623	0,7441
hsa-miR-106a-5p	6,91	7,11	5,85	2,09	1,59E-06	0,0003	2,41	1,15E-07	4,00E-05	-1,15	0,3224	0,8627
hsa-miR-22-3p	6,55	6,62	5,49	2,08	4,65E-05	0,0031	2,18	0,0002	0,0132	-1,05	0,5522	0,922
hsa-miR-4739	5,92	5,94	4,87	2,07	0,0001	0,0067	2,11	0,0008	0,0301	-1,02	0,5296	0,9197
hsa-miR-203a	9,02	9,26	7,98	2,06	2,40E-06	0,0004	2,43	4,90E-08	1,89E-05	-1,18	0,1445	0,7993

Diferentsiaalselt ekspresseerunud miRNA-d atoopilises dermatiidis (vs KT, vs PS)

miRNA	AD Avg (log2)	PS Avg (log2)	KT Avg (log2)	FC AD vs KT	P-val AD vs KT	FDR AD vs KT	FC PS vs KT	P-val PS vs KT	FDR PS vs KT	FC Ad vs PS	P-val AD vs PS	FDR AD vs PS
hsa-miR-139-5p	4,84	3,95	0,64	18,33	0,0018	0,0343	9,93	0,1394	0,5033	1,85	0,0539	0,7256
hsa-miR-92b-3p	4,72	2,6	0,59	17,44	4,28E-05	0,003	4,02	0,0305	0,2747	4,34	0,0126	0,6799
hsa-miR-487b-3p	3,58	1,1	0,22	10,27	0,0002	0,0089	1,84	0,0717	0,3821	5,57	0,0195	0,6932
hsa-miR-432-5p	3,38	1,1	0,04	10,12	1,25E-05	0,0011	2,08	0,0744	0,3882	4,87	0,0013	0,4417
hsa-miR-3613-3p	3,99	3,06	0,65	10,09	0,0007	0,0177	5,3	0,0031	0,0771	1,9	0,553	0,922
hsa-miR-127-3p	5,22	4,38	2,07	8,88	0,0004	0,0132	4,97	0,043	0,3107	1,79	0,0562	0,7361
hsa-miR-23b-5p	3,3	2,79	0,17	8,71	0,0003	0,0119	6,12	0,0029	0,0728	1,42	0,393	0,8891
hsa-miR-1271-5p	3,5	1,48	0,43	8,38	1,06E-05	0,001	2,06	0,0142	0,1866	4,06	0,0083	0,6799
hsa-miR-106b-3p	3,3	1,63	0,31	7,98	4,26E-06	0,0005	2,5	0,0073	0,1312	3,19	0,0073	0,6559
hsa-miR-28-3p	3,42	2,92	0,54	7,39	0,0004	0,0125	5,2	0,0052	0,1088	1,42	0,2899	0,8611
hsa-miR-197-3p	4,04	3,34	1,22	7,07	0,0001	0,0053	4,36	0,0164	0,2018	1,62	0,0509	0,7253
hsa-miR-3621	3,77	3,73	1,01	6,81	0,0007	0,0177	6,6	0,0029	0,0728	1,03	0,5688	0,9252
hsa-miR-181b-5p	5,42	5,03	2,67	6,76	0,0007	0,0177	5,15	0,0059	0,1175	1,31	0,3961	0,891
hsa-miR-4750-5p	3,02	1,78	0,49	5,8	0,0002	0,008	2,45	0,0245	0,2476	2,37	0,0538	0,7256
hsa-miR-6779-5p	3,02	2,27	0,56	5,52	0,0009	0,0203	3,27	0,0182	0,2123	1,69	0,2177	0,8431
hsa-miR-379-5p	2,83	1,63	0,48	5,12	5,56E-06	0,0006	2,23	0,0165	0,2018	2,3	0,0038	0,6048
hsa-miR-21-5p	2,22	1,44	-0,1	4,98	0,0001	0,0059	2,89	0,004	0,09	1,72	0,1854	0,8312
hsa-miR-151b	2,7	1,6	0,48	4,68	0,0003	0,0113	2,18	0,0293	0,2679	2,15	0,0655	0,7459
hsa-miR-24-2-5p	2,53	1,05	0,36	4,51	9,48E-05	0,0049	1,62	0,0448	0,3164	2,79	0,0165	0,6799
hsa-miR-342-5p	2,12	0,58	0,01	4,32	0,0001	0,0067	1,49	0,0321	0,28	2,9	0,0348	0,7177
hsa-miR-345-5p	2,42	2,41	0,43	3,97	0,0031	0,047	3,94	0,0087	0,1465	1,01	0,6677	0,9379
hsa-miR-134-5p	2,09	0,91	0,1	3,96	2,37E-05	0,0019	1,75	0,0328	0,2818	2,26	0,0067	0,6298
hsa-miR-193b-5p	2,12	0,63	0,18	3,84	6,04E-06	0,0007	1,37	0,1306	0,4927	2,8	0,0003	0,4365
hsa-miR-20b-5p	2,64	2,76	0,74	3,73	0,0025	0,0416	4,07	0,0086	0,146	-1,09	0,6096	0,9326
hsa-miR-125b-2-3p	2,01	1,29	0,19	3,53	0,0004	0,0132	2,15	0,0238	0,2429	1,64	0,099	0,7764
hsa-miR-181a-5p	6,57	6,11	4,8	3,41	0,0005	0,0148	2,47	0,0032	0,0792	1,38	0,4615	0,9036
hsa-miR-619-5p	3,49	2,7	1,75	3,33	0,0004	0,0137	1,93	0,0129	0,1792	1,73	0,1753	0,811

