

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

RAKUBIOLOOGIA ÕPPETOOL

Artjom Stepanjuk

**Integriinide modifitseerimine trofoblastide poolt sekreteeritud mikrovesiikulites ning tetraspaniin CD63 ja CFP liitvalgu saamine**

Magistritöö

Juhendajad

Dotsent Sulev Ingerpuu, Ph.D.

Professor Andres Salumets, Ph.D.

TARTU 2015

## SISUKORD

SISUKORD .....	2
KASUTATUD LÜHENDID .....	4
SISSEJUHATUS .....	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE .....	7
1.1 Platsenta .....	7
1.1.1 Platsenta makroanatomiline ehitus ja põhifunktsioonid .....	7
1.1.2 Platsenta areng .....	9
1.1.3 Trofoblastid .....	13
1.2 Rakkude poolt sekreteeritavad mikroosakesed .....	16
1.2.1 Eksosoomide ja mikrovesiikulite biogeneesi rajad ning funktsioonid .....	16
1.2.2 Mikroosakesed raseduse ja platsenta arengu ning talitluse kontekstis .....	18
1.3 Integriinid .....	19
2. EKSPERIMENTAALNE OSA .....	21
2.1 Töö eesmärgid .....	21
2.2 Materjalid ja meetodika .....	22
2.2.1 Kasutatud rakuliinid .....	22
2.2.1.1 Rakuliinide kasvatamise tingimused .....	23
2.2.2 Mikrovesiikulite eraldamine .....	23
2.2.3 Mikrovesiikulite ja rakkude lüüsimine .....	24
2.2.4 Valkude SDS-polüakrüülamiidgeel elektroforees ja immunoblot analüüs .....	25
2.2.5 Integriinide fragmentide mass-spektromeetria .....	26
2.2.6 Tetraspaniin CD63 ja CFP liitvalgu saamine .....	27
2.2.6.1 RNA eraldamine JEG-3 rakuliinist .....	27
2.2.6.2 cDNA süntees .....	27
2.2.6.3 Tetraspaniin CD63 kodeeriva DNA fragmendi paljundamine koos restriктаasi saitidega .....	28
2.2.6.4 Tetraspaniin CD63 DNA fragmendi restriktreerimine ja puhastamine .....	29

2.2.6.5 pECFP-C1-CD63 plasmidi valmistamine.....	30
2.2.6.6 pECFP-C1-CD63 plasmidi paljundamine ja puhastamine .....	31
2.2.7 Rakkude transfekterimine pECFP-C1-CD63 plasmiidiga.....	32
2.2.8 Transfekteritud rakuliinide mikroskopeerimine .....	32
2.3 Tulemused .....	34
2.3.1 Integriinide analüüs trofoblasti rakuliinide JAR ja JEG-3 poolt sekreteeritud mikrovesiikulites immunoblot meetodil.....	34
2.3.2 Integriinide $\alpha 6$ , $\beta 1$ ja $\beta 4$ ahelate fragmentide mass-spektromeetria.....	37
2.3.3 CFP-CD63 liitvalgu paiknemise uurimine pECFP-C1-CD63 plasmiidiga transfekteritud H1299 ja HTR8/SVneo rakuliinides .....	40
2.4 Arutelu.....	43
2.4.1 Integriinide uurimine trofoblastide rakuliinide JAR ja JEG-3 poolt sekreteeritud mikrovesiikulites .....	43
2.4.2 CFP-CD63 fluorestseeruva liitvalgu paiknemine transfekteritud rakkudes .....	45
KOKKUVÕTE .....	47
SUMMARY .....	49
TÄNUSÕNAD .....	51
KIRJANDUSE LOETELU.....	52
LIHTLITSENTS.....	59

## KASUTATUD LÜHENDID

ADAM (a disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein, ingl.k.)

ATCC (*american type culture collection, ingl.k.*)

CFP (*cyan fluorescent protein, ingl.k.*) - helesinine fluorestseeruv valk

DTT - ditiotreitool

ESKRT (*ESCRT-endosomal sorting complex required for transport, ingl.k.*) - endosoomi sorteeriv kompleks, mis suunab transporti

ETM – ekstratsellulaarne maatriks

FBS (*fetal bovine serum, ingl.k.*) - veise loote seerum

hCG (*human corion gonadotropin, ingl.k.*) – inimese koorioni gonadotropiin

HLA-G (*histocompatibility antigen, class I, G, ingl.k.*)

IL – interleukiin

LAMP2 (*Lysosome-associated membrane protein 2, ingl.k.*)

MMP – maatriksmetalloproteas

MUC – mutsiin

MVK – multivesikulaarne keha

PFA - paraformaldehüüd

PMSF – fenüülmetüülsulfonüülfluoriid

PVDF - polüvinülideenfluoriid membraan

RIPA puhver (*radioimmunoprecipitation assay buffer ingl.k.*)

RPMI 1640 (*Rosewell Park Memorial Institute medium*)

TNF- $\alpha$  (*tumor necrosis factor  $\alpha$ , ingl.k.*) – kasvaja nekroosifaktor alfa

VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule 1, ingl.k.*) – vaskulaarse rakuadhesiooni molekul 1

VEGF-1 (*vascular endothelial growth factor 1, ingl.k.*) – vaskulaarse endoteeli kasvufaktor 1

## SISSEJUHATUS

Platsenta areng on loote kujunemise ja kasvu seisukohalt väga oluline, sest see sõltub täielikult selle organi funktsioneerimisest. Veel enam, platsenta arengu häirete tagajärjel tekivad ebakõlad ka ema organismis. Näiteks võivad platsenta arengu häired põhjustada preeklampsiat, mida peetakse üheks kõige ohtlikumaks rasedusega kaasnevaks tüsistuseks. Platsenta on unikaalne organ paljudest aspektidest, sest tegemist on ajutise organiga. Kui platsenta on väljakujunenud ning rasedus kulgeb normaalselt, siis sünnituse hetkeks lõpeb tema funktsioneerimine ning ta eemaldatakse ema organismist koos lootega. Platsenta väga suur erinevus teistest organitest on ka see, et ta koosneb kahest komponendist. See tähendab, et platsentas on esindatud nii lootepoolne trofektodermaalse päritoluga osa kui ka emapoolne osa, mis on emaka endometriumist pärit. Lisaks sellele moodustavad platsenta väga olulise osa emapoolsed immuunsüsteemi rakud. Nagu ka teiste organite arengu käigus, toimivad üksteisele eri tüüpi rakud, kuid platsenta puhul puutuvad kokku veel lisaks erinevatest organismidest pärit rakud. Rakud kasutavad omavaheliseks suhtlemiseks palju erinevaid mehhanisme. Siiani on palju uuritud endokriinset, parakriinset, jukstakriinset ehk rakk-rakk kontakte ning rakkude seoseid ekstratsellulaarse maatriksiga rakkude omavahelise info ülekandmises. Suhteliselt hiljuti on leitud, et rakkude suhtluses on väga olulised ka nende poolt sekreteeritud mikroosakesed, nagu eksosoomid ja mikrovesiikulid. On näidatud, et ühtede rakkude poolt sekreteeritud mikroosakesi võivad sisse võtta teised rakud, mis vastavalt sellele muudavad oma füsioloogilisi protsesse. Samuti on teada, et rakkude poolt sekreteeritud eksosoomid võivad oluliselt mõjutada ekstratsellulaarse maatriksi struktuuri. Platsenta arengu ja funktsioneerimise seisukohalt on kõik need rakkudevahelise signaalsiooni viisid olulised. See, milline on mikroosakeste täpsem roll platsenta füsioloogias ja patoloogiate väljakujunemises, on veel vähe uuritud. Mikroosakeste platsenta rakkudele ja ekstratsellulaarsele maatriksile seondumise ja toime molekulaarsed mehhanismid vajavad suuremal määral uurimist ja täpsustamist.

Käesoleva magistr töö kirjanduse ülevaates käsitletakse platsenta põhifunktsioone ning arenguetappe. Lähemalt iseloomustatakse erinevaid trofoblastide tüüpe, mis suunavad platsenta arengut ja mängivad olulist rolli platsenta talitluses. Lisaks sellele iseloomustatakse lühidalt eksosoomide ja mikrovesiikulideid. Kirjanduse ülevaates käsitletakse nende erinevaid biogeneesi radasid ning põgusalt erinevate mikroosakeste molekulaarseid markerid.

Töö eksperimentaalse osa eesmärgiks oli uurida trofoblastide poolt sekreteeritud mikrovesiikulideid. Mudelsüsteemina kasutati trofoblastide rakuliine, mis vastavad invasiivset ja mitteinvasiivset tüüpi trofoblastidele. Selleks, et leida trofoblastide poolt sekreteeritud

mikrovesiikulite tuvastamiseks sobivaid pinnamarkereid, uuriti erinevate integriinide ekspressiooni nende pinnal. Meie eesmärgiks oli välja selgitada kas trofoblastide pinnal ekspresseeruvad integriinid asuvad ka nende poolt sekreteeritavate mikrovesiikulite pinnal.

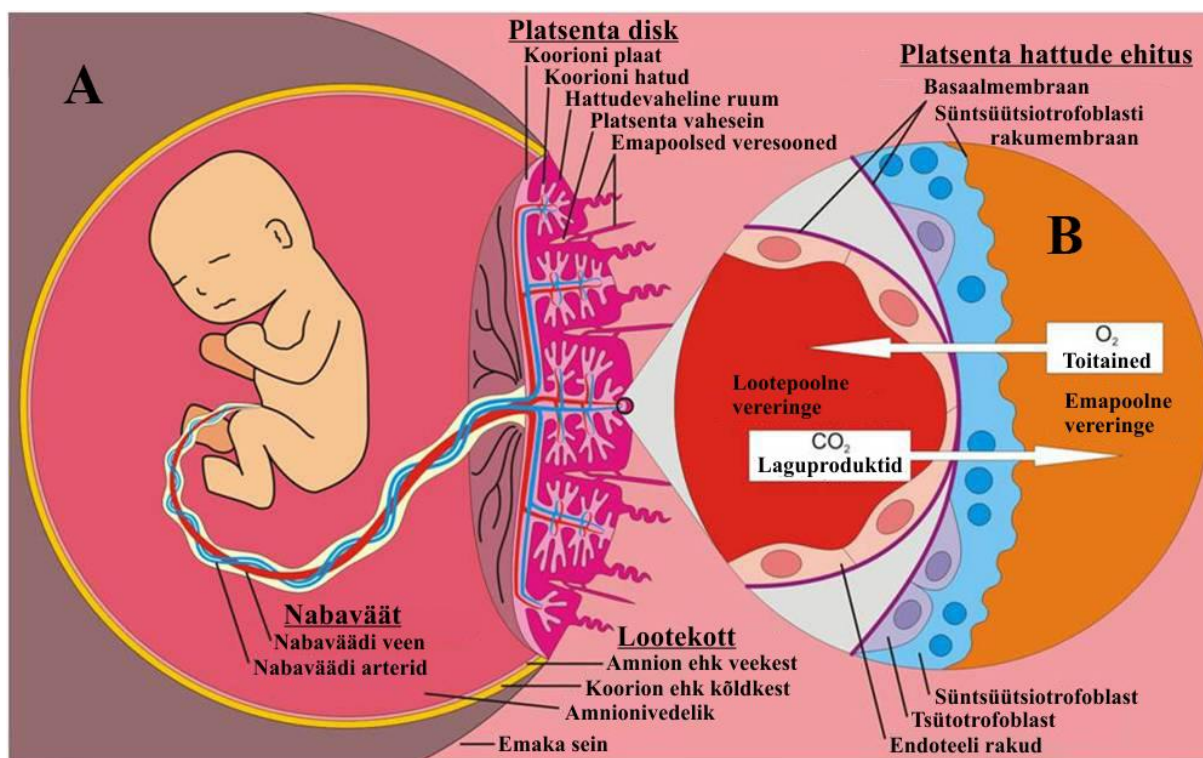
Selleks, et *in vivo* tingimustes oleks võimalik jälgida trofoblastide poolt sekreteeritavate eksosoomide sisenemist endomeetriumi rakkudesse on vaja saada püsivalt märgistatud eksosoomide. Kirjanduse andmete põhjal on teada, et eksosoomide üldtunnustatud markeriks peetakse tetraspaniini CD63. Sellest lähtuvalt otsustasime konstrueerida plasmidi, mis ekspresseeriks CFP-CD63 fluorestseeruvat liitvalku. Kuivõrd selline plasmiid õnnestus saada, siis analüüsisime selle ekspresseerumist ka ühes trofoblasti rakuliinis, milleks olid HTR8/Svneo rakud.

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1 Platsenta

### 1.1.1 Platsenta makroanatomiline ehitus ja põhifunktsioonid

Platsenta on imetajate (välja arvatud ainupilulised) ajutine spetsiifiline organ, mille põhifunktsiooniks on areneva loote varustamine hapniku ja toitainetega. Evolutsioonilisest vaatenurgast on tegemist väga noore organiga, sest platsentaarsed imetajad (sealhulgas ka inimene) on kõige hilisema tekkega ja esindavad kõige arenenumat loomade rühma. Platsenta erineb oma ehituselt kõikidest teistest organites, sest ta sisaldab nii emapoolset kui ka lootepoolset komponenti. Lootepoolne osa platsentast areneb blastotsüsti trofektodermist ja emapoolne komponent koosneb muundunud emaka limaskestast rakkudest, mida nimetatakse endomeetriumiks. Embrüo arengu ja kasvu käigus toimub ka ekstraembrüonaalsete kudede pidev muutumine. Inimese platsenta makroanatomiline ehitus kujuneb lõplikult välja kuuteistkümnendaks raseduse nädalaks ehk teise trimestri keskel (Joonis 1A). Selleks ajaks on loote embrüogeneesi etapp lõppenud ning selle kasv intensiivistub ja käivitub sisemiste organstruktuuride areng. Intensiivse kasvu tagamiseks ja efektiivseks toitainetega varustamiseks tekivad platsentas struktuurid, mida nimetatakse koorioni plaadi hattudeks.



**Joonis 1. Inimese platsenta üldine ehitus koos areneva lootega.** A – küps platsenta ja arenev loode on kinnitunud emaka seinale, B – platsentaarse barjääri ja ainevahetuse suundade suurendatud skeem. Muudatustega Elad jt. (2013) järgi.

Hattudes olevate rakkude plasmamembraani pindala on väga suur, mis arvutuste järgi kolmanda trimestri lõpuks võib olla kuni 70-90 m<sup>2</sup> (Ishikawa jt., 2014). Väga suur plasmamembraani pindala on vajalik selleks, et varustada kasvavat loodet vajalikul määral toitainetega ja hapnikuga ning samas viia ema vereringesse kõik ainevahetuse jääkproduktid. Koorioni hatud on väga harulised ja hargnevad struktuurid, mis tagab nende suure eripinna. Samas mõnedest hattude harudest moodustuvad rakusambad mis tungivad sügavamale detsiidua kihti, sest teiseks hattude oluliseks funktsiooniks on embrüo kinnitumine emaka seinale. Detsiidua kujutab endast hüpertrofeerunud emaka limaskesta ehk endomeetriumi rakkude kihti. Detsidualiseerimise protsessi käigus toimuvad endomeetriumis teatud morfoloogilised ja biokeemilised muutused. Endomeetriumi strooma rakud, mis sarnanevad rohkem fibroblastidele, muutuvad oma omadustelt epiteelilaasete rakkude sarnasteks. Need rakud muutuvad suuremaks, muutuvad polügonaalseteks ning neisse koguneb glükogeen. Detsiidua rakud hakkavad sekreteerima ekstratsellulaarse maatriksi (ETM) valke (laminiinid, tüüp IV kollageen, fibronektiin) ja põletikulise reaktsiooni vahendajamolekule (IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ ) (Tanaka jt., 1998). Detsiidua moodustamise esimesed signaalid tulevad steroidsetelt suguhormoonidelt, mida munasarjad produtseerivad menstruatsiooni tsükli keskfaasis (kollaskeha päritoluga progesteron) ning see toimub rasedusest sõltumata (Halasz ja Szekeres-Bartho, 2013). Märksa keerulisemad on detsiidua moodustamise regulatsiooni järgmised etapid, raseduse varastes faasides (munaraku viljastumisest kuni blastotsüsti implantatsioonini). On tõestatud, et selles mängivad olulist rolli mikro-RNAd, millest tuleb eriti esile tõsta miR-181a, mis kuulub miR181 perekonda (Zhang jt., 2015). Käesolevaks hetkeks on leitud, et selle mikro-RNade perekonna esindajad on rakkude dififferentseerimise olulised regulaatorid. Emapoolses platsenta koes ehk detsiiduas tekivad platsenta vaheseinad, mis jagavad platsenta osadeks, mida nimetatakse platsenta sagarikeks, mille koosseisu kuuluvad koorioni hatud, mida platsenta vaheseinad üksteistest eraldavad. Inimese platsenta koosneb 15-20 sagarikust. Emapoolsed veresoone tungivad sagarikeni, kusjuures nende hattudevaheline ruum on ema verega täidetud (Gruenwald, 1977). Sellise ehitusega platsenta esineb inimesel, kõrgematel primaatidel ja närilistel. Sellist platsentat, kus ema veri on vahetult kontaktis loote rakkudega ehk trofoblastidega nimetatakse hemokoriaalseks (Rossant ja Cross, 2001). Vaatamata sellele, et näriliste platsenta on oma histoloogilise ehituse poolsest samuti hemokoriaalne, erineb see väga palju inimese ja primaatide platsentast ning ei sobi eriti inimese platsenta uurimismudeliks. Platsenta hattude trofoblastid moodustavad ema vereringe ja loote vereringe vahel platsentaarse barjääri (Joonis 1B), mis koosneb kolmest rakukihist (endoteel, tsütotrofoblastid, sünsüüsiotrofoblastid) ja kahest basaalmembraanist (loode veresoone ja trofoblastide basaalmembraan). Kogu toitainete transport (glükooos,

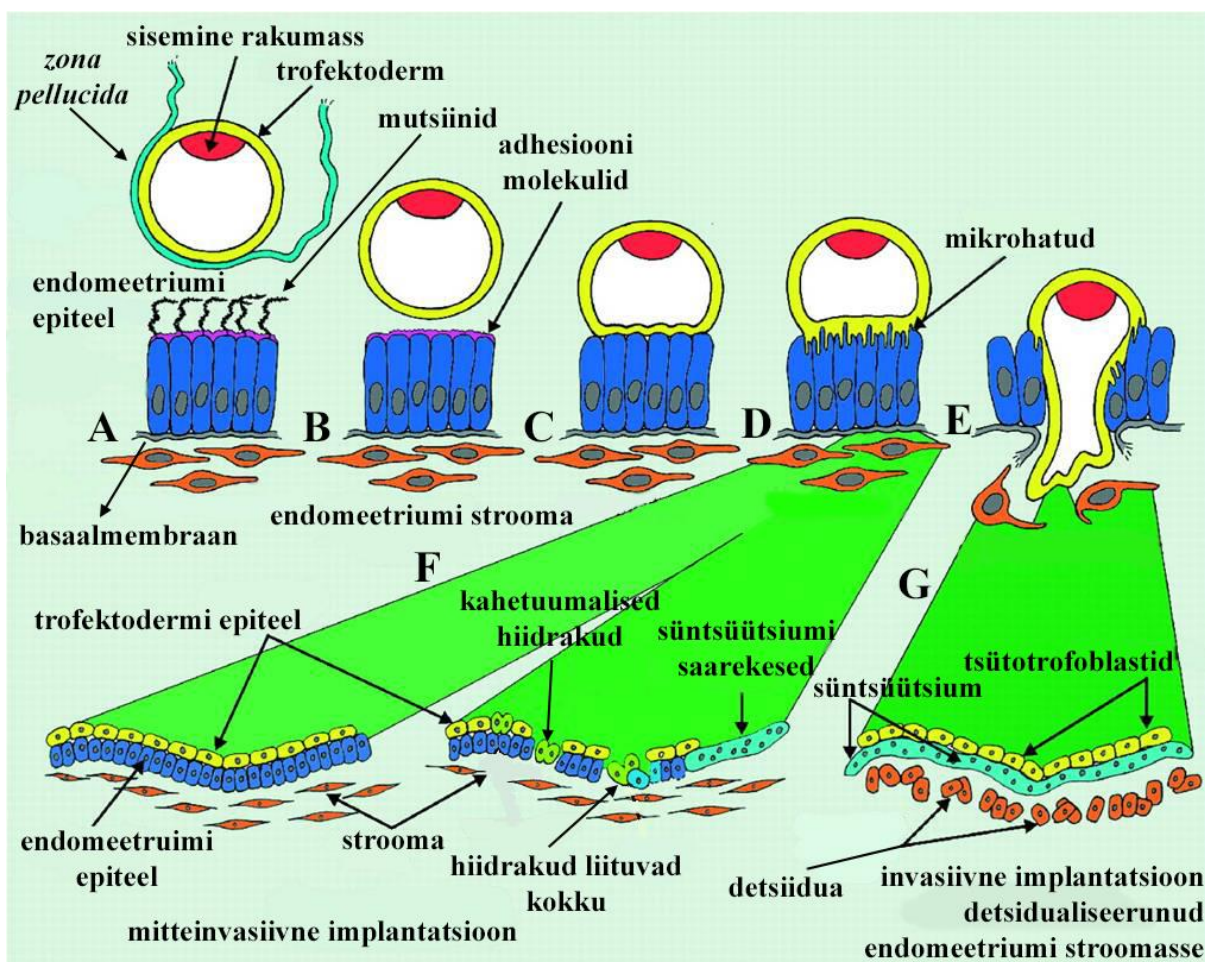


aminohapped, rasvhapped jne.), gaaside difusioon (O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>) ja ainevahetuse laguproduktide transport (näiteks urea) toimub läbi platsentaarse barjääri. Toitainete transpordi mehhanismid on väga erinevad (esineb nii aktiivne kui ka passiivne transport) ja väga intensiivsed, sest kasvava loode ainevahetus on väga aktiivne (Elad jt., 2013). Platsentaarne barjäär toimib ka loote kaitsevööndina, sest ühest küljest kaitseb ta loodet ema immuunvastuse ülereageerimise eest ning teisest küljest on trofoblastidel patogeene mahasuruvad omadused. Hiljuti näidati, et trofoblastid ekspresseerivad spetsiifilisi mi-RNAsid, mis on viirusi supresseerivate omadustega. Need mi-RNA-de kuuluvad primaaride platsentale omasesse C19MC klastrisse. Näidati, et miR-517b aktiveerib rakkudes autofaagia radasid, mis on viirustele kahjulik, sest neid hakatakse aktiivselt hävitama rakkude autofagosoomides. Samuti on tõestatud, et seda miRNA-d transporditakse eksosoomide kaudu ka teistesse rakkudesse, kus see toimib sarnaste mehhanismide kaudu (Delorme-Axford jt., 2013; Mouillet jt., 2014). Lisaks sellele, et platsenta varustab loodet toitainetega, kaitseb teda ja kinnitab ta emaka seinale, talitleb ta ka kui ajutine endokriinne organ. Platsenta toodab koorioni gonadotropiini (hCG), mida võib ema verest tuvastada juba raseduse esimestest päevadest alates. Selle hormooni sekretsioon kasvab raseduse 10-11 nädalaks tuhandeid kordi ning hakkab hiljem langema. hCG stimuleerib teiste emaorganismi suguhormoonide tootmist ning selle toimel säilitatakse munasarjas kollaskeha kogu raseduse vältel. Tavalises olukorras kollaskeha degenerereerub umbes kahe nädalaga menstruaaltsükli käigus (Fournier jt., 2015). Platsental on ka teine hormoonidega seotud funktsioon. Nimelt platsenta kaitseb loodet ema stressihormooni, kortisooli mõju eest. Platsenta trofoblastid sisaldavad suurel hulgal ensüümi (11-β hüdroksüsteroidide dehüdrogenaas tüüp 2), mis konverteerib aktiivse kortisooli inaktiivseks kortisooniks. Selle hormooni kaudu osaleb platsenta loote hüpotalamus-hüpopüüü-neerupealise telje arengus (Cottrell ja Seckl, 2009).

### **1.1.2 Platsenta areng**

Pärast munaraku viljastumist munajuha ülaosas ehk ampulaarosas, transporditakse see ripsepiteeli abil munajuhast välja. Munajuhas liikuv viljastatud munarakk ehk sügoot hakkab lõigustuma ning areneb moorulaks ning kui esimesed rakud hakkavad diferentseeruma, siis tekib blastotsüst. Inimesel toimub blastotsüsti moodustumine viiendal päeval pärast viljastumist. Selleks ajaks väljub blastotsüst munajuhast emakasse ning vabaneb oma kestast, mida nimetatakse *zona pellucida*-ks (Joonis 2A). Kuuendaks raseduspäevaks peab blastotsüst seostuma emakaseina endomeetriumi, et kinnituda emakale ja toimuks embrüo implantatsioon. Seda lühikest ajalist perioodi nimetatakse implantatsiooni aknaks. Endomeetriumi võimet seostuda blastotsüsti trofektodermiga nimetatakse endomeetriumi

retseptiivsuseks. Endomeetriumi retseptiivsus on reguleeritud paljude molekulaarsete tegurite poolt, kusjuures eriti olulised on erinevad endomeetriumi epiteeli pinnamolekulid. Näiteks toimuvad mutsiinide (MUC) ekspressiooni muustris olulised muutused. On leitud, et retseptiivse ja mitteretseptiivse endomeetriumi puhul toimuvad muutused mutsiinide ekspressioonis või ümberlülitus erinevate mutsiinide vahel. Need muutused ei ole siiski universaalsed kõikide platsentaarsete imetajate puhul ning esinevad liigilised erinevused. Näiteks toimub hiirtel MUC-1 ekspressiooni maha surumine, samas kui inimese implantatsiooni käigus sellist efekti pole täheldatud (Carson jt., 2000).



**Joonis 2. Blastotsüsti implanteerumise staadiumid ja platsenta invasioonitüübi variandid.** A – *zona pellucida* eemaldumine blastotsüstist, B – blastotsüsti pöörduv eelkontakteerimine endomeetriumi epiteeliga, C – apositsioon, D – adhesioon, E – invasioon endomeetriumi epiteelisse, F – mitteinvasiivse implantatsiooni üldskeem, G – invasiivse implantatsiooni üldskeem. Muudatustega Bazer jt. (2009) järgi.

Blastotsüst seostub oma trofektodermi kaudu retseptiivse endomeetriumi pinnaga. Selle etapi käigus eelkontakteerub embrüo endomeetriumi rakkudega (Joonis 2B). Siinkohal on oluline mainida, et selles faasis toimuv kinnitumine on pöörduv ning rakkudevahelised seosed on

suhteliselt nõrgad. Implantatsiooni käigus hakkavad endomeetriumi rakud ekspresseerima oma pinnal erinevaid adhesioonimolekule nagu näiteks integriinid. Implantatsiooni akna perioodil on eriti olulised endomeetriumi rakkudel ekspresseeruvad integriinid  $\alpha_1\beta_1$ ,  $\alpha_4\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_3$ , mis on fibronektiini, trombospondiin, von Willebrandi faktori ja L-selektiini retseptorid (Bazer jt., 2009). Implantatsiooni akna ajaline toimumine on reguleeritud munasarjade steroidhormoonide poolt (Achache ja Revel, 2006). Endomeetriumi epiteelile nõrgalt kinnitunud blastotsüst läbib apositsiooni staadiumi (Joonis 3C), mille käigus määratakse embrüo tulevane asend enne implantatsiooni. Sellel etapil on blastotsüst veel võimeline liikuma endomeetriumi pinnal, kuna sellele kinnitumine on veel pöörduv. Mehhanismid, mis tagavad blastotsüsti sellist tüüpi liikumise on saranased protsessidele, mis võimaldavad leukotsüütidel transmigreeruda läbi veresoonte seinte. Näiteks lümfotsüüdid kinnituvad endoteeli pinnale VCAM-1 retseptorite abil ning migreeruvad sellel. On näidatud, et mõlemate protsesside puhul osalevad samad aktivatsioonirajad. Uuringud on näidanud, et implantatsiooni ja leukotsüütide transmigreerumise häirete tekkel on samad geneetilised põhjused (Dominguez jt., 2005). Veel enam, trofektodermi diferentseerumise käigus trofoblastideks tõuseb nendes rakkudes leukotsüütide transmigreerimise rajaga seotud geenide ekspressioon (Aronow jt., 2001). Pärast apositsiooni järgneb adhesiooni staadium (Joonis 2D). Blastotsüsti adhesioon on pöördumatu protsess, sest et blastotsüst ei ole võimeline endomeetriumi epiteeli pinnal enam liikuma. Trofektodermi rakud seostuvad endomeetriumi epiteeli mikrohattudega, mida nimetatakse ka pinopoodideks. Pinopoodide teket peetakse retseptiivse endomeetriumi oluliseks mikromorfoloogiliseks tunnuseks, kuid mille funktsioonidest ja molekulaarse toimimise mehhanismidest on väga vähe teada (Achache ja Revel, 2006). Kui on toimunud blastotsüsti kinnitumine endomeetriumi epiteeli pinnale, siis sõltuvalt imetajaliigist võib edasine platsenta areng toimuda erineval viisil. Üheks viisiks on mitteinvasiivne implantatsioon, mis esineb näiteks mäletsajatel loomadel (Joonis 2F). Sellist tüüpi platsenta puhul jääb endomeetriumi epiteel suhteliseks intaktseks ning ei toimu trofoblastide massivset tungimist endomeetriumi stroomasse. Trofektodermi rakkude diferentseerumise tagajärjel tekivad spetsialiseerunud kahetuunalised hiidrakud, mille liitumise tagajärjel moodustuvad süntsütsiaalsed struktuurid. Sellist tüüpi süntsütsiimi saarekesed paiknevad platsentas difuuselt (Bazer jt., 2009). Sellest erinev on olukord invasiivse platsenta tekke puhul, mis esineb inimahvidel ja inimesel (Joonis 2G). Nendel hakkab trofektoderm diferentseeruma erinevateks trofoblastide tüüpideks, mis lagundavad endomeetriumi epiteeli basaalmembraani ja tungivad detsidualiseerunud endomeetriumi stroomasse. Trofoblastide invasiooni käigus tekivad neil kasvajarakkudele sarnased omadused, nagu näiteks maatriksmetallaproteaaside (MMP) üleekspressioon. Üldiselt on

trofoblastide invasiooni etapp väga suurel määral seotud ETM-ga ja seda moduleerivate ensüümidega. Nagu juba mainitud, võib siin näha paralleele kasvajate arengu ja trofoblastide invasiooni vahel. Selleks, et rakud jõuaksid endomeetriumi stroomasse, vajavad nad proteolüütiliste ensüümide osalust. Sellest aspektist on kõige rohkem uuritud MMP-2 ja MMP-9, mis on võimelised lagundama erinevaid kollageenide tüüpe ja laminiine (Bauvois, 2012). On näidatud, et implantatsiooni etapis tõuseb nende ensüümide ekspressiooni tase (Clark jt., 2013). Nende ensüümide ekspressiooni reguleeritakse nii hormonaalsel tasandil progesterooni mõjul (Halasz ja Szekeres-Bartho, 2013), kui ka lokaalselt miRNA-de abil (Ding jt., 2015). Endomeetriumi sisse tunginud trofoblastidest hakkavad arenema platsenta hatud mis, koosnevad kahest trofoblastide kihist. Hatud on kaetud sisemise tsütotrofoblastide ja välimise süntsütsiaalsete trofoblastide kihiga, mis tekib tsütotrofoblastide ühinemise käigus (Ishikawa jt., 2014).

Detsidualiseerunud endomeetriumi stroomas toimub invasiooni etapis palju muutusi, milleks on näiteks uute veresoonte teke ehk angiogenees. Suurt hulka veresooni on vaja selleks, et suunata ema verd trofoblastide hattudevahelisse ruumi. Angiogeneesi stimuleerib arenev platsenta, sekreteerides angiogeneetilisi faktoreid, nagu näiteks VEGF-1 (Plaisier, 2011). Kui platsenta arengu jooksul tekib angiogeneesi häireid, siis see tõstab märgatavalt võimalike tüsistuste sagedust raseduse vältel. Üks sellistest väga tõsistest komplikatsioonidest on näiteks preeklampsia (Liu jt., 2015). Detsiiduas tekkinud uusi veresooni modifitseeritatakse nende trofoblastide poolt, mis tungivad sügavamale endomeetriumi stroomasse ja müomeetriumi piirideni. Pärast seda kui trofoblastid puutuvad kokku detsiidua spiraalarteritega, muudavad need oma mikroanatomilisi ja endoteliaalseid omadusi ning hakkavad oma struktuuri ja ehituse poolest sarnanema rohkem veenidele (Lima jt., 2014). Lisaks implantatsiooni käigus toimuvale aktiivsele angiogeneesile ja veresoonte moduleerimisele detsiiduas, toimuvad muutused ka ETM-i koostises. Näiteks tõuseb kollageen tüüp IV ekspressioon ning histoloogiliselt on näidatud, et detsiidua ETM rikastub selle kollageeni osas (Oefner jt., 2015).

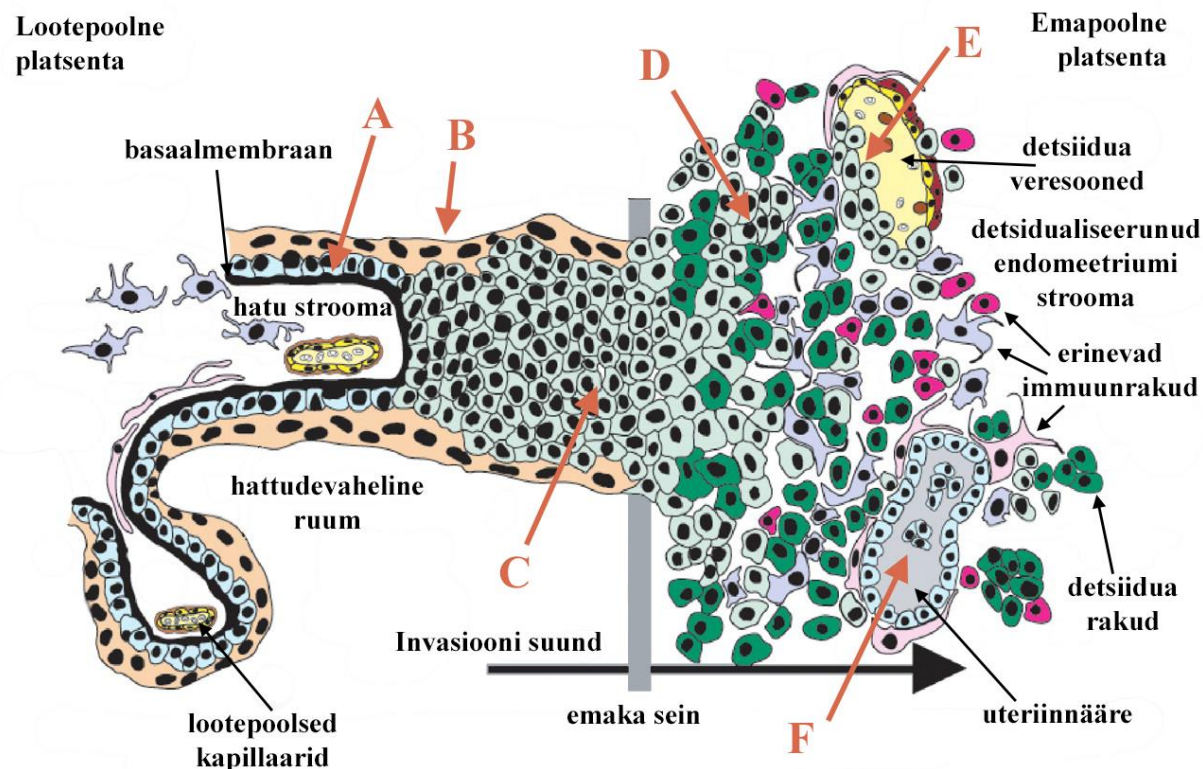
Blastotsüsti implanteerumise käigus ja platsenta varasemas arengus mängib väga olulist rolli ka emapoolne immuunsüsteem. Kuna trofoblastid tungivad väga sügavalt emaka koesse ja ulatuvad isegi müomeetriumis, siis on emapoolne immuunsüsteem teadnud määral supresseeritud, et ei tekiks loote suhtes liiga tugevat emapoolset immuunvastust. Teisalt on näidatud, et mõõdukas põletikuline reaktsioon detsiiduas isegi soodustab implantatsiooni. Arvatakse, et eriti olulist rolli mängivad siin dendriittrakud, mis suurel arvul migreeruvad endomeetriumi stroomasse (Gnainsky jt., 2010). Platsenta areng on tihedalt seotud paljude tüsistustega, mis võivad tekkida hoopis hilisemal rasedusperioodil. On näidatud olulist seost

preeklampsia tekke ning detsidua angiogeneesi ja veresoonte moduleerimise vahel. Samuti arvatakse, et rasedusega kaasnevad immunsüsteemi häireid on üheks spontaansete abortide oluliseks põhjuseks. Teiselt pool, kui emapoolne immuunsüsteem on üle määra allasurutud ning trofoblastide invasiivsus väljaub kontrolli alt, siis on suur oht, et võivad tekkida koorionikasvajad. Kui platsenta areng läheb valesti ja invasiooniga seotud rajad on üleaktiveerunud või emapoolne immuunsüsteem on liigselt allasurutud, siis võib see viia ka mitmete teiste raseduse probleemideni. Trofoblastid võivad näiteks tungida liialt sügavale emaka müomeetriummisse (*Placenta increta*) või isegi läbi emaka kõhuõõnde (*Placenta percreta*) (Fitzpatrick jt., 2013). Platsenta arengus kõikide etappide vältel on väga oluline rakkudevaheline kommunikatsioon. Nagu eespool märgitud, areneb platsenta nii emapoolsetest kui ka lootepoolsetest rakkudest, mis teeb olukorra veelgi keerulisemaks. Platsenta arengu käigus toimuva üldise endokriinse regulatsiooni juures on väga olulised parakriinsed faktorid ja jukstakriinsed ehk rakk-rakk kontaktid. Selle protsessi käigus toimuvad muutused ETM-i koostises ja rakkude retseptorite (näiteks integriinide) ekspressioonis. Viimasel ajal on üha rohkem hakatud uurima rakkude poolt sekreteeritavate mikropartiklite (eksosoomid ja mikrovesiikulid) rolli rakkudevahelises suhtluses platsenta erinevates arenguetappides ning seda nii normaalse tallitluse käigus kui ka patoloogiate puhul.

### **1.1.3 Trofoblastid**

Platsenta lootepoolse komponendi moodustavad trofoblastid, mis mängivad põhilist rolli platsenta väljakujunemises ja selle hilisemas funktsioneerimises. Nimelt sõltub blastotsüsti implanteerumine ja loote kinnitumine emaka seinale suurel määral trofoblastidest. Lisaks sellele moduleerivad trofoblastid veresoonte teket, reguleerivad platsenta endokriinseid omadusi ja seostuvad emapoolsete immuunsüsteemi rakkudega (Lunghi jt., 2007). Kui tegemist on väljaarenenud platsentaga, siis moodustavad trofoblastid platsentaarse barjääri, mida kirjeldasime eespool. Trofoblastid tekivad blastotsüsti trofektodermi diferentseerumise käigus. Hiirte puhul on tuvastatud, et trofoblastid diferentseeruvad sellest trofektodermi osast, mis ei ole kontaktis sisemise rakumassiga. Trofoblastide edasises diferentseerumises osalevad sellised transkriptsioonifaktorid nagu CDX2, GATA-3, TEAD4 (Knott ja Paul, 2014). Pärast blastotsüsti implantatsiooni hakkavad kohe arenema platsenta hatud. Inimese platsenta hatud on kaetud kahe trofoblastide kihtidega. Sisemise kihi rakke nimetatakse tsütotrofoblastideks (Joonis 3A), mis on kontaktis hattude basaalmembraaniga, mis jääb trofoblastide ja hattude strooma vahele. Need trofoblastid jagunevad aktiivselt, kuigi nende

hulk raseduse käigus pidevalt väheneb. Arvatakse, et need rakud on platsenta teiste trofoblastitüüpide jaoks kui somaatilised tüvirakud (Baczyk jt., 2006).



**Joonis 3. Erinevate hattude koosseisu kuuluvate ja hattudeväliste trofoblastide tüübid inimese platsentas.** A – paljunemisvõimelised tsütotrofoblastid, B – süntsüüsiotrofoblastide kiht, C – invasiivsete tsütotrofoblastide samm, D – interstitsiaalsed trofoblastid, E – endovaskulaarsed trofoblastid, F – endoglandulaarsed trofoblastid. Muudatustega Zhou jt. (1997) järgi.

Tsütotrofoblastide pinnal asuvat trofoblastide kihti nimetatakse süntsüüsiotrofoblastideks. Need trofoblastid moodustavad pideva paljutumise struktuuri, mis voorderab kõiki platsenta hatte (Joonis 3B). Süntsüüsiüm tekib tsütotrofoblastide omavahelise kokkuliitumise tagajärjel ning selle moodustise sees rakutumad ei jagune. Olulist rolli tsütotrofoblastide ühinemisel süntsüüsiümiks mängib valk süntsitiin, mille kohta arvatakse, et see on imetajate genoomis retroviraalse päritoluga (Lokossou jt., 2014). Süntsüüsiotrofoblastide peamine roll on platsentaarse barjääri tekitamine, selleks et emapoolsed vererakud ei saaks tungida lootepoolsele alale. Raseduse ajal tsirkuleerib ema vereringes loote DNA, mille peamiseks allikaks ongi süntsüüsiotrofoblastid (Taglauer jt., 2014). Lisaks eelnimetatutele on olemas veel teised trofoblastide tüübid, mida üldiselt nimetatakse hattudevälisteks trofoblastideks. See nimetus tuleneb platsenta teatud tüüpi hattude ehitusest, mida nimetatakse ankurhattudeks. Nene hattude tipmises osas asub rakupopulatsioon, mida nimetatakse

trofoblastide rakkusambaks (Joonis 3C). Rakkusammas ulatub sügavale detsiiduasse ja sellest saavad alguse invasiivset tüüpi trofoblastid, mis tungivad endomeetriumi detsidualiseerunud stroomasse ning vähemal määral mõjutavad ka emaka sügavamalt asetsevat müomeetriumi ehk lihaskihti. Invasiivsete trofoblastide sammas tekib tsütotrofoblastide jagunemise ja diferentseerumise käigus. On näidatud, et kui hattudevälised trofoblastid omandavad invasiivse fenotüübi, siis toimuvad muutused ka nende pinnaretseptorite koosseisus. Hattudevälistel trofoblastidel hakkavad ekspresseeruma spetsiifilised koosobivusantigeenid HLA-G-d ning toimub erinevate integriinide ekspressiooni ümberlülitamine. Näiteks  $\alpha 5 \beta 1$  integriini (fibronektiini retseptor) asemel ekspresseerub hattudeväliste trofoblastide pinnal  $\alpha 1 \beta 1$  integriin (kollageeni ja laminiini retseptor), mis soodustab rakkude migreerumist detsiiduasse (Baczyk jt., 2006). Neid trofoblaste, mis on liikunud detsidualiseerunud endomeetriumi sisse, nimetatakse interstitsiaalseteks trofoblastideks (Joonis 3D). Arvatakse, et interstitsiaalsete trofoblastide üldine diferentseerumise suund on Notch signaali ülekanderaja kontrolli all (Haider jt., 2014). Mõned sellist tüüpi trofoblastid osalevad emaka veresoonte moduleerimises ning neid nimetatakse sel juhul endovaskulaarseteks trofoblastideks (Joonis 3E). Neid trofoblaste iseloomustab erinevate proteaaside väga kõrge ekspressiooni tase. Siinkohal tuleb märkida, et olulisemad neist on MMP-2, MMP-9, urokinaasi plasminogeeni aktivaator, disintegrin ja ADAM tüüpi membraanseoselised metalloproteasid (Haider jt., 2014; Pollheimer jt., 2014). Endovaskulaarsed trofoblastid moduleerivad spiraalartereid, mis juhtivad verd detsiduasse ja hiljem hattudevahelise ruumi. Arterite moduleerimise käigus nende basaalmembraan suures osas laguneb ning kujunenud veresooned meenutavad oma ehituse poolest pigem veene kui artereid. Selle protsessi käigus suunatakse osa arterite endoteelirakkudest apoptoosi ning neid asendavad endovaskulaarsed trofoblastid (Zhou jt., 1997). Selline detsiidua veresoonte moduleerimine endovaskulaarsete trofoblastide poolt tagab raseduse ajal parema verevarustuse. Mõned trofoblastid, mida nimetatakse endoglandulaarseteks, tungivad emaka uteriinnäärmetesse (Joonis 3F). Nende täpne funktsioon on ebaselge. On spekuleeritud, et nad võivad osaliselt avada uteriinnäärmeid, selleks et näärmete sekreet jõuaks hattudevahelisse ruumi, aga vähemalt inimese puhul ei ole see siiani tõestatud (Moser jt., 2011). Samas selliste trofoblastide kooskultiveerimiseks uteriinnäärmetest kasvatatud rakkudega on näidanud, et trofoblastid võivad migreeruda uteriinnäärmetesse ning osaliselt lagundavad neid invasiooni käigus (Moser et al., 2010).

## 1.2 Rakkude poolt sekreteeritavad mikroosakesed

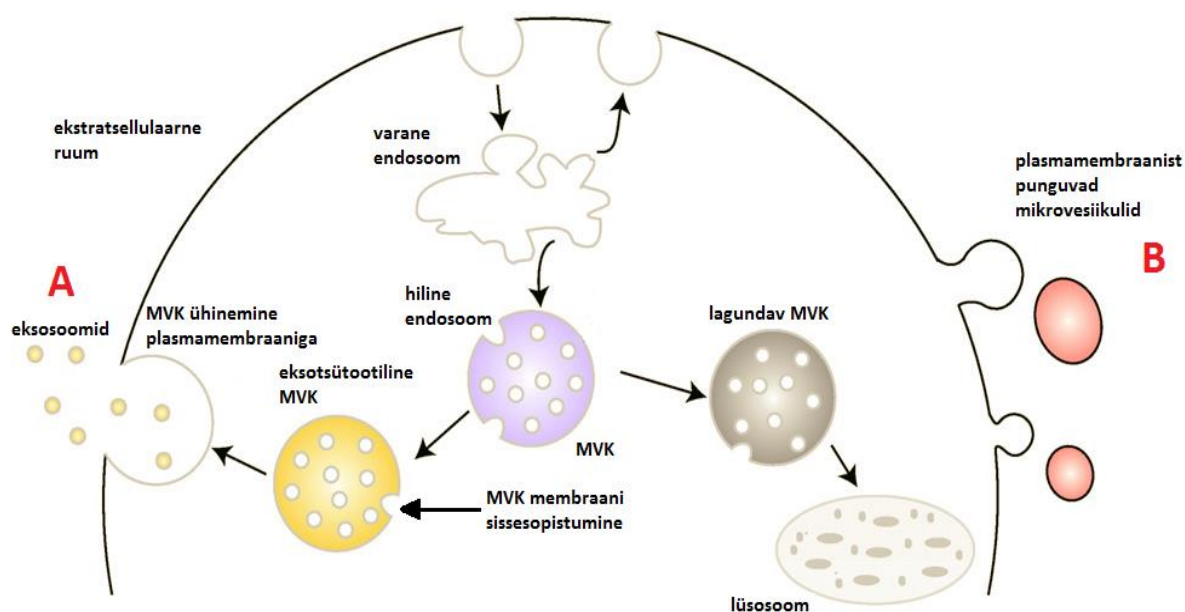
Mikroosakesteks nimetatakse väikseid vesikulaarseid struktuure, mida rakud sekreteerivad väliskeskkonda. Nendest põhilise osa moodustavad eksosoomid ja mikrovesiikulid, kuid rakud eraldavad veel ka apoptootilisi ja sünaptilisi vesiikuleid. Apoptootilised vesiikulid tekivad raku programmeeritud surma tagajärjel. Sünaptilised vesiikulid transpordivad närvirakkude poolt sekreteeritud neuromediaatoreid keemilistes sünapsites. Hulkraksetes organismides peavad erinevatest kudedest päritolevad rakud vahetama omavahel informatsiooni, selleks, et organismi talitus oleks kooskõlastatud. Selleks on mitmeid erinevaid viise. Klassikaliselt võime eristada rakkudevahelisi mehhaanilisi kontakte ehk jukstakriinset signaali ülekannet, sünaptilist signaali ülekannet ning endokriinset ja parakriinset signaliseerimist. Viimastel aastatel on selgunud, et mikroosakestel on suur roll rakkudevahelises suhtluses. Väga oluline on eksosoomide ja mikrovesiikulite omavaheline eristamine, sest neil on erinevad tekkemehhanismid ja ka markervalgud.

### 1.2.1 Eksosoomide ja mikrovesiikulite biogeneesi rajad ning funktsioonid

Eksosoomid on väikesed (diameeter 50–100 nm) lipiidse kaksikkihiga ümbritsetud vesiikulid, mis avastati 1983. aastal erütrotsüütide eellasrakkude, retikulotsüütide, koekultuurist. Rakud sekreteerivad eksosoomi kahel viisil: a) konstitutiivselt ehk reguleerimata, pideva eraldumise teel või b) reguleeritult, so raku aktivatsiooni korral mõne signaalmolekuli toimetel. On teada, et *in vitro* tingimustes sekreteerivad paljud rakutüübid (vereliistakud, soole epiteeli rakud, adipotsüüdid ehk rasvakoe rakud, fibroblastid, paljud kasvajate rakuliinid) eksosoomi rakkude kasvukeskkonda või puhvrise. Eksosoomi on leitud ka paljude organismide erinevates bioloogilistes vedelikes (uriinis, süljes, piimas). Eriti palju on eksosoomi vereseerumis. Organismis ringlevad eksosoomid osalevad rakkudevahelises suhtluses ja reguleerivad paljusid füsioloogilisi protsesse. Sõltuvalt koest või rakutüübist, kust eksosoomid pärinevad, erinevad ka nende funktsioonid. Nad on seotud selliste protsessidega, nagu apoptoos, angiogenees, vere hüübimine (Mathivanan jt., 2010). Eksosoomid on pärit endosoomidest, erinedes seega teistest mikroosakestest (Joonis 4A). Rakkude tsütoplasmas paiknevad suured multivesikulaarsed kehad, mille membraani sissesopistumise korral liigub nendesse osa tsütosoolist pärit materjali. Multivesikulaarse keha membraan ümbritseb tsütosoolist eraldunud materjali, mille tagajärjel tekivad väiksed vesiikulid (eksosoomid), mis lõpuks eraldununa multivesikulaarse keha membraanist liiguvad selle sisse. Hiljem võivad ESKRT kompleksi (endosoomi sorteeriv kompleks, mis suunab transporti; *ingl.k. endosomal sorting complex required for transport, ESCRT*) valgud suunata multivesikulaarse keha kas lüsoosumi, kus toimub valkude lagundamine või siis plasmamembraani suunas (Colombo jt.,



2013). Kui multivesikulaarne keha suunatakse ühinemisele lüsoosomiga, siis teda nimetatakse lagundavaks kehaks, milles olevatele valkudele lisatakse ubikvitiin. Eksotsütootilised multivesikulaarsed kehad ühinevad plasmamembraaniga, mille käigus kaks membraani ühinevad ning tekkinud avause kaudu saab võimalikuks eksosoomide eraldumine rakuvälisesse keskkonda. Kõigist mikroosakestest on ainult eksosoomid endosomaatilise päritoluga (Mathivanan jt., 2010). Eksosoomide membraanis on spetsiifilised markervalgud, mis on tegelikult endosomaatilise päritoluga. Nende hulka kuuluvad valkude membraani transportimisel ja membraanide ühinemises osalevad valgud: GTPaasid, anneksiinid ning tetraspaniinid (CD9, CD63, CD81 ja CD82). Eksosoomide üldtunnustatud markeriks peetakse tetraspaniinide hulka kuuluvat transmembraanset valku CD63, mida kasutatakse eksosoomide tuvastamiseks ja väljapuhastamiseks (Oksvold jt., 2015). Eksosoomid sisaldavad sageli ka erinevaid mRNAsid ja miRNAsid (Vlassov jt., 2012). Eksosoomide pinnal on tuvastatud erinevad MMP-d, mis võimaldab neil osaleda ETM-i lagundamises. On näidatud, et kasvajate puhul soodustab ja suunab selline maatriksi remodelleerimine rakkude migreerumist (Thuma ja Zöller, 2014). Eksosoomide sissevõtmisel retsipientrakkude poolt võib muutuda nende geeniekspressioon ning koos sellega ka erinevad rakus toimuvad füsioloogilised protsessid (Nishida-Aoki ja Ochiya, 2015).



**Joonis 4. Eksosoomide ja mikrovesiikulite päritolu.** A – eksosoomide tekkerada (MVK – multivesikulaarne keha), B – mikrovesiikulite tekkerada. Muudatustega (Mathivanan jt., 2010) järgi.

Mikrovesiikulid (diameeter 0,1–1 µm) on suuremad kui eksosoomid. Mikrovesiikulite tekkerada on täiesti erinev eksoomide omast, sest nad tekivad rakumembraani väljasopistumise tagajärjel (Joonis 4B). Rakumembraan koosneb fosfolipiidide kaksikkihist, kusjuures normaalses füsioloogilistes tingimustes on fosfolipiidide paiknemine membraanis ebasümmeetriline. Fosfaatidüülkoliin ja sfingomüeliin paiknevad põhiliselt plasmamembraani välimises kihis, samal ajal kui aminofosfolipiidid ja fosfatidüületanolamiin kuuluvad põhiliselt sisemise kihi koosseisu (Morel jt., 2011). Sellise ebasümmeetria säilitamine on raku jaoks väga oluline ning selle tagavad spetsiaalsed ensüümid. Kõige enam on nendest tuntud flipaasid, mis tagavad niinimetatud *flip-flop* liikumise ehk lipiidi molekuli ümberpaiknemise ühest kihist teise (Inal jt., 2012). Raku aktiveerumisel ja apoptoosi signaaliraja käivitumisel fosfolipiidide paiknemine plasmamembraanis muutub. Ca<sup>2+</sup> ionide mõjul toimub rakumembraani läheduses tsütoskeleti moodustavate aktiini filamentide ümberkorraldumine, mille tagajärjel nendes kohtades rakumembraani side tsütoskeletiga kaob. Selle tagajärjel hakkab membraan välja punguma ning selle sisse voolab tsütoplasma koos valkude, mRNA, ja miRNA-dega. Hiljuti leiti, et mikrovesiikulite membraani või sisekeskkonda suunatavaid valke sorteeritakse teatud määral, kuid selleks, et sorteerimise protsessi täpselt mõista, on saadud andmed veel väga esialgsed (Clancy jt., 2015). Väljakujunenud mikrovesiikul eraldub lõpuks raku pinnalt. Erinevalt eksosoomidest pole mikrovesiikulite puhul leitud üldtunnustatud pinnamarkerit. Põhiline põhjus on selles, et mikrovesiikulite membraani koosseisu jäävad need pinnamolekulid, mis olid rakkude pinnal, millest mikrovesiikul välja pungus ning seega erinevatest rakkudest pärit mikrovesiikulitel on ka erinevad pinnamarkerid. Teisest küljest annab see võimaluse tuvastada mikrovesiikulite segust nende teatud kindlat populatsiooni. Näiteks vereseerum sisaldab väga paljudest rakkudest päritolevaid mikrovesiikuleid, kuid teatud pinnamarkerite kaudu on teoreetiliselt võimalik neid eristada ja kasutada markerina erinevate haiguste uurimisel (Revenfeld jt., 2014). On näidatud, et mikrovesiikulid nagu eksosoomidki võivad sisaldada miRNAsid (Hunter jt., 2008). Tegelikult võib mikrovesiikuleid pidada informatsiooni edasikandjateks erinevate kudede vahel (Montoro-Garcia jt., 2011).

### **1.2.2 Mikroosakesed raseduse ja platsenta arengu ning talitluse kontekstis**

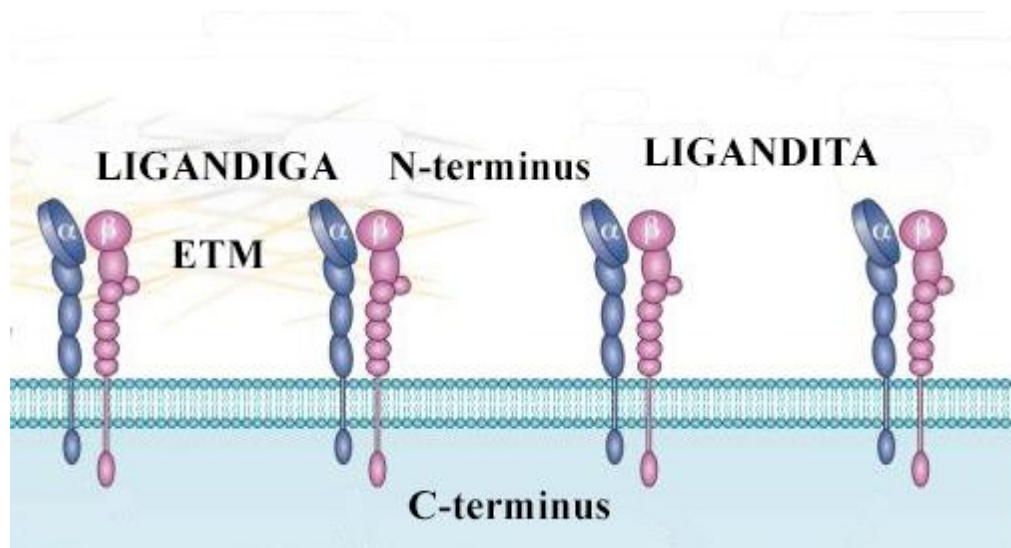
Nii eksosoomid, kui ka mikrovesiikulid mängivad olulist rolli rasedusega seotud protsessides. Lootepoolseid eksosoomide ja mikrovesiikuleid on leitud tsirkuleerimas ema vereringes, kuhu nad satuvad platsentast. Esimese trimestri platsenta sekreteerib rohkesti eksosoomide, mille hulk ema vereringes kasvab sel perioodil pidevalt (Sarker jt., 2014). Käesoleval ajal otsitakse võimalusi kuidas neid kasutada biomarkeritena raseduse kulgemise jälgimiseks ja võimalike

tüsistuste prognoosimiseks (Salomon jt., 2014). Nagu öeldud, on emapoolses vereringes ka mikrovesiikulid tuvastatavad. Ema veres tsirkuleerivad loote mikrovesiikulid enamuses pärit süntsüütsiotrofoblastidest. On leitud, et mikrovesiikulite hulga tõus ema veres on seotud sellise raseduse tüsistusega nagu preeklampsia (Dragovic jt., 2013; Redman ja Sargent, 2008). On esitatud hüpotees, mille järgi mikrovesiikulid mõjutavad ema organismi veresoonte endoteeli, aga selle toime täpsemad mehhanismid pole veel selged (Göhner jt., 2015). Samuti on näidatud, et süntsüütsiotrofoblastidest pärit mikrovesiikulid võivad mõjutada immuunsüsteemi, mis võiks toimuda T-lümfotsüütide kaudu. Ühelt pool võivad nad stimuleerida immuunsüsteemi aktiveerumist, teiselt poolt võib neil olla aga hoopis immuunsust mahasuruv toime (Redman ja Sargent, 2007). Mikroosakesed on olulised ka platsentasiseste protsesside reguleerimisel ja informatsiooni ülekandes. Platsenta on kahekomponendiline organ, mis koosneb nii lootepoolsetest rakkudest kui ka ema organismist pärit rakkudest, mis tähendab, et tema arengus osalevad paljud erinevat tüüpi rakud. Selle tõttu on ka platsenta rakkude poolt sekreteeritud mikroosakesed väga erineva päritoluga. Näiteks hattudevälistest trofoblastidest pärit eksosoomid mängivad olulist rolli spiraalarterite modifitseerimisel detsiiduas (Salomon jt., 2014). Hiljuti leiti, et eksosoomid transpordivad erinevaid miRNA-sid erinevate platsenta koosseisu kuuluvate rakutüüpide vahel (Ouyang jt., 2014). Platsentas toimuvate füsioloogiliste protsesside seisukohast on mikrovesiikulite kohta palju vähem teada kui eksosoomide kohta kuid neid seostatakse platsenta hemostaasi kujunemisega selle arengu erinevatel etappidel (Aharon ja Brenner, 2009). Võib öelda, et mikrovesiikulite osa platsenta arengus on veel täiesti ebaselge ning see vajab veel põhjalikku uurimist nii rakulisel kui ka molekulaarsel tasandil.

### **1.3 Integriinid**

Integriinid on põhilised paljurarakuliste loomorganismide (*Metazoa*) retseptorite perekond, mis tunnevad ära erinevaid ekstratsellulaarse maatriksi komponente. Prokariootidel, taimedel ja seentel integriinide homolooge pole leitud. Integriinid avastati 1987 aastal (Hynes, 1987). Neid retseptoreid on väga põhjalikult uuritud. Integriinid on väga olulised rakkude migratsiooni ja invasiooni puhul aga ka nende jagunemise kontrolli reguleerimises. Rakud seostuvad läbi integriinide ekstratsellulaarse maatriksi valkudega ja saavad sealt signaale, mis määravad nende edasise saatuse. Nad kas jäävad paigale ja tekitavad substraadiga tugevaid fokaalkontaakte või hoopis alustavad migreerumist rakuvälise maatriksi peal. Aktiivsed integriinid on heterodimeersed, mis tähendab et koosnevad kahest erinevast valgumolekulist, ühest  $\alpha$  ahelast ja ühest  $\beta$  ahelast. Raku pinnal leidub ka üksikuid integriine alaühikuid, aga nende toimet klassikaliste retseptoritena pole täheldatud. Arvatakse, et need mängivad pigem

regulaatorset rolli ja esinevad mittefunktsionaalses konformatsioonis. Kui integriinid on aktiivses olekus, siis muudavad nad oma konformatsiooni ja paarduvad teise integriini ahelaga moodustades heterodimeerse aktiivse retseptori (Hynes, 2002). Integriinide N-terminaalne osa seostub rakuväliste ligandidega ning C-terminaalne osa on seotud erinevate signaaliülekannderadade molekulidega tsütosoolis (Joonis 5).



**Joonis 5. Integriinide heterodimeeride paiknemise üldskeem raku plasmamembraanis.**

N-terminaalsed otsad on ekstratsellulaarsed ja C-terminaalsed rakusisesed. C-terminustega on sageli seotud erinevad signaaliülekanndjad (enamasti erinevad kinaasid). ETM – ekstratsellulaarne maatriks. Muudatustega Desgrosellier jt., (2010) järgi.

Tänaseks päevaks on identifitseeritud 18 erinevat  $\alpha$  integriini ja 8 erinevat  $\beta$  integriini alaühikut (Hynes, 2002). Oma üldehituselt on nad sarnase molekulaarse struktuuriga. Integriinid on olulised platsenta arengu puhul ja raseduse kontekstis.  $\beta 1$  integriini *knock out* hiirte puhul embrüo implantatsiooni etappi üldse ei toimu. Integriini  $\beta 4$  ahel erineb teistest integriini ahelatest oma väga pika tsütoplasmaatilise osa poolest. Integriini  $\alpha 6$  ahel moodustab heterodimeere integriinide  $\beta 1$  ja  $\beta 4$  ahelatega ( $\alpha 6\beta 1$   $\alpha 6\beta 4$  on olulised laminiini retseptorid). Hiljuti näidati, et isegi integriini  $\beta 1$  ahela erinev glükosüleerimine võib mõjutada trofoblastide invasiooni ja selle kaudu normaalse platsenta arengut (Liao jt., 2015).

## 2. EKSPERIMENTAALNE OSA

### 2.1 Töö eesmärgid

Käesoleva töö eesmärgiks laiemas mõttes oli uurida trofoblastide poolt sekreteeritud mikrovesiikuleid ja eksosoomi. Me kasutasime trofoblastide rakuliine, mis vastavad invasiivsetele (HTR8/SVneo) ja mitteinvasiivsetele (JAR ja JEG-3) trofoblastide tüüpidele. Trofoblastide poolt sekreteeritavatele mikrovesiikulitele spetsiifiliste pinnamarkerite leidmiseks uuriti erinevat tüüpi integriinide ahelate ( $\alpha 6$ ,  $\beta 1$  ja  $\beta 4$ ) ekspressiooni nende pinnal. Meie eesmärgiks oli välja selgitada, kas trofoblastide pinnal ekspresseeruvad integriinid paiknevad ka nende poolt sekreteeritavate mikrovesiikulite pinnal. Kui see oleks nii, siis võiks mingit kindlat integriini pidada trofoblastide mikrovesiikulite markervalguks, mis aitaks neid eristada sekreteeritavatest eksosoomidest, sest neid kahte vesikulite tüüpi on väga raske üksteisest eristada. Nimelt suuremate eksosoomide mõõtmed (100 nm) kattuvad väiksemate mikrovesiikulite mõõtmetega (100 – 1000 nm), mistõttu ei ole neid tsentrifuugimise teel võimalik täielikult üksteisest eristada. Peale selle oleks eksosoomide täpsemaks uurimiseks hea neid spetsiifiliselt märgistada. Esiteks selleks, et neid eristada mikrovesiikulitest ja teiseks selleks, et kui ühtede rakkude poolt sekreteeritud eksosoomid võetakse teiste rakkude poolt sisse, siis oleks võimalik seda protsessi uurida. Varasemate tööde põhjal võib öelda, et eksosoomide spetsiifiline marker on tetraspaniin CD63. Selleks, et rakud hakkaksid tootma märgistatud eksosoomi oli käesoleva töö teiseks eesmärgiks konstrueerida plasmiid, mis ekspresseeriks fluorestseeruvat liitvalku CFP-CD63. Kui selline plasmiid on olemas, siis peaksid temaga transfekteeritud trofoblastid hakkama sekreteerima märgistatud eksosoomi.

Eelöeldust lähtuvalt olid käesoleva töö konkreetsed eesmärgid:

- tuvastada trofoblastide poolt sekreteeritavates mikrovesiikulites integriinide  $\alpha 6$ ,  $\beta 1$  ja  $\beta 4$  ahelate ekspressioon immunoblot meetodil nende integriinidele vastavate antikehade abil
- kuivõrd töö käigus selgus, et mikrovesiikulites paiknevad ilmselt mitte terviklikud integriinide ahelad, vaid nende fragmendid, siis tuli selle kinnitamiseks kasutada mass-spektromeetria meetodit
- eksosoomide spetsiifiliseks märgistamiseks oli vaja konstrueerida plasmiid, mis trofoblastide rakku viies ekspresseeriks fluorestseeruvat liitvalku CFP-CD63
- transfekteerida trofoblastide rakuliine CFP-CD63 plasmiidiga, selleks et kinnitada liitvalgu inkorporeerumist trofoblastide endosoomsetesse vesikulitesse või siis ka eksosoomide koosseisu

## 2.2 Materjalid ja meetodika

### 2.2.1 Kasutatud rakuliinid

Tabel 1. Töös kasutatud rakuliinid

Rakuliin	Lühikirjeldus	Vastavus trofoblastide arengujärgule	Kasutamise eesmärk
JAR	Inimese trofoblastide rakuliin, mida on iseloomustanud R. A. Patillo. Pärineb koorionikartsinoomist. Selle rakuliini rakud on erineval määral polüploidised.	Vastab kõige enam terminaalsetele süntsüütsiotrofoblastidele (hCG sekretsioon ja tuumade polüploidiseerumine).	Mikrovesiikulite eraldamine
JEG-3	Inimese trofoblastide rakuliin, mida iseloomustas G. Kohelr. Pärineb koorionikartsinoomist. Selle rakuliini enamus rakke on triploidsed.	Vastab kõige enam terminaalsetele süntsüütsiotrofoblastidele (hCG sekretsioon, ja tuumade polüploidus).	Mikrovesiikulite eraldamine
HTR8/SV neo	Inimese trofoblastide rakuliin. Algsed rakud isoleeriti esimese trimestri platsenta hattudest. Hiljem immortaliseeriti need rakud SV40 viiruse suure T antigeeniga. Rakuliini autor Charles H. Graham.	Vastab kõige enam esimese trimestri invasiivsetele trofoblastidele (tsütokeratiin 18, vastavad integriinid).	Transfekteerimine
H1299	Inimese epiteeliaalne, kinnituv rakuliin, mis isoleeriti mitte väikserakulise kopsukartsinoomi lümfisõlmesse metastaseerunud koldest.	Laialt kasutatav rakuliin transfektsioonikatsete optimeerimiseks.	Transfekteerimine

Rakuliinide iseloomustamiseks kasutati ATCC andmebaasi ja vastavaid publikatsioone (Graham jt., 1993; Knöfler, 2010; Hannan jt., 2010).

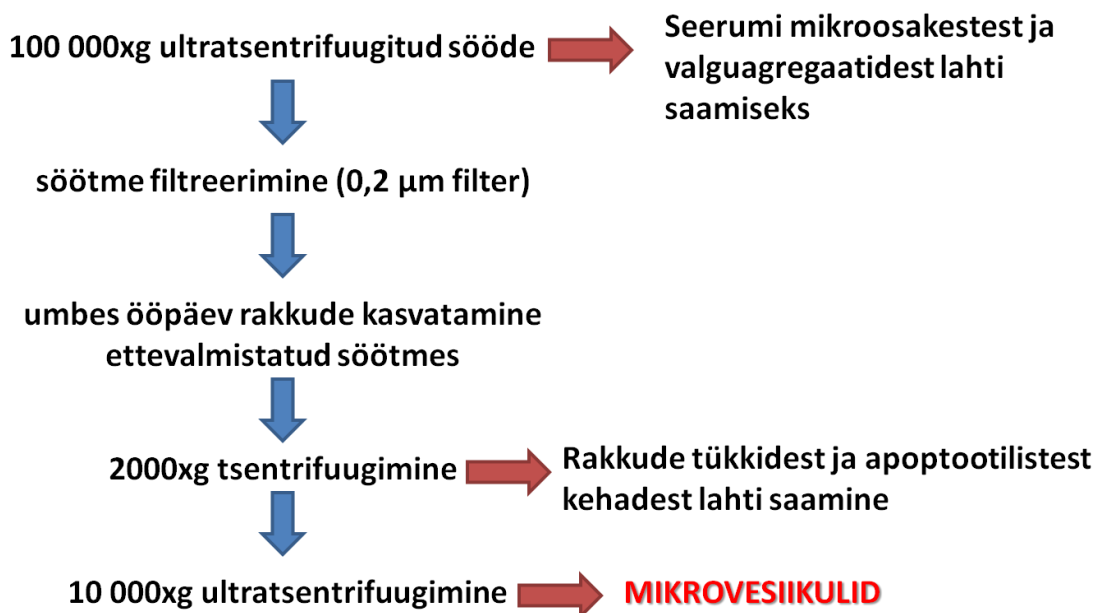
### 2.2.1.1 Rakuliinide kasvatamise tingimused

Kõiki rakuliine kasvatati RPMI 1640 (*ingl.k. Rosewell Park Memorial Institute medium*) söötmes (Naxo, Eesti). Söötme mahust 10% moodustas veise loote seerum (FBS, ingl *fetal bovine serum*) (PAN-Biotech, Saksamaa). Bakteriaalse saastuse vältimiseks lisati söötmesse antibiootikume: a) penitsiliini 100 U/ml (Sigma-Aldrich, USA) b) streptomütsiini 100 µg/ml (Sigma-Aldrich, USA). Kõiki rakuliine kasvatati 5% CO<sub>2</sub> atmosfääris, veeauraga küllastatud keskkonnas, 37°C juures inkubaatoris MCO-18 AIC (UV) (Sanyo, Jaapan). Rakud kasvatati 90-100% konfluentsuseni, mille järel nad külvati uude kasvukeskkonda. Rakkude ümberkülvamiseks pesti neid üks kord 1x steriilse PBS-ga, ning eemaldati plastiku pinnalt 1x trüpsiini lahusega (GE Healthcare, UK). Rakususpensioonile lisati trüpsiini mõju inhibeerimiseks võrdses mahus söödet (RPMI 1640 + 10% FBS). Rakud sadestati tsentrifuugides (tsentrifuug 4-16K, Sigma, Saksamaa) 10 minuti jooksul 300xg ja 20°C juures. Pärast sadestamist suspendeeriti rakud värskes söötmes ning pandi kasvama uutesse Petri tassidesse. Kui oli vaja edasi külvata täpne arv rakke (näit transfekteerimiseks), siis loeti nende hulk Neubauer'i modifitseeritud hemotsütomeetri (Marienfeld, Saksamaa) abil.

### 2.2.2 Mikrovesiikulite eraldamine

Mikrovesiikuleid eraldati JAR ja JEG-3 rakkuliinide kasvukeskkonnast diferentsiaalse tsentrifuugimise teel. Meetod põhineb raku poolt sekreteeritavate mikroosakeste suuruste erinevusel, mis võimaldab neid üksteisest eristada kombineerides erinevaid tsentrifuugimise kiirusi (Joonis 6). Mikropartiklite eraldamiseks on kasutatud palju erinevaid tsentrifuugimise tingimusi (Théry jt., 2001). Mikrovesiikulite eraldamiseks kasvatati JAR ja JEG-3 rakke 175 cm<sup>2</sup> pinnaga madratsites (BD Falcon, USA), selleks et saada edasiseks tööks piisav hulk mikrovesiikuleid. Söödet (RPMI 1640 + 10% FBS), milles nimetatud rakke kasvatati tsentrifuugiti 100 000xg juures üks tund (ultratsentrifuug L8-M, 45 Ti rootor, Beckman Coulter, USA), selleks et sadestada seerumi päritoluga mikroosakesed ja valgulised agregaadid. Pärast tsentrifuugimist steriliseeriti sööde filtreerimise teel (0,22 µm poori läbimõõduga tselluloosnitraat filter, 430758 Corning, USA). Sellisel viisil ettevalmistatud söötmega asendati 80-90%-lise konfluentsega rakkude kasvukeskkond ning hoiti rakke uues keskkonnas umbes üks ööpäev. Seejärel eemaldati rakkudelt sööde ning sadestati mikroosakesed koheselt. Selleks, et eraldada söötimest rakkude tükid ja apoptootilised kehad. tsentrifuugiti seda 20 minuti jooksul 2000xg 4°C juures (tsentrifuug 4-16K, Sigma, Saksamaa). Peale seda ultratsentrifuugiti supernatanti mikrovesiikulite eraldamiseks ühe tunni jooksul 10000xg ja 4°C juures (ultratsentrifuug L8-M, 45 Ti rootor, Beckman Coulter, USA). Mikrovesiikulid sadenesid tuubi põhja ja osaliselt selle seinale, kust nad viidi lahusesse

1xPBS abil. Mikrovesiikuleid pesti 1x PBS-ga ja sadestati jahutusega lauatsentrifuugi abil (5415R Eppendorf, Saksamaa) 20 min jooksul 16 000xg 4°C juures. Saadud mikrovesiikulid suspendeeriti üles steriilses 1xPBS-is ja külmutati kiiresti vedelas lämmastikus. Mikrovesiikulite proove hoiti -80°C külmikus kuni nende edasise analüüsini.



**Joonis 6. Mikrovesiikulite eraldamine diferentsiaalse tsentrifugimise abil.** Siniste nooltega on tähistatud erinevad etapid ja punaste nooltega tegevuse eesmärk.

### 2.2.3 Mikrovesiikulite ja rakkude lüüsimine

Lüüsimiseks kasutati rakke, mida kasvatati nii nagu on kirjeldatud punktis 2.2.1.1, välja arvatud rakkude eemaldamine plastikult. Lüüsimiseks kasutatud rakud võeti plastikult lahti mitte trüpsiiniga, mis eemaldaks rakkude pinnalt meid huvitavad valgud, vaid 1xPBS-ga, milles oli 10 mM EDTA-d. Pärast sadestati rakud eelpool kirjeldatud viisil ning neid pesti kolm korda 1xPBS-ga. Lüüsi- puhvrina kasutati Burgerson'i modifitseeritud RIPA puhvrit, mille aluseks oli 10 mM Tris-HCl pH 7,4, kuhu lisati NaCl 150 mM, 2 mM EDTA, 0,3% NP-40, 0,3% Triton X-100, 0,3% Na-deoksükolaat ja 0,1% SDS. Nii rakke kui ka kasvukeskkonnast eraldatud mikrovesiikuleid lüüsi selle puhvri abil, millesse lisati vahetult enne kasutamist proteaaside inhibiitorite segu (Roche Diagnostics GmbH, Šveits) ja 1 mM fenüülmetüülsulfonüülfluoriidi (PMSF). Lüüsimine toimus ühe tunni jooksul jääl. Lõpuks töödeldi lüsaate 3x15 sekundit ultraheliga (Cole-Palmer, USA) ning mittelastunud materjal sadestati 16 000 g juures 10 min temperatuuril 4°C (5415R Eppendorf, Saksamaa). Supernatant viidi uutesse tuubidesse ja säilitati -20°C juures.



## 2.2.4 Valkude SDS-poliakrüülamiidgeel elektroforees ja immunoblot analüüs

**Tabel 2. Immunoblot analüüsi jaoks kasutatud antikehad**

<b>Antikeha</b>	<b>Firma</b>	<b>Algkontsentratsioon</b>	<b>Lahjendus</b>
<b>Primaarsed antikehad</b>			
Inimese integriini $\beta 4$ vastane hiire monoklonaalne antikeha 7. Tsütoplasmaatilise C-terminaalse otsa vastu.	Santa Cruz Biotechnology, USA	50 $\mu\text{g}/500 \mu\text{l}$	1:500
Inimese integriini $\beta 4$ vastane hiire monoklonaalne antikeha B-4. Rakuvälise N-terminaalse otsa vastu.	Santa Cruz Biotechnology, USA	200 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1:500
Inimese integriini $\beta 1$ vastane küüliku monoklonaalne antikeha M-106. Rakuvälise N-terminaalse otsa vastu.	Santa Cruz Biotechnology, USA	200 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1:100
Inimese integriini $\beta 1$ vastane hiire monoklonaalne antikeha B3B11. Rakuvälise N-terminaalse otsa vastu	Abcam, UK	1 $\text{mg}/\text{ml}$	1:100
Inimese integriini $\alpha 6$ vastane küüliku monoklonaalne antikeha EPR5578. Rakuvälise N-terminaalse otsa vastu.	LifeSpan BioSciences, USA	- hübriidoomi sööde	1:1000
<b>Sekundaarsed antikehad</b>			
Mädarõika peroksüdaasiga konjugeeritud hiire IgG vastane kitse polükloonaalne antikeha (GAM-HRP)	Santa Cruz Biotechnology, USA	200 $\mu\text{g}/ 0,5 \text{ ml}$	1:5000
Mädarõika peroksüdaasiga konjugeeritud küüliku IgG vastane kitse polükloonaalne antikeha (GAR-HRP)	Santa Cruz Biotechnology, USA	200 $\mu\text{g}/ 0,5 \text{ ml}$	1:500
<b>Negatiivne kontroll</b>			
Hiire IgG isotüüpide segu	Santa Cruz Biotechnology, USA	200 $\mu\text{g}/ 0,5 \text{ ml}$	1:1000
Küüliku IgG isotüüpide segu	Abcam, UK	0,2 $\text{mg}/\text{ml}$	1:1000

Rakkude ja vesiikulite lüsaadid segati Laemmlli proovipuhvriga, kuhu denatureeriva keskkonna loomiseks oli lisati ditiotreitooli (DTT). Proove kuumutati 5 minutit 95°C juures. Kuna mikrovesiikulite proovides oli rakulüsaadiga võrreldes palju vähem valku, siis selleks, et geelile kantava valgu kogus oleks võimalikult suur, kasutati 2 kordse Laemmlli proovipuhvri asemel 6 kordset. Valkude lahutamiseks kasutati 8%-list poliüakrüülamiidgeeli. Elektroforees ja valkude geelilt membraanile ülekande toimus Western blot meetodiga firma Biorad aparatuuri (UK) abil. Valgud kanti geelist üle polüvinülideenfluoriid membraanile (PVDF; Immobilon, Millipore, USA) 100 V juures 1 tunni jooksul nn „märja ülekande“ meetodi abil. Selleks, et vältida antikehade mittespetsiifilist seostumist PVDF membraanile, inkubeeriti seda ühe tunni jooksul 1xPBS-s, mis sisaldas 5% lõssipulbrit ja 0,1% Tween-i 20. Pärast Valkude tuvastamiseks inkubeeriti membraani kõigepealt primaarsete antikehadega ja siis määrõika peroksüdaasiga seotud sekundaarsete antikehadega (andmed kasutatud antikehade kohta on esitatud Tabelis 2). Mõlema juhul toimus inkubeerimine toatemperatuuril, loksutades ühe tunni jooksul. Pärast primaarse antikehadega inkubeerimist pesti membraane kolm korda 1xPBS-ga, mis sisaldas 0,1% Tween-i 20. Nii primaarsete kui ka sekundaarsete antikehade lahjendused tehti 1xPBS-s, milles oli 5% lõssipulbrit ja 0,1% Tween-i 20. Peale sekundaarse antikehaga inkubeerimist pesti membraane kolm korda ülalpool mainitud pesulahusega ja töödeldi siis viie minuti jooksul kemoluministsentsi põhjustava lahusega (Immobilion™ Western, Millipore, USA). Membraane eksponeeriti röntgenfilmile (Agfa, Belgia), mida ilmutati vastavalt etteantud protokollile.

### 2.2.5 Integriinide fragmentide mass-spektromeetria

Integriinide mass-spektromeetiline analüüs teostati Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituuti Proteoomika tuumiklaboris. Valkude lahutamine toimus 8%-lise poliüakrüülamiidgeeli abil vastavalt eelpool esitatud protokollile. Pärast elektroforeesi värviti geelid nn „Blue Silver“, kombineeritud meetodi abil, mis põhines kahel publikatsioonil (Pink jt., 2010; Candiano jt., 2004).

**Tabel 3. Geeli värvimiseks kasutatud lahused**

Fiksaator	10% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 10% MetOH 40% EtOH	Geeli fikseerimise lahus
Töötlemislahus	1% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 10% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Kasutati geeli inkubeerimiseks enne värvimise etappi

Coomassie G-250 “Blue Silver”	0,12% Coomassie G-250 10% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 10% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 20% MetOH	Värvilahus
----------------------------------	---	------------

Pärast elektroforeesi fikseeriti geeli 1 tunni jooksul loksutades ning kõik järgnevad etapid toimusid toatemperatuuril ning samuti loksutades. Pärast fikseerimist inkubeeriti geeli 2 tundi töötlemislahuses ja seejärel 24 tundi värvilahuses. Lõpuks eemaldati geelist liigne värv, pestes seda mitu korda ddH<sub>2</sub>O-ga. Geelist lõigati skalpelliga välja meile olulised valgu triibud ning pandi 1ml-sse Eppendorfi tuubi, kuhu lisati 100 µl ddH<sub>2</sub>O-d. Seejärel asetati tuubid jääle ja viidi kohe mass-spektromeetrilisele analüüsimisele.

## 2.2.6 Tetraspaniin CD63 ja CFP liitvalgu saamine

### 2.2.6.1 RNA eraldamine JEG-3 rakuliinist

JEG-3 rakuliini kasvatati 10 cm diameetriga Petri tassides, nagu on kirjeldatud punktis 2.2.1.1. RNA eraldati umbes 90%-se konfluentsusga rakkudest. Selleks eemaldati rakkudest sööde ning pesti neid üks kord steriilse 1xPBS-ga. Rakud võeti tassidelt lahti trüpsiini abil, sadestati tsentrifuugimise teel, kusjuures rakusadet pesti kolm korda 1xPBS-iga. Rakkudest eraldati kogu RNA meetodiga, mis põhineb ränimembraane sisaldavate kolonnide kasutamisel. RNA eraldati vastavalt tootja eeskirjale (FavorPrep<sup>TM</sup> Tissue Total RNA Purification Mini Kit, Favorgene, Taiwan). RNA kontsentratsiooni ja puhtusastme määramiseks kasutati spektrofotomeetrit (NanoDrop 1000, Thermo Fisher Scientific, USA). Lisaks sellele hinnati RNA kvaliteeti ka elektroforeesi abil. RNA elektroforees toimus 1%-lises agarosgeelis, kuhu oli lisatud EtBr ning 1xTAE puhvrit. Kui ultravioletvalguses on selgelt näha kaks rRNA fraktsiooni, siis on tegemist hea kvaliteediga RNA-ga (18S rRNA ~ 1 kb; 28S rRNA ~ 2 kb). Kui need fraktsioonid pole hästi eristatavad, siis on ilmselt RNA RNAaas-ide poolt lagundatud või selle hulk on liiga väike. Kuni edasise kasutamiseni säilitati RNA proove külmikus -80°C juures.

### 2.2.6.2 cDNA süntees

Järgmise etapina sünteesiti RNA alusel kodeeriv DNA ehk cDNA. Selleks kasutati pöördtranskriptaasi (Moloney Murine Leukemia Virus) ja Oligo(dT)<sub>18</sub> praimerit, mis on komplementaarne mRNA 3'-polü-A otsaga. cDNA sünteesiti vastavalt tootja protokollile (First Strand cDNA Synthesis Kit, Thermo Fisher Scientific, USA). cDNA sünteesi tulemusena

saime JEG-3 rakkude DNA raamatukogu, mis vastab nende rakkude poolt ekspresseeritavatele mRNA-dele. Saadud cDNA kvaliteedi kontrolliti PCR meetodi abil. Kasutati tootja poolt esitatud GAPDH praimereid ja vastavat PCR-i läbiviimise programmi. Saadud PCR produktide kvaliteeti analüüsiti agarosgeeli abil.

### 2.2.6.3 Tetraspaniin CD63 kodeeriva DNA fragmendi paljundamine koos restriктаasi saitidega

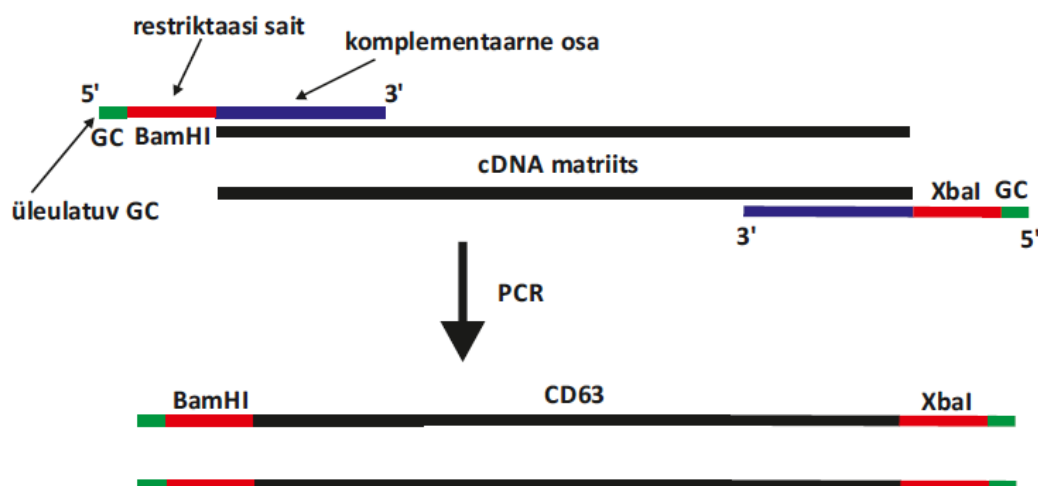
Selleks, et PCR-i põhiselt kloneerida CD63 DNA fragmenti, konstrueeriti vastavad praimerid (komplementaarne osa on märgitud sinisega), mis sisaldasid lisaks restriктаaside saiti (märgitud punasega) ja üleulatuvat GC klambri osa (märgitud rohelisega) (Joonis 7).

*Forward praimer* CD63F003:

5'- **GC**GGATCC**ATGGCGGTGGAAGGAG** - 3'

*Reverse praimer* CD63R003:

5'- **CGTCTAGACTACATCACTCGTAGCCACT** - 3'



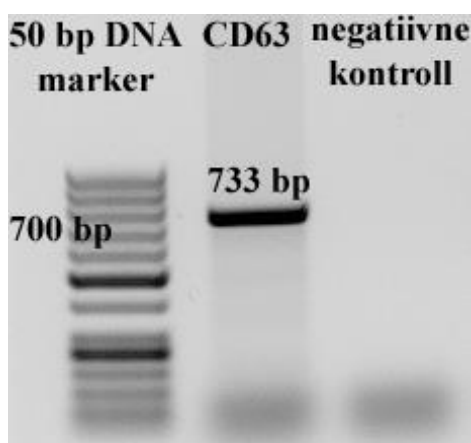
### Joonis 7. PCR-i põhine klonerimine

PCR-i reaktsioonisegu maht oli 50µl. Kasutati 10 µl 5x FirePol Master Mix (Solis BioDyne, Eesti), millele lisati 35 µl ddH<sub>2</sub>O-d, matriitsina 2 µl cDNA-d ja 1,5 µl praimereid (10 µM stockid). Paralleelselt valmistati ka negatiivne proov, kuhu cDNA matriitsi asemel lisati ddH<sub>2</sub>O. PCR viidi läbi termotsükleris (Applied Biosystems, USA) programmi järgi, mis on esitatud tabelis 4.

**Tabel 4. PCR programm**

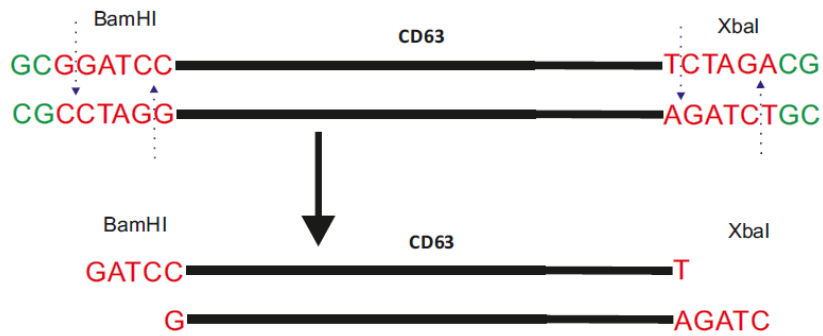
	<b>Temperatuur</b>	<b>Aeg</b>	<b>Tsükli arv</b>
<b>Denaturatsioon I</b>	94°C	3 min	1
<b>Denaturatsioon II</b>	94°C	30 sek	25
<b>Kinnitamine (<i>ingl.k. annealing</i>)</b>	58°C	30 sek	
<b>Pikendamine</b>	72°C	1 min	

Selleks, et kontrollida PCR-i fragmentide kvaliteeti, lahutati nad geelelektroforeesi abil. Elektroforeesiks kasutati 1% agarosgeeli, kuhu lisati EtBr ning see viidi läbi 1xTAE puhvrts. Saadud DNA fragmentide suuruse hindamiseks kasutati 50 bp DNA markerite segu (Fermentas, USA). Geeli kujutis jäädvustati BioSpectrum 510 (UVP, USA) seadme abil. Selgus, et saadi üks DNA fragment, mis vastab eeldatavale suurusele 733 aluspaari (Joonis 8). Sellest võis järeldada, et saadud praimerid on sobilikud ja nende praimeritega teostatava PCR reaktsiooni produkti alusel võib luua CD63 ja helesinise fluorestseeruva valguga CFP (*ingl cyan fluorescent protein, CFP*) liitvalgu.

**Joonis 8. CD63 PCR produkti kontroll.**

#### 2.2.6.4 Tetraspaniin CD63 DNA fragmendi restriktreerimine ja puhastamine

Tänu spetsiaalselt kujundatud praimeritele, sisaldasid CD63 DNA fragmendid restrikttaaside jaoks vajalikke hüdrolüüsime kohti. Selleks, et oleks võimalik saadud DNA inserti viia sisse plasmiidivektorisse on vaja selle otsi vastavate ensüümidega osaliselt ära lõigata. Selle tagajärjel tekivad nn „kleepuvad otsad“ (Joonis 9).

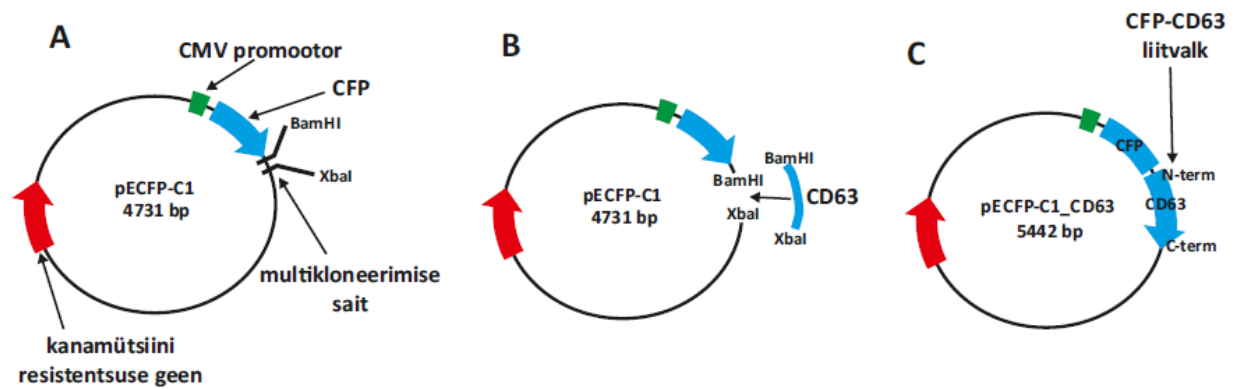


### Joonis 9. CD63 DNA fragменти restriksioon

CD63 DNA fragменти restriksioonisegu kogumaht oli 20 µl. Restriksioonisegu saamiseks võeti 2 µl 10x Tango (Thermo Scientific, USA) puhvrist, millele lisati 10 µl DNA lahust, mis sisaldas 300 ng DNA-d, 0,2 µl (2U) BamHI (Thermo scientific, USA) restriктаasi, 0,2 µl (2U) XbaI (Thermo Scientific, USA) restriктаasi ning reaktsiooni lõpmahu saavutamiseks 7,6 µl ddH<sub>2</sub>O. Restriksiooni reaktsioon toimus 37°C juures ühe tunni jooksul ning selle peatamiseks kuumutati proove 20 min jooksul 80°C juures. Tulemuse analüüsiks kanti proovid elektroforeesi geelile, milleks oli 1% agaros EtBr-ga 1xTAE puhvris. Kui elektroforees oli toimunud mõne aja, siis see peatati, geel eemaldati elektroforeesi puhvrist ning kasutades ultravioletvalguse seadet lõigati geelist välja õige pikkusega DNA fragment. Järgnevalt puhastati restrikteeritud CD63 DNA fragment geelist välja (FavorPrep™ Gel/PCR Purification Kiti) tarvikutekomplekti abil (Favorgene, Taiwan) vastavalt tootja eeskirjale. Puhastatud DNA kontsentratsioon määrati spektrofotomeetri abil (NanoDrop 1000, Thermo Fisher Scientific, USA).

#### 2.2.6.5 pECFP-C1-CD63 plasmidi valmistamine

CD63-CFP liitvalgu ekspresseeriva plasmidi valmistamise skeem on toodud allpool (Joonis 10). Molekulaarse kloneerimise modelleerimiseks *in silico* kasutati Clone Manager 9 programmi. Kasutati spetsiifilist vektorit, nii et CFP järjestus paikneks CD63 liitvalgu N-terminaalses otsas. Tühja vektorina kasutati pECFP-C1 plasmidi, mida restrikteeriti ja puhastati sama protokolliga järgi nagu CD63 DNA fragmenti (vt alapeatükk 2.2.6.4).



**Joonis 10. pECFP-C1-CD63 plasmidi valmistamine.** A – tühi pECFP-C1 plasmid, B – restrikteeritud vektor ja CD63 DNA insert, C – ligeeritud uus plasmid pECFP-C1\_CD63.

Restrikteeritud ja geelist väljapuhastatud plasmidi kontsentratsioon määrati spektrofotomeetri (NanoDrop 1000, Thermo Fisher Scientific, USA) abil. Järgmise etapina ligeeriti uus plasmid pECFP-C1-CD63 kokku. Ligeerimissegu kogumaht oli 20 µl. See saadi kui võeti 1 µl (60 ng) vektorit, 9 µl (120 ng) CD63 fragmenti kahekordses ülehulgas ning lisati 2 µl 10x ligaasipuhvrit (Thermo Scientific, USA) ja 1 µl (1U) T4 DNA ligaasi (Thermo Scientific, USA). Lõpuks lisati kogumahu saamiseks 7 µl ddH<sub>2</sub>O. Plasmid ligeeriti 22°C juures ühe tunni jooksul ning siis ligeerimine lõpetati, kuumutades proove 10 min 65°C juures. Ligeeritud proove säilitati -20°C juures.

#### 2.2.6.6 pECFP-C1-CD63 plasmidi paljundamine ja puhastamine

Plasmidiga transformatsiooniks kasutati DH5α *E.coli* tüve, mida kasvatati LB söötmes. Keemiliselt töödeldud „kompetentseid“ *E.coli* rakke sulatati jääl. Kompetentidele lisati kogu ligatsioonisegu, mis saadi vastavalt alapeatükis 2.2.6.5 esitatule. Kompetentseid *E.coli* rakke inkubeeriti koos plasmidse DNA-ga 30 min jääl, aeg ajalt neid õrnalt segades. Seejärel pandi rakud 3 minutiks termostaati 37°C juurde, et tekitada neis kuumašokki. Edasi lisati transformatsioonisegule LB vedelsöödet, et selle maht oleks 1 ml, misjärel suspendeeriti neid hoolikalt ning hoiti ühe tunni jooksul 37°C juures termostaadis (Binder, Saksamaa). Nüüd sadestati rakud tsentrifuugimise teel ning eemaldati enamik söötimest. *E.coli* rakke sadestati tsentrifuugi 4-16K (Sigma, Saksamaa) abil 3 min jooksul 6000 rpm juures. Lõpuks suspendeeriti rakud väiksemas söötme mahus ja pandi kasvama LB selektiiv (seleksioonimarkerina kasutati kanamütsiini) tardsöötmele. Rakkususpensioon kanti Drigalski spaatli abil tardsöötmele tassi pinnale. Peetri tase bakteritega hoiti inkubaatoris (Binder, Saksamaa) 37° C juures 16 tundi. Järgmisel päeval ilmusid selektiivsöötmele nähtavale transformeerunud *E.coli* kolooniad. Edasiseks analüüsiks valiti kolm kolooniat,

mida kasvatati 20 tundi vedelas LB söötmes (katseklaasid oli 2 ml söödet), kuhu lisati kanamütsiini lõpkkontsentratsiooniga 0,05 mg/ml. Rakke kasvatati loksutis (SI 600R, Lab Companion, Lõuna Korea) 180 rpm pöörete juures ja temperatuuril 37°C. Järgmisel päeval sadestati rakud tsentrifuugimise teel ja eraldati nendest plasmiidne DNA (FavorPrep™ Plasmid DNA Extraction Mini Kit) abil (Favorgene, Taiwan) vastavalt tootja protokollile. Puhastatud plasmidi kontsentratsioon määrati spektrofotomeetri (NanoDrop 1000, Thermo Fisher Scientific, USA) abil. Saadud plasmiid kontrolliti geelelektroforeesi abil restriksioonimeetodil, selleks et veenduda, et see oleks vastavuses oma teoreetilise suurusega. Valiti üks positiivne koloonia, mis sisaldas õiget plasmidi ning pandi rakud uuesti kasvama, aga juba suuremas mahus (50 ml vedelas LB söötmes, kuhu lisati kanamütsiini lõpkkontsentratsiooniga 0,05 mg/ml). Rakke kasvatati 20 tunni jooksul samades tingimustes, nagu eelnevalt kirjeldatud. Seejärel sadestati *E.coli* rakud tsentrifuugimise teel ning eraldati nendest pECFP-C1-CD63 plasmiid juba suuremas mahus (Endotoxin-free Plasmid DNA Purification Nucleobond Extra Plasmid Purification Kit) abil (Macherey-Nagel, Saksamaa) vastavalt tootja eeskirjale. Puhastatud plasmidi kontsentratsioon määrati spektrofotomeetri abil (NanoDrop 1000, Thermo Fisher Scientific, USA) ning seda säilitati -20°C juures.

### **2.2.7 Rakkude transfekterimine pECFP-C1-CD63 plasmiidiga**

Transfekterimiseks kasutati H1299 ja HTR8/SV neo rakuliine. Üks päev enne transfekterimist määrati rakkude hulk ning külvati need värskesse söötmesse 6x kaevukestega koekultuuriplaatidele. Ühte kaevukesse pandi kasvama 150 000 rakku. Enne rakkude külvamist asetati kaevukeste põhja ümmargused steriilsed katteklaasid. Transfekterimiseks kasutati Turbofect reagenti (Thermo Scientific, USA), mis on suure DNA seondamise võimega katioonne polümeer. Transfekterimine teostati vastavalt reagenti tootja protokollile. Ühe kaevukese kohta kasutati 4 µg plasmidi ja 6µl Turbofect'i. Parallelselt CD63-CFP liitvalku ekspresseeriva plasmiidiga transfekteriti kontrollrakke ka algse pECFP-C1 plasmiidiga, milles puudus CD63 insert. 36 tundi pärast transfektsiooni oli fluorestsentsi signaal optimaalne, selleks et teha rakkudest preparaadid ja analüüsida neid mikroskoobi abil.

### **2.2.8 Transfekteritud rakuliinide mikroskopeerimine**

Kõigepealt eemaldati söötimest katteklaasid koos nendele kinnitunud transfekterunud rakkudega. Rakke pesti üks kord 1xPBS-ga ja fikseeriti 10 min jooksul 100 µl 4%-s PFA-s toatemperatuuril. Fikseerimisele järgnes kolmekordne pesemine 1xPBS-ga. Järgmise etapina permeabiliseeriti rakke 1x PBS-s, mis sisaldas 0,1% Triton X-100. Seejärel inkubeeriti rakke

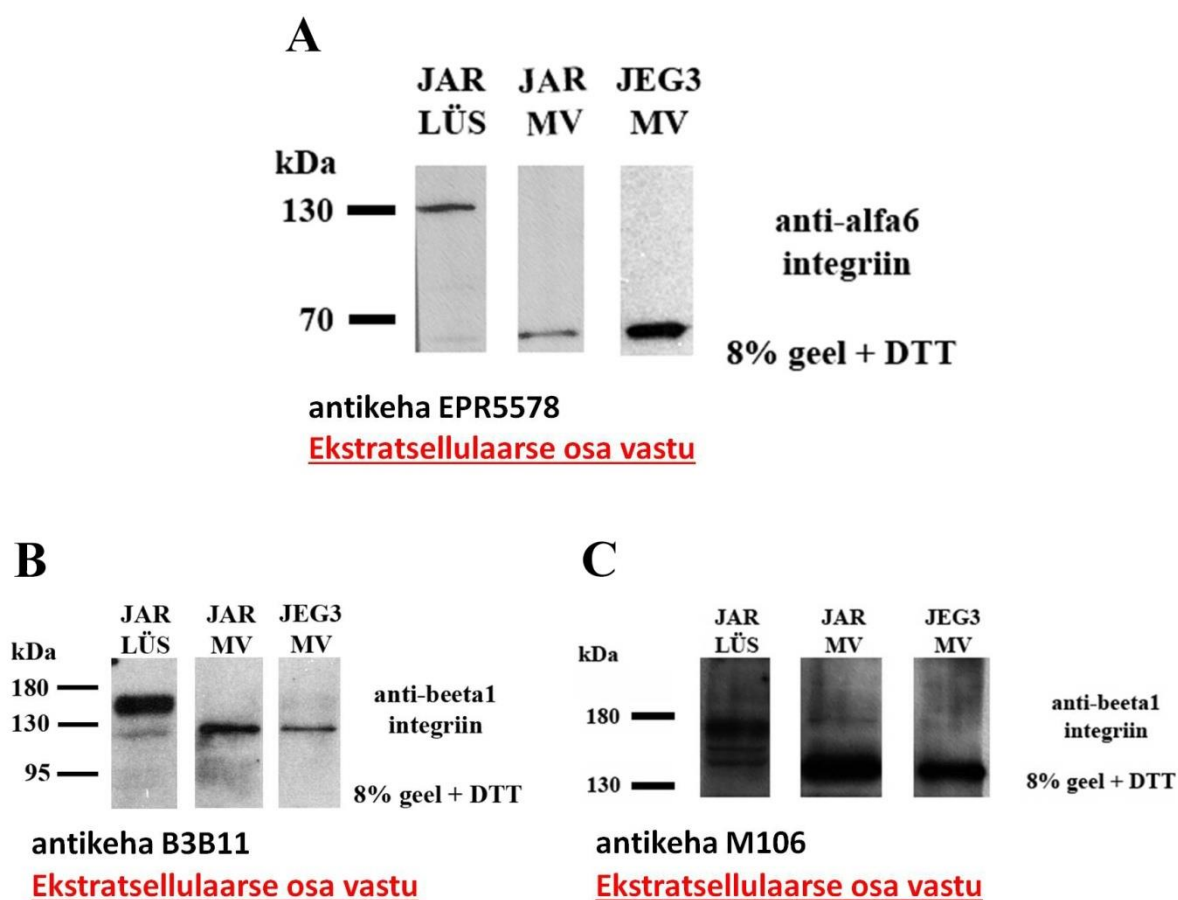


permeabiliseerimispuhvril samuti 10 min ning pesti jälle kolm korda 1xPBS-ga. Järgmiseid etapid viidi läbi pimedas, selleks et fluorokroome vähem kahjustada. Mõnede preparaaside puhul toodi nähtavale rakkude mikrostruktuurid  $\alpha$ -tubuliini vastase hiire monoklonaalse antikeha TAT1 abil. Selleks kasutati antikehi tootva hübridoomi rakkudelt eraldatud söödet (lahjendus 1:50 blokeerimislahuses). Enne immuunomärgistamist, selleks et vähendada mittespetsiifilist antikehade seostumist inkubeeriti rakke ühe tunni jooksul 4%-lis kitse seerumiga 1xPBS-s. Pärast rakkude blokeerimist järgnes nende pesemine nii nagu eelpool kirjeldatud. Rakke inkubeeriti kõigepealt primaarse antikehaga ühe tunni jooksul, siis pesti kolm korda 1xPBS-ga ning inkubeeriti lõpuks sekundaarse antikehaga. Selleks oli kitse hiire IgG vastane antikeha, mis oli seotud Alexa 647 fluorokroomiga (Invitrogen, USA) (lahjendus 1:250 blokeerimislahuses). Sekundaarse antikehaga inkubeeriti rakke ühe tunni jooksul ning pesti siis kolm korda 1xPBS-ga. Rakutuumad värviti DAPI-ga, mille alglahusest 1 mg/ml tehti lahjendus 1:10 000 1xPBS-s. Rakkudele kanti 30  $\mu$ l DAPI lahust, inkubeeriti paar minutit ning pesti siis maha 1xPBS-ga. Lõpuks asetati rakkudega kaetud katteklaasid alusklaasil olevale sulundusvedeliku (Dako Fluorescent Mounting Medium, Taani) tilgakesele. Preparaate analüüsiti fluorestsentsmikroskoobi Olympus BX61 (Jaapan) ning kujutis salvestati Cell Sense Standart programmi abil.

## 2.3 Tulemused

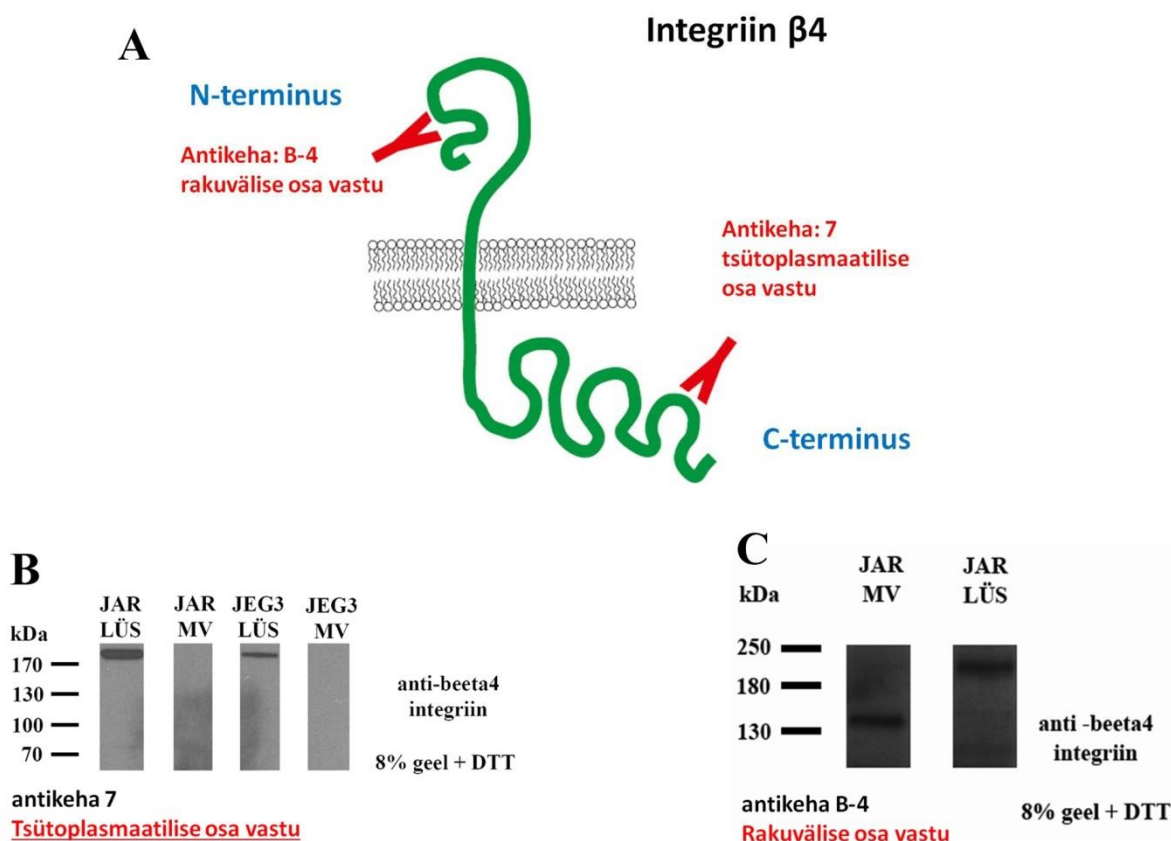
### 2.3.1 Integriinide analüüs trofoblasti rakuliinide JAR ja JEG-3 poolt sekreteeritud mikrovesiikulites immunoblot meetodil

JAR ja JEG-3 trofoblastide rakuliinide poolt sekreteeritud mikrovesiikulid saadi ning valmistati SDS-poliüakrüülamiidgeel elektroforeesi jaoks ette nii, nagu kirjeldati „Metoodika“ osas. Mikrovesiikulite valguproove võrreldi samade rakuliinide rakulüsaatiga. Immunoblotil kasutati antikeha isotüübi negatiivseks kontrolliks hiire ja küüliku IgG-d, kuid neid ei ole joonistel esitatud, kuivõrd need olid negatiivsed. Immunoblotanalüüs näitas, et integriinide ekspressioon on rakkudes ja mikrovesiikulites erinev.



Joonis 11.  $\alpha 6$  ja  $\beta 1$  integriinide ahelate tuvastamine JAR ja JEG-3 rakkudes ning nende poolt sekreteeritud mikrovesiikulites (8% SDS-PAGE geel, redutseerivad tingimused). A – integriini  $\alpha 6$  ahel on tuvastatud selle molekuli ekstratsellulaarse osa vastase antikehaga EPR5578, B – integriini  $\beta 1$  ahel on tuvastatud selle molekuli ekstratsellulaarse osa vastase antikehaga B3B11, C - integriini  $\beta 1$  ahel on tuvastatud selle molekuli ekstratsellulaarse osa vastase antikehaga M106. LÜS – rakulüsaat, MV – vastava rakuliini mikrovesiikulite lüsaat.

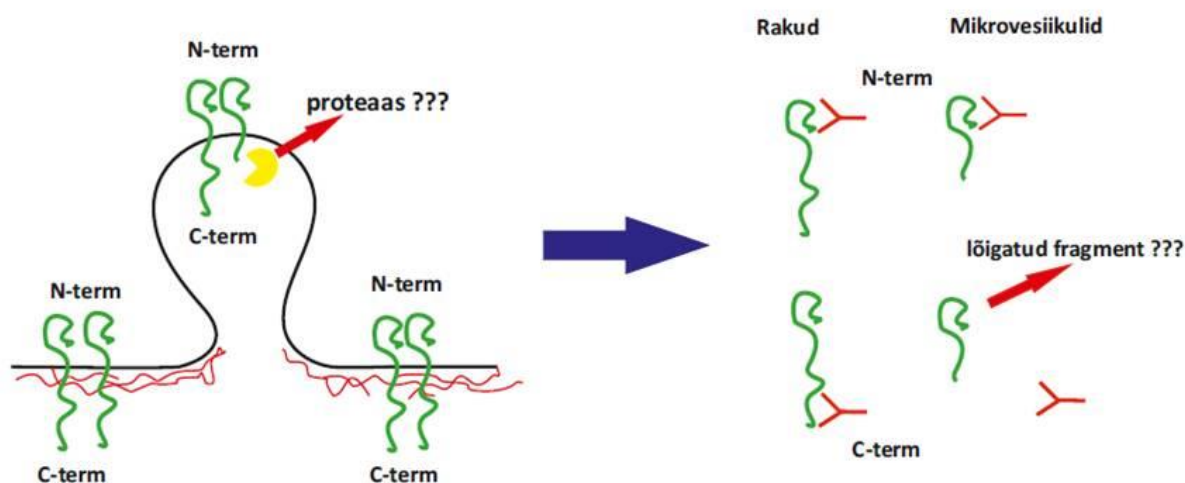
Katsete tulemusena selgus, et integriini  $\alpha 6$  ahela puhul (Joonis 11A) näeme me mikrovesiikulite lüsaadis täispika valguga (molekulmass 130 kDa) asemel selle fragменти, mille suurus on veidi alla 70 kDa. Lisaks sellele selgus, et ka integriini  $\beta 1$  ahelal on mikrovesiikulites osa molekulist ära lõigatud. Selleks, et tulemus oleks usaldatav kasutasime kahte erinevat  $\beta 1$  ahela vastast antikeha: a) B3B11 (Joonis 11B) b) M106 (Joonis 11C). Immunoblot näitas, et mõlemad antikehad tuvastavad mikrovesiikulite lüsaatides integriini  $\beta 1$  ahela fragmenti, mille molekulmass on väiksem kui täispikk molekul rakulüsaadis .



**Joonis 12 Integriini  $\beta 4$  ahela tuvastamine JAR ja JEG-3 rakkudes ning nende poolt sekreteeritud mikrovesiikulites (8% SDS-PAGE geel, redutseerivad tingimused).** A – skeem, mis kujutab antikehade seostumiskohti integriini  $\beta 4$  molekulil, B – integriini  $\beta 4$  ahel on tuvastatud selle molekuli tsütoplasmaatilise osa vastase antikehaga 7, C – integriini  $\beta 4$  ahel on tuvastatud selle molekuli rakuvälise osa vastase antikehaga B-4. LÜS – rakulüsaat, MV – vastava rakuliini mikrovesiikulite lüsaat.

Järgmisena uuriti integriini  $\beta 4$  ahela ekspressiooni JAR ja JEG-3 rakkude mikrovesiikulites. Selleks, et teha kindlaks millise osaga integriini  $\beta 4$  ahelast on tegemist, valiti erinevad antikehad, millest antikeha 7 tunneb ära tsütoplasmaatilist osa ja antikeha B-4 rakuvälise osa (Joonis 12A). Võrdluseks kasutati JAR ja JEG-3 rakulüsaate. See antikeha, mis tunneb ära

Integriini  $\beta 4$  ahela tsütoplasmaatilist osa (Joonis 12B) ei seostu mikrovesiikulite lüsaadis üldse integriini  $\beta 4$  ahelale, samas rakulüsaadis tunneb ta ära täispika ahela. Integriini  $\beta 4$  ahela rakuvälise osa vastane antikeha tunneb mikrovesiikulite lüsaadis ära fragmendi (Joonis 12C), mis on märkimväärselt väiksem (umbes 130 kDa) kui peaks olema täispikk integriini  $\beta 4$  ahel (umbes 200 kDa). Samal ajal tuvastavad nii see antikeha kui ka tsütoplasmaatilise osa vastane antikeha 7 täispika integriini  $\beta 4$  ahela olemasolu JAR ja JEG-3 rakkude lüsaadis. Võib öelda, et üldjoontes langeb integriinide  $\alpha 6$ ,  $\beta 1$  ja  $\beta 4$  ahelate fragmentide ekspressioon JAR ja JEG-3 rakkude mikrovesiikulites kokku. See tähendab, et nendes rakkudes, esinevad terved integriini ahelad, mida on ka varem näidatud, aga mikrovesiikulites on nende integriinide ahelad ilmselt osaliselt proteolüütiliselt lagundatud. Integriini  $\beta 4$  puhul on ilmselt proteolüütiliselt lagundatud just ahela C-terminaalne tsütoplasmaatilise osa. Saadud tulemused on kokkuvõtlikult esitatud skeemina (Joonis 13).

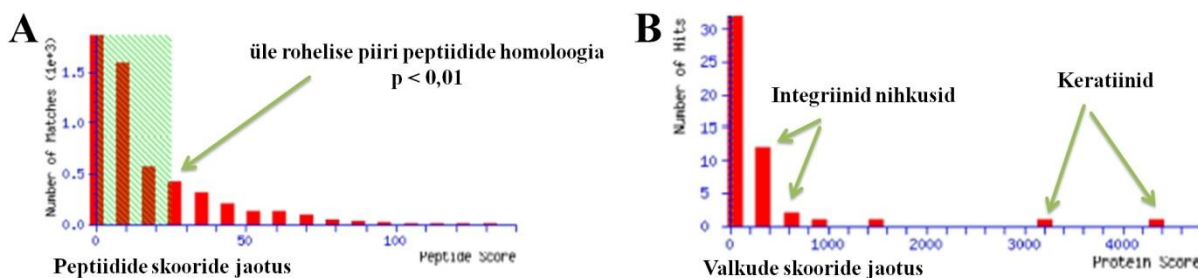


**Joonis 13. Skeem, mis kirjeldab integriinide ahelate võimalikku proteolüütilist lõikamist mikrovesiikulites.** Proteolüütiline lõikamine toimub ilmselt ahela C-terminaalsest tsütoplasmaatilisest otsast.

Me oletame, et kui toimub mikrovesiikulite väljapungumine plasmamembraanist, siis mingi meile tundmatu proteasas lõikab integriini ahela tsütoplasmaatilise otsa osaliselt ära. Selle tõttu me näeme mikrovesiikulite lüsaatides integriinide ahelate fragmente, sest kasutatud antikehad tunnevad ära valgu piirkondi, mis asuvad raku plasmamembraanist väljaspool. Kui aga kasutatud antikeha tunneb ära integriini ahela tsütoplasmaatilist osa, siis me ei näe mikrovesiikulite lüsaadis üldse signaali, nagu oli tegemist integriini  $\beta 4$  ahela puhul.

### 2.3.2 Integriinide $\alpha 6$ , $\beta 1$ ja $\beta 4$ ahelate fragmentide mass-spektromeetria

Lisaks immunoblot analüüsile otsustati JAR ja JEG-3 rakkude poolt sekreteeritud mikrovesiikulite integriine uurida täiendavalt mass-spektromeetria abil. Seda meetodit kasutati selleks, et saada kinnitust, et mikrovesiikulite lüsaatide immunoblotil tuvastati antikehade abil tõepoolest integriinide  $\alpha 6$ ,  $\beta 1$  ja  $\beta 4$  ahelate fragmente.



**Joonis 14. Peptiidide ja valkude skooride jaotused.** A – mass-spektromeetria käigus tuvastatud peptiidide skooride jaotus, B – tuvastatud valkude skooride jaotus, mida arvutatakse peptiidide skooride põhjal.

Protein sequence coverage: 10%

Matched peptides shown in **bold red**.

```

1  MAGFRPSPWA  RLLLAALISV  SLSGTLANRC  KNAPVKSCTE  CVRVKDKCAY
51  CTDEMFRDRR  CNTQAELLAA  GQRESIVVM  ESSFQITEET  QIDITLARSQ
101  MSPQGLRVRL  RFGEEHFEL  EVFEPLESEV  DLYILMDFSN  SMSDOLNLK
151  RMGQNLARVL  SQLTSDYITG  FGKFFVQKSV  PQDMRPEKL  KEPWNSDFP
201  FSPFNVISLT  EDVDEFRNKL  QGERISGNLD  APBGGFDAIL  QTAVCTRDIG
251  WRFDSTHLLV  FSTESAFHYE  ADGANVLAGE  MSRNDERCHL  DTTGTYTVR
301  TQDYFVPTL  VLLAKKHNI  PIFAVTNYSY  SYYEKLTHTF  FVSSLGVLQE
351  DSSNIVELLE  EAFNRIRSNL  DIRALDSPRG  LRTEVTSQMF  QKTRIGSFHI
401  RRGEVGIYQV  QLRALEHVDG  THVQQLPEDQ  KGNHMLKPSF  SDGLKMDAGI
451  ICDVCTCELQ  KEVRSARCSF  NGDFVCGQCQ  CSEGSQGQC  NCSTGSLSDI
501  QPCLREGEDK  FCSGRGECQC  GHCVCYGEGR  YEQQFCEYEN  FQCPTSGFL
551  CNDRGRCSMG  QCVCEPGWTG  FSCDCPLSNA  TCIDSNGGIC  NGRGHCECGR
601  CHCHQQSLYT  DTICEINYSY  IHFGLCEDLR  SCVQCQAWGT  GENKGRICEE
651  CNFEVTRVDE  LKRABVVVVR  CSFRDEDDDC  TVSVTHEGGD  APGPNSTVLV
701  HKKKDCPPGS  FWWLIPLLLL  LLPLLALLLL  LQWYCACCK  ACLALLPCCN
751  RGHMVGFKED  HMYLRENLMA  SDHLDTFMLR  SGNLKGKRDV  RAKVINMQR
801  PGFATHAASI  NPTELVPVGL  SLRLARLCTE  NLLKPTREC  AQLRQVEBEN
851  LNEVYRQISG  VHKLQQTFR  QQFNAGHKQD  HTIVDTVLM  FRSAPKALLK
901  LTERQVEQRA  FHDLKVARGY  YLTADQDAR  GMVEFQEGVE  LVDVRELFPI
951  RPEDDEKQL  LVERIDVPAG  TATLGRRLVN  ITIIKEQARD  VVSFEPQEPFS
1001  VSRGDDVARI  FVIRRWLDGG  KQVSVYRQD  GTAQGNRDVI  FVEGELLFPQ
1051  GEANKELQVK  LLMLQBVDSL  LRGRQVRFH  VQLSNPKFGA  HLGQPHSTTI
1101  IIRDFDELDR  SFTSQMLSSQ  FPPHGDLGAP  QNFNAKAAGS  RKIHFNLWLP
1151  SGKPMGVRVK  YNIQGDSESE  AHLSDSKVPS  VELTNLYFVC  DYEMKVCAYG
1201  AQGEGPYSSL  VSCRTHQEVF  SEFGRLAFNV  VBSTVTQLSW  AEPATNGEI
1251  TAYEVQYGLV  NDDNRPIGFM  KKVLDVDFKN  RMLLIENLRE  SQPYRYTVKA
1301  RAGAGWPPER  EAINLATQP  KRPMIPIIP  DIPVDARQSG  EDYDSFLMYS
1351  DVLRSFSGS  QRPVSDDTG  CGWKEPFLG  EELDLRAVIV  RLPELIPRL
1401  SASGSRSDA  EAPHGPPDDG  GAGKGGSLP  RSATPGPFGE  HLVNGRMFA
1451  FPGSTNSLHR  MTTTSAALYG  THLSPHVPHR  VLSTSSLTR  DVNSLTRSEM
1501  SHSTTLFRDY  STLTSVSSH  SRLTAGVPTT  FTRLVFSALG  FTLRVSQWE
1551  FRCERPLQGY  SVEYQLLNGG  ELHRLNIPNP  AQTSVVVVLL  LFNHSYVFRV
1601  RAQSQEGWGR  EREGVITIEE  QVHPQSFLCP  LPGSAFTLST  PSAFPPLVET
1651  ALSFDSLQLS  WERFRPNQD  IVGVLVTCEN  AQGGGFATAF  RVDGDSFESR
1701  LTVFGLSENV  FYKFKVQART  TEGFQPEREG  IITIESQDGG  PFPQLGSRAG
1751  LQXPLQSEY  SSITTTHTSA  TEPFLVDGLT  LGAQHLEAGG  SLTRHVQTEF
1801  VSRTLTTSGT  LSTRMDQQFF  QT
  
```

### Peptiidide jaotus valgu järjestusel identifitseeritud $\beta 4$ integriini näitel

Selle peptiidi skoor on ainult 2

**Joonis 15. Integriini  $\beta 4$  ahela aminohappelise järjestuse katmine tuvastatud peptiidide järjestustega.**

SDS-poliakrüülamiid geelist eraldatud valguproove analüüsiti Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituuti Proteoomika tuumiklaboris. Geelist eraldatud valke lagundati ensümaatilisel trüpsiiniga ja saadud peptiidid identifitseeriti mass-spektromeetri abil. Saadud andmeid analüüsiti Mascot (Matrix Science) programmi abil. Sõltuvalt tuvastatud peptiidi homoloogiast arvutati sellele vastav skoor (Joonis 14A). Lihtsustatult öeldes, mida suurem on peptiidi skoor, seda unikaalsem ta on ning seda olulisemaks muutub see peptiid valgu tuvastamisel. Peptiidide olulisuse määraks pandi skoor suurusega 25, ( $p < 0,01$ ). Peptiidide skoori põhjal arvutatakse tuvastatud valkude skoor (Joonis 14B). Mida suurem on valgu skoor, seda tõenäosem on, et tegemist on just selle valguga. Ideaaljuhul peaks hästi tuvastatud valgu skoor olema suhteliselt kaugelt teistest valkudest.

Family	M	DB	Accession	Score	Mass	Matches	Match (sig)	Sequences	Seq (sig)	emPAI	Description
1	1	SwissProt	<a href="#">P04264</a>	4345	66170	228	169	54	45	24.87	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6
1	2	SwissProt	<a href="#">P35908</a>	2874	65678	147	98	48	38	12.05	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Homo sapiens GN=KRT2 PE=1 SV=2
1	3	SwissProt	<a href="#">P02538</a>	1681	60293	148	95	52	40	19.26	Keratin, type II cytoskeletal 6A OS=Homo sapiens GN=KRT6A PE=1 SV=3
1	4	SwissProt	<a href="#">P04259</a>	1642	60315	151	96	51	39	17.89	Keratin, type II cytoskeletal 6B OS=Homo sapiens GN=KRT6B PE=1 SV=5
1	5	SwissProt	<a href="#">P13647</a>	1263	62568	110	74	44	36	11.94	Keratin, type II cytoskeletal 5 OS=Homo sapiens GN=KRT5 PE=1 SV=3
1	6	SwissProt	<a href="#">P12035</a>	374	64549	58	25	18	12	1.19	Keratin, type II cytoskeletal 3 OS=Homo sapiens GN=KRT3 PE=1 SV=3
1	7	SwissProt	<a href="#">P19013</a>	302	57649	18	11	7	4	0.34	Keratin, type II cytoskeletal 4 OS=Homo sapiens GN=KRT4 PE=1 SV=4
1	8	SwissProt	<a href="#">P08729</a>	230	51411	29	13	7	6	0.77	Keratin, type II cytoskeletal 7 OS=Homo sapiens GN=KRT7 PE=1 SV=5
1	9	SwissProt	<a href="#">O7RTS7</a>	170	58229	23	11	6	5	0.44	Keratin, type II cytoskeletal 74 OS=Homo sapiens GN=KRT74 PE=1 SV=2
1	10	SwissProt	<a href="#">O8N1N4</a>	93	57629	8	5	4	3	0.25	Keratin, type II cytoskeletal 78 OS=Homo sapiens GN=KRT78 PE=2 SV=2
2	1	SwissProt	<a href="#">P13645</a>	3307	59020	164	115	43	34	16.40	Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KRT10 PE=1 SV=6
2	2	SwissProt	<a href="#">P35527</a>	3130	62255	194	132	42	37	20.08	Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 PE=1 SV=3
2	3	SwissProt	<a href="#">P02533</a>	1911	51872	136	79	40	28	14.85	Keratin, type I cytoskeletal 14 OS=Homo sapiens GN=KRT14 PE=1 SV=4
2	4	SwissProt	<a href="#">P08729</a>	1671	51578	132	81	43	30	17.88	Keratin, type I cytoskeletal 16 OS=Homo sapiens GN=KRT16 PE=1 SV=4
2	5	SwissProt	<a href="#">O04695</a>	1074	48361	90	48	31	19	5.78	Keratin, type I cytoskeletal 17 OS=Homo sapiens GN=KRT17 PE=1 SV=2
3	1	SwissProt	<a href="#">P05023</a>	1426	114135	92	57	36	31	2.16	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1 OS=Homo sapiens GN=ATP1A1 PE=1 SV=1
4	1	SwissProt	<a href="#">P08648</a>	854	115605	48	31	16	13	0.67	Integrin alpha-5 OS=Homo sapiens GN=ITGA5 PE=1 SV=2
5	1	SwissProt	<a href="#">P05556</a>	686	91664	67	37	24	16	1.29	Integrin beta-1 OS=Homo sapiens GN=ITGB1 PE=1 SV=2
6	1	SwissProt	<a href="#">P08195</a>	651	68180	43	30	20	14	1.38	4F2 cell-surface antigen heavy chain OS=Homo sapiens GN=SLC3A2 PE=1 SV=3
7	1	SwissProt	<a href="#">O9Y4L1</a>	419	111494	67	28	36	18	0.98	Hypoxia up-regulated protein 1 OS=Homo sapiens GN=HYOU1 PE=1 SV=1
8	1	SwissProt	<a href="#">P01024</a>	349	188569	28	14	13	7	0.17	Complement C3 OS=Homo sapiens GN=C3 PE=1 SV=2
9	1	SwissProt	<a href="#">P16144</a>	331	205745	30	12	17	6	0.13	Integrin beta-4 OS=Homo sapiens GN=ITGB4 PE=1 SV=5
10	1	SwissProt	<a href="#">P11166</a>	298	54391	25	18	8	7	1.01	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 1 OS=Homo sapiens GN=SLC2A1 PE=1 SV=2
10	2	SwissProt	<a href="#">P11169</a>	225	54345	27	16	10	8	1.01	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 3 OS=Homo sapiens GN=SLC2A3 PE=1 SV=1
11	1	SwissProt	<a href="#">P26640</a>	272	141642	28	11	21	7	0.23	Valine--tRNA ligase OS=Homo sapiens GN=VARS PE=1 SV=4
12	1	SwissProt	<a href="#">P02748</a>	270	64615	15	9	6	3	0.22	Complement component C9 OS=Homo sapiens GN=C9 PE=1 SV=2
13	1	SwissProt	<a href="#">O75369</a>	260	280157	34	17	24	13	0.22	Filamin-B OS=Homo sapiens GN=FLNB PE=1 SV=2

**Joonis 16. Proovides tuvastatud valkude nimekirja algus, mis sisaldab neid valke mida programm pidas olulisemaks teatud algoritmi põhjal.**

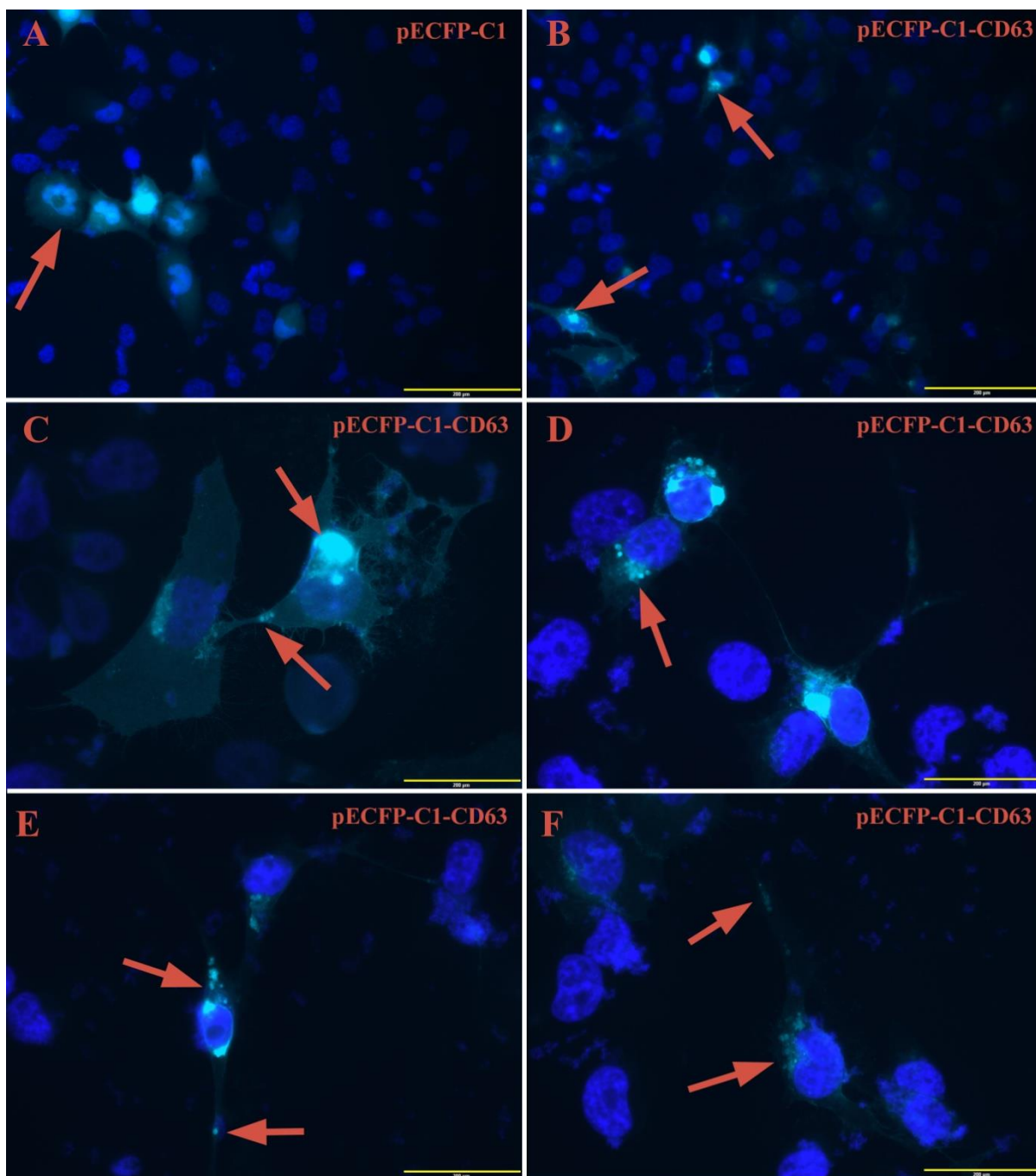
Valgu skoori arvutamisel kasutatakse ka neid peptiide, mille skoor on alla 25 (ehk ei vasta  $p < 0,01$ ), aga nende panus valgu üldskoorile on väike. Valgu aminohappelise järjestusega saab kõrvutada tuvastatud peptiidide järjestusi, mis näitab kuivõrd on valk kaetud tuvastatud peptiidide poolt (Joonis 15). Mass-spektromeetria tulemused kinnitasid, et tegemist võib olla integriinide fragmentidega, kuna leiti peptiidide, mis vastavad integriinide  $\beta 1$  ja  $\beta 4$  ahelatele. Samas ei õnnestunud meil tuvastada integriini  $\alpha 6$  ahelat, mida võiks seletada sellega, et me eraldasime geelist ja saatsime analüüsiks vale valgutriibu, kuna immunoblotil antikehaga tuvastatud valgu piirkonnale vastavas Coomassiga värvitud geeli piirkonnas oli mitu väga lähestikku asuvat valgutriipu. Asjaolu, et tuvastatud peptiidid katavad just valgu N-terminaalse rakuvälise osa (Joonis 15), mida suudeti tuvastada ka vastava antikeha abil kinnitab meie tulemusi mõlma meetodi puhul. Ühe peptiidi skoor, mis kattub C-terminaalses otsas oleva alaga on väga madal (Joonis 15), mis viitab sellele, et tegmist võiks olla juhuslikult sobiva peptiidiga. Meie analüüsi puuduseks oli see, et ilmselt sattus proovidesse keratiine (Joonis 16), mis on üldlevinud probleem mass-spektromeetria puhul. Nagu näha, siis 15 esimest valku kuuluvad keratiinide hulka ja nende kogus proovides, mida väljendab emPAI indeks, on palju kordi suurem kui integriinide kogus. Kui vaadata valkude skooride jaotust (Joonis 14B), siis selgub, et kõige kõrgemad skoorid kuuluvad just keratiinidele ning integriinidele vastavad väärtused on nihkunud madalamate skooride piirkonda. Vaatamata sellele, et proovides oli üleliia palju keratiine, mis moonutab mass-spektromeetria tulemusi, tuvastati neis siiski integriinide  $\beta 1$  ja  $\beta 4$  ahelatele vastavaid peptiide ning tuvastatud peptiidide kattuvus integriini  $\beta 4$  ahela fragmendiga on kooskõlas immunobloti tulemusega.

### **2.3.3 CFP-CD63 liitvalgu paiknemise uurimine pECFP-C1-CD63 plasmiidiga transfekteeritud H1299 ja HTR8/SVneo rakuliinides**

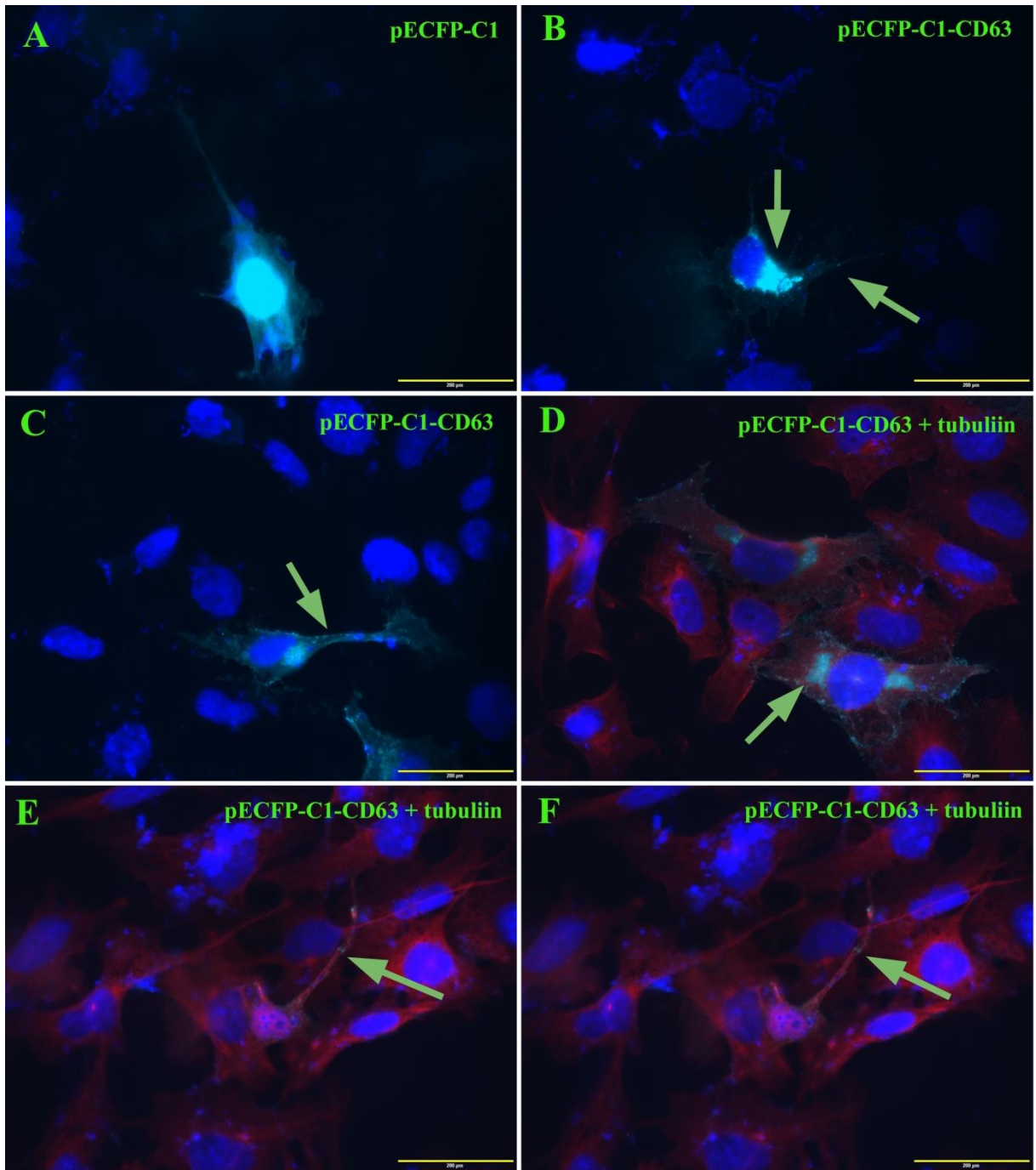
CD63-CFP liitvalgu ekspresseeriva plasmiidiga transfekteeritud rakuliinide H1299 ja HTR8/SVneo ning analüüsi selle valgu paiknemist rakkudes fluorestsentsmikroskoobi abil. Kõigepealt transfekteeriti H1299 kopsukasvaja rakuliin, mis on väga hästi transfekteeritav. Kontrolliks kasutati ainult CFP-d ekspresseerivat plasmiidi (pECFP-C1), mille puhul on näha, et CFP ei paikne mingis kindlas rakustruktuuris ning paikneb hajusalt üle kogu raku (Joonis 17A). CD63-CFP-d ekspresseeriva plasmiidiga (pECFP-C1-CD63) transfekteeritud rakud erinevad kontrollist (Joonis 17B), sest nende puhul on näha rakus kindlaid piirkondi, kus CFP-CD63 kontsentratsioon on palju kõrgem kui ülejäänud raku osades. Punaste nooltega on tähistatud struktuurid, mis võiksid olla Golgi kompleksi osad, kus on näidatud CD63 ekspressiooni. Suurema suurunduse puhul on need struktuurid paremini nähtavad (Joonis 17 C,D). Me täheldasime, et suurematest kogumikest eralduvad vesikulaarsed struktuurid ja hakkavad liikuma raku perifeeriasse. Need vesikulaarsed struktuurid liiguvad lõpuks raku jätketesse (Joonis 17 E,F, punased nooled). Kuna CD63 on põhiline eksosomaalse raja marker, siis võib oletada, et tegemist on multivesikulaarsete kehadega mis sisaldavad eksosoomi ja liiguvad piki rakujätkeid plasmamembraani suunas. Kuivõrd meid huvitab platsenta areng ja erinevate trofoblastide tüüpide panus sellesse, siis transfekteerisime ka trofoblastide rakuliini HTR8/SVneo rakke CFP-CD63 liitvalgu ekspresseeriva plasmiidiga ning analüüsisime valgu paiknemist fluorestsentsmikroskoobi abil. Üldiselt ei erinenud CD63-CFP ekspressioon neis rakkudes palju H1299 rakuliini rakkudest. Ainult CFP-d ekspresseeriva plasmiidi (pECFP-C1) puhul on näha, et CFP paikneb samuti hajusalt üle kogu raku (Joonis 18A). Samasugune paigutus on näha ka CD63-CFP-d ekspresseeriva plasmiidi puhul. Tähelepanuväärne on, et raku tuuma läheduses on piirkond, kus on fluorestsentsvalgu kontsentratsioon suurem ning sellest eralduvad vesikulaarsed struktuurid (Joonis 18B,C rohelised nooled). Selleks, et tuua nähtavale rakkude tsütoskeleti mikrotoruksesi, märgistati neid  $\alpha$ -tubuliini vastase primaarse antikeha ning fluorokroomi Alexa 647-ga seotud sekundaarse antikeha abil. On näha, et rakutuuma ümbrusest lähtub vesiikulilaadsete osakeste liikumine rakumembraani suunas (Joonis 18D). Kuna vesiikulite transport tsütoplasmas toimub mööda mikrotoruksesi, siis me oletame, et see võib olla oluline ka eksosoomi kandvate multivesikulaarsete kedade transpordi puhul. On näha, et mikrotorukesed ulatuvad trofoblastide rakujätketesse ning samal ajal on seal näha vesikulaarseid moodustusi, mis võiksid olla multivesikulaarsed kehad või eksosoomid (Joonis 18E, F). Trofoblastide rakuliini HTR8/SVneo rakkude puhul toimub sarnaselt H1299 rakuliini rakkudega raku tuuma



lähedusest lähtuv vesikulaarsete struktuuride transport rakujätketesse, kuhu ulatuvad ka tubuliini mikrotorukesed.



**Joonis 17. CFP-CD63 liitvalgu paiknemine H1299 rakuliinis.** A - ainult CFP plasmiidiga transfekteeritud rakud, B – CFP-CD63 liitvalgu ekspresseeriva plasmiidiga transfekteeritud rakud, C ja D – CFP-CD63 liitvalgu ekspresseeriva plasmiidiga transfekteeritud rakud, E ja F - CFP-CD63 liitvalgu ekspresseeriva plasmiidiga transfekteeritud rakud, kus on hästi nähtavad vesikulaarsed struktuurid rakujätketes. Rakutuumad on värvitud DAPI-ga (sinine).



**Joonis 18. CFP-CD63 liitvalgu paiknemine HTR8/SV neo rakuliinis.** A - ainult CFP plasmiidiga transfecteeritud rakud, B ja C – CFP-CD63 liitvalgu ekspresseeriva plasmiidiga transfecteeritud rakud, D – CFP-CD63 liitvalgu ekspresseeriva plasmiidiga transfecteeritud rakud, milles on märgistatud tubuliin, E ja F – CFP-CD63 liitvalgu paiknemine vesikulaarsetes struktuurides rakujätketes. Rakutuomad on värvitud DAPI-ga (sinine) ja  $\alpha$ -tubuliin on märgistatud antikehade abil konjugeeritud fluorokroomiga Alexa 647 (punane).

## 2.4 Arutelu

### 2.4.1 Integriinide uurimine trofoblastide rakuliinide JAR ja JEG-3 poolt sekreteeritud mikrovesiikulites

Senini ei ole mikrovesiikulite tuvastamiseks leitud ühtset markervalku, mis tuleneb nende biogeneesi mehhanismi eripärast. Nimelt pungub mikrovesiikul välja raku plasmamembraanist ja seetõttu on tema pinnavalgud samad, mis plasmamembraani koosseisus. Kuna on olemas palju erinevaid rakutüüpe, mis ekspresseerivad erinevaid pinnamarkereid, siis nende poolt produtseeritud mikrovesiikulid on ka oma pinnamarkerite suhtes erinevad (Revenfeld jt., 2014). Hiljuti leiti, et mikrovesiikulite membraani või sisekeskkonda suunatavaid valke teatud määral sorteeritakse, kuid need andmed on veel väga esialgsed, selleks et väita midagi kindlat mikrovesiikulitele spetsiifiliste markerite kohta (Clancy jt., 2015). Meie oma töös keskendusime integriinide ekspressiooni uurimisele trofoblastide poolt sekreteeritud mikrovesiikulites. Integriinid valiti seetõttu, et nende olemasolu õnnestus tuvastada JAR ja JEG-3 rakkude poolt sekreteeritud mikrovesiikulites proteoomika ja läbivoolutsütofluorimeetria abil (M. Koel, magistritöö 2013). Teoreetiliselt võiksid integriinid olla isegi erinevatest trofoblastide tüüpidest (invasiivsed, mitteinvasiivsed) pärit mikrovesiikulite markeriteks, sest on näidatud et nendes toimuvad integriinide ekspressiooni ümberlülitused (Baczyk jt., 2006). Detailsemaks uurimiseks valiti integriinide  $\alpha 6$ ,  $\beta 1$  ja  $\beta 4$  ahelad. Need ahelad annavad omavahel kombineerudes heterodimeerseid integriine  $\alpha 6\beta 1$  ja  $\alpha 6\beta 4$ , mis on tuntud laminiinide retseptoritena (Mercurio jt., 2001).

Käesoleva töös analüüsiti erinevate integriinide ekspressiooni trofoblastide rakuliinide poolt sekreteeritud mikrovesiikulites. Kõigepealt tuvastati JAR ja JEG-3 rakuliinide mikrovesiikulite lüsaatides integriini  $\beta 1$ ,  $\beta 4$  ja  $\alpha 6$  ahelate ekspressiooni immunoblot meetodi abil. Kõik kolm integriini ahelat olid olemas mikrovesiikulite lüsaatides, aga nende molekulmass mikrovesiikulites oli väiksem kui vastavate rakkude lüsaatidest. See eripära oli sama kõigi kolme vaadeldud integriini ahela puhul. Tulemust kontrolliti kahe erineva integriini  $\beta 1$  ahela vastase antikeha (N-terminaalse otsa vastased antikehad M106 ja B3B11) abil ning need mõlemad näitasid mikrovesiikulite puhul väiksemate fragmentide olemasolu. Selleks, et saadud tulemuses veenduda, kasutati erinevaid antikehi, mis olid kas vastava integriini rakuvälise N-terminaalse otsa vastu või tsütoplasmaatilise C-terminaalse otsa vastu. Kui mikrovesiikulite lüsaatidest tuvastati integriini  $\beta 4$  ahelat siis kasutati antikeha, mis oli rakuvälise otsa vastu. See antikeha tõi samuti nähtavale väiksema suurusega fragmendi. Kui samast mikrovesiikulite lüsaatist üritati tuvastada integriini  $\beta 4$  ahelat antikehaga, mis oli tsütoplasmaatilise otsa vastu, siis immuunreaktsiooni ei saadud üldse. Siinkohal tuleb

rõhutada, et rakulüsaatide puhul need mõlemad antikehad töötasid ning tõid nähtavale õige suurusega integriini  $\beta 4$  ahela. Sellest lähtudes tekkis meil esialgne hüpotees, et mikrovesiikulite moodustamisel toimub integriinide osaline proteolüütiline lagundamine tsütoplasmaatilisest C-terminaalsest otsast. Me oletame, et kui toimub mikrovesiikulite väljapungumine plasmamembraanist, siis mingi meile tundmatu proteaas lõikab integriini ahela tsütoplasmaatilise otsa osaliselt ära. Selle tõttu me näeme mikrovesiikulite lüsaatides integriinide ahelate fragmente, sest kasutatud antikehad tunnevad ära valgu piirkondi, mis asuvad raku plasmamembraanist väljaspool. Kui aga kasutatud antikeha tunneb ära integriini ahela tsütoplasmaatilist osa, siis me ei näe mikrovesiikulite lüsaadis üldse signaali, nagu oli tegemist integriini  $\beta 4$  ahela puhul.

Integriinid on väga põhjalikult läbiuuritud valkude perekond. Integriinid on väga olulised rakkude pinnaretseptorid, mis aitavad neil ekstratsellulaarse maatriksi komponente ära tunda. Neid on palju uuritud rakkude migratsiooni ja invasiooniga seoses arengubioloogilisest vaatenurgast, aga ka näiteks nende osalust kasvajate metastaseerumisega seotud protsessides (Barney jt., 2015). Mikrovesiikulite kontekstis pole integriine siiani uuritud ja nende tsütoplasmaatilise C-terminaalse otsa proteolüütilist degradeerimist pole varem näidatud. Kuid kasvajarakkudel tehtud uuringutest on ilmunud publikatsioone kus näidati, et raku pinnal toimub integriinide N-terminuste proteolüütiline äralõikamine (Kryczka jt., 2012).

Immunoblot meetodi tulemusi otsustati kontrollida mass-spektromeetria abil. Selleks analüüsiti antikehade poolt tuvastatud integriinide fragmente mass-spektromeetriliseks. Meil õnnestus mass-spektromeetria abil tuvastada integriinide  $\beta 1$  ja  $\beta 4$  ahelatest pärit peptiide, mis seega kinnitab eelmisi tulemusi. Integriini  $\alpha 6$  ahela fragmendi tuvastamine ie õnnestunud. Seda võib seletada proovide ettevalmistamisel tehtud veaga. Mass-spektromeetria jaoks lõigati valgutriibud välja värvitud geelist, kus paiknesid mitu valgutriipu üksteisele väga lähedal. Selle tõttu on tõenäoline, et lõigati välja vale valgutriip. Kui kõrvutada integriini  $\beta 4$  ahela järjestust identifitseeritud peptiididega, siis on näha, et need kattuvad selle valgu N-terminaalse rakuvälise osaga, mida tuvastati ka vastava antikeha abil. Ühe peptiidi skoor, mis kattub C-terminaalses otsas oleva alaga on väga madal, mis viitab sellele, et tegmist võiks olla juhuslikult sobiva peptiidiga. Meie analüüsi puuduseks oli see, et ilmselt sattus proovidesse keratiine, mis on üldlevinud probleem mass-spektromeetria puhul. Nagu on tulemustest näha, siis 15 esimest valku kuuluvad keratiinide hulka ja nende kogus proovides, mida väljendab emPAI indeks, on palju kordi suurem kui integriinide kogus. Kui vaadata valkude skooride jaotust, siis selgub, et kõige kõrgemad skoorid kuuluvad just keratiinidele ning integriinidele vastavad väärtused on nihkunud madalamate skooride piirkonda.

Saadud tulemuste lõplikuks kinnitamiseks oleks vajalik teha uus mass-spektromeetiline analüüs, vältides proovide saastumise keratiinidega ning püüda tuvastada mass-spektromeetriselt ka integriini  $\alpha 6$  ahela fragmendi olemasolu mikrovesiikulite lüsaadis. Edasise töö käigus oleks vaja teha kindlaks, kas kõnesolevad integriinid on mikrovesiikuli pinnal funktsionaalsed või rikub osaline lagundamine nende funktsioone rakuvälise retseptorina. Selle kindlakstegemiseks oleks võimalik teostada mikrovesiikulite kinnitumise katseid substraatidele ning kus üheks maatriksiks võiks olla laminiin. Meil on olemas laminiini  $\alpha 5$  ahela vastased blokeerivad antikehad (Chang jt., 2015; Ishikawa jt., 2014), mida saaks sellel eesmärgil hästi kasutada. Kui integriinid on siiski funktsionaalsed ja toimub mikrovesiikulite seostumine ekstratsellulaarse maatriksi ühe põhikomponendiga, siis oleks oluline seda edasi uurida, sest mikrovesiikulite kinnitumist ekstratsellulaarsele maatriksile pole veel näidatud. Teiseks oluliseks teemaks oleks tuvastada see(need) proteaas(id), mis degradeerib(vad) integriinide C-terminaalse otsa. Kuna meil on kasutada JAR ja JEG-3 rakkude poolt sekreteeritud mikrovesiikulite proteoomika tulemused (M. Koel magistritöö, 2013), siis neid andmeid saaks kasutada kõnealuste proteaaside tuvastamiseks.

#### **2.4.2 CFP-CD63 fluorestseeruva liitvalgu paiknemine transfekteeritud rakkudes**

Eksosoomid, nagu ka mikrovesiikulid kuuluvad rakkude poolt sekreteeritavate mikroosakeste hulka, aga nende tekkerada on täiesti erinev. Paljudel põhjustel on neid vaja omavahel eristada. Tavaliselt kasutatakse eksosoomide eraldamiseks mikrovesiikulitest mitmeid tsentrifuugimise etappe, kombineerides neid omavahel (Théry jt., 2001). Probleemiks on see, et suuremate eksosoomide (50-100 nm) ja kõige väiksemate mikrovesiikulite mõõtmed (100-1000 nm) kattuvad. See takistab puhtaste mikrovesiikulite ja eksosoomide fraktsioonide saamist. Erinevalt mikrovesiikulitest on eksosoomide osas teada kindel markervalk CD63, mida saab kasutada nende tuvastamiseks (Oksvold jt., 2015). Käesoleva töö käigu valmistati plasmidid, mille alusel saab rakkudes sünteesida fluorestseeruvat liitmarkervalku CFP-CD63. Teoreetiliselt peaks eksosoomide biogeneesi käigus toimuma selle liitvalgu inkorporeerumine nende membraani. Transfektsiooni optimeerimiseks kasutati alguses kopsukasvaja rakuliini H1299, kuid pärast transfekteeriti selle plasmiidiga ka esimese trimestri immortaliseeritud trofoblastide rakuliini HTR8/SVneo rakke. See rakuliin valiti põhjusel, et varasemad invasiivsed trofoblastid toodavad just rohkem eksosoomi (Sarker jt., 2014).

Rakkude transfektsiooni efektiivsust hinnati fluorestsentsmikroskoobi abil. Selgus, et rakkudes on teatud struktuurid, kus on CFP-CD63 kontsentratsioon kõrgem. Selline piirkond paikneb rakutuuma läheduses ning sealt, eralduvad väiksemad vesikulaarsed struktuurid rakumembraani suunas. Hästi on nähtav väiksemate rakusiseste vesikulite transport rakkude

jätketesse. Seda on näha nii kopsukasvaja rakuliini H1299 (on teada, et kasvavad üldiselt sekreteerivad palju eksosoomide) rakkudes kui ka varaste trofoblastide HTR/SVneo rakkudes. Me tööme rakkudes tubuliini vastase antikehaga nähtavale ka tsütoskeleti mikrotorukesed. Peenemate rakujätkete puhul on eriti hästi nähtavad mikrotorukesed ja fluorestseeruvad vesikulid, mis liiguvad mööda väljasopistusi raku perifeeria suunas. Raku tuuma juures paiknev suurem märkunud ala võiks olla Golgi kompleks, sest on teada, et seal leidub CD63 valku. Need vesikulaarsed struktuurid, mis on liikunud rakujätketesse võiks olla multivesikulaarsed kehad, milles on palju eksosoomide.

Edasise töö käigus oleks vaja kontrollida CFP-CD63 liitvalgu paiknemist rakkudes ja eksosoomides. Võiks kasutada mõningaid eksosomaalse raja markereid (näit LAMP2) ning vaadata selle kolokalisatsiooni CFP-CD63-ga. Selleks, et määrata CFP-CD63 täpsem asukoht, tuleks kasutada konfokaalmikroskoopiat. Meie töö lõppeesmärgiks on eraldada transfekteeritud