hsa-miR-382-5p	1,89	0,5	0,18	3,28	0,0014	0,0281	1,25	0,1056	0,4546	2,63	0,0594	0,7434
hsa-miR-15b-5p	6,27	6,05	4,57	3,23	6,29E-05	0,0038	2,79	0,002	0,0562	1,16	0,1917	0,8333
hsa-miR-4749-5p	1,58	0,63	-0,09	3,17	0,0031	0,047	1,65	0,0248	0,249	1,92	0,376	0,8817
hsa-miR-501-3p	4,25	4,07	2,59	3,17	0,0004	0,0138	2,79	0,0238	0,2429	1,14	0,1076	0,792
hsa-miR-132-3p	1,65	0,43	0,07	2,99	0,0024	0,0405	1,28	0,0336	0,2828	2,33	0,2571	0,8558
hsa-miR-2110	1,92	1,1	0,39	2,9	3,45E-05	0,0025	1,64	0,0038	0,0877	1,77	0,0795	0,7709
hsa-miR-23a-5p	1,49	0,82	0	2,82	5,89E-05	0,0037	1,77	0,0068	0,1257	1,59	0,0726	0,7691
hsa-miR-4668-5p	3,92	3,23	2,44	2,79	0,0018	0,0334	1,73	0,0537	0,3413	1,62	0,1424	0,7993
hsa-miR-4433-3p	2,41	2,39	0,95	2,74	0,0025	0,0416	2,7	0,0018	0,0532	1,01	0,8983	0,9818
hsa-miR-27a-5p	1,56	0,47	0,12	2,71	0,0026	0,0426	1,27	0,0389	0,301	2,13	0,2448	0,8538
hsa-miR-3135b	1,47	0,66	0,04	2,71	0,0005	0,015	1,55	0,0529	0,3389	1,75	0,0559	0,7345
hsa-let-7b-5p	12,23	11,82	10,83	2,65	5,93E-07	0,0001	1,99	0,0009	0,0331	1,33	0,0098	0,6799
hsa-miR-500a-5p	1,63	1,33	0,24	2,63	0,0021	0,0373	2,13	0,0063	0,1222	1,23	0,6529	0,9379
hsa-miR-423-3p	6,24	5,94	4,87	2,59	0,0004	0,0137	2,11	0,007	0,1279	1,23	0,2692	0,8611
hsa-miR-221-3p	7,81	7,31	6,5	2,48	3,86E-07	0,0001	1,75	0,0014	0,0442	1,41	0,0042	0,6048
hsa-miR-4484	5,26	4,94	4,01	2,39	0,0006	0,0159	1,9	0,0011	0,0382	1,26	0,8034	0,9714
hsa-miR-193b-3p	7,38	6,92	6,15	2,35	0,0008	0,019	1,7	0,2264	0,6165	1,38	0,0133	0,6799
hsa-miR-16-5p	7,93	7,68	6,8	2,19	0,0001	0,0059	1,83	0,0015	0,0467	1,2	0,343	0,871
hsa-miR-23a-3p	10,59	9,98	9,45	2,19	7,68E-08	3,92E-05	1,44	0,0015	0,0467	1,52	0,0007	0,4417
hsa-miR-92a-3p	8,96	8,46	7,87	2,13	7,29E-05	0,0042	1,51	0,0136	0,1836	1,41	0,0459	0,7253
hsa-miR-6819-5p	1,48	1,11	0,4	2,11	0,0004	0,0138	1,64	0,0176	0,2087	1,29	0,1389	0,7993
hsa-miR-17-3p	0,91	0,09	-0,1	2,01	0,0003	0,0119	1,14	0,0947	0,435	1,77	0,0198	0,6934
hsa-miR-99b-5p	6,76	6,34	5,76	2,01	0,0005	0,0145	1,5	0,0375	0,2957	1,34	0,0761	0,7709
hsa-miR-4530	8,27	8,44	9,38	-2,15	1,77E-07	5,56E-05	-1,92	7,73E-05	0,0063	-1,12	0,0286	0,7161
hsa-miR-6743-5p	7,05	7,29	8,19	-2,21	1,50E-06	0,0003	-1,87	1,96E-05	0,0022	-1,18	0,3419	0,871
hsa-miR-8075	4,89	5,4	6,23	-2,53	7,37E-06	0,0008	-1,78	0,0041	0,0904	-1,43	0,0215	0,706

Diferentsiaalselt ekspresseerunud miRNA-d psoriaasis (vs KT vs AD)

miRNA	AD Avg (log2)	PS Avg (log2)	KT Avg (log2)	FC AD vs KT	P-val AD vs KT	FDR AD vs KT	FC PS vs KT	P-val PS vs KT	FDR PS vs KT	FC Ad vs PS	P-val AD vs PS	FDR AD vs PS
hsa-miR-629-5p	0,9	1,11	-0,07	1,96	0,0102	0,0929	2,26	0,0015	0,0462	-1,15	0,4278	0,9004
hsa-miR-194-5p	0,9	1,6	0,31	1,51	0,1482	0,4113	2,43	0,0012	0,041	-1,62	0,036	0,7204
hsa-miR-6808-3p	1,11	1,73	0,34	1,71	0,003	0,0459	2,62	5,69E-05	0,005	-1,54	0,1349	0,7993
hsa-miR-6831-5p	1,77	2,93	0,8	1,95	0,0246	0,1566	4,37	1,55E-05	0,002	-2,24	0,0064	0,6298

Diferentsiaalselt ekspresseerunud miRNA-d atoopilise dermatiidi ja psoriaasi vahel

miRNA	AD Avg (log2)	PS Avg (log2)	KT Avg (log2)	FC AD vs KT	P-val AD vs KT	FDR AD vs KT	FC PS vs KT	P-val PS vs KT	FDR PS vs KT	FC Ad vs PS	P-val AD vs PS	FDR AD vs PS
hsa-miR-6802-5p	1,91	0,44	0,47	2,71	0,0285	0,1699	-1,02	0,8954	0,9697	2,77	0,0295	0,7161
hsa-miR-149-5p	5,49	4,4	3,42	4,21	0,0088	0,0847	1,97	0,6108	0,8721	2,14	0,0221	0,7085

AD – atoopiline dermatiit, PS – psoriaas, KT – kontroll, Avg – keskmine (*average*) signaal log2 skaalal, FC – ekspressioonitaseme korduse erinevused (*fold change*) log2 skaalal, P val – P väärtus (*P value*), FDR – korrigeeritud P väärtus, valearvestuse määr (*false discovery rate*)

LIHTLITSENTS

Mina, Laura Pajusaar (sünnikuupäev 23. mai 1996)

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

„Nahas avaldunud mikroRNA-de ekspressiooni profiilide võrdlev analüüs atoopilise dermatiidi ja psoriaasi korral“,

mille juhendajad on Ana Rebane ja Julia Maslovskaja,

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, alates **01.07.2022** 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.

Laura Pajusaar

11.06.2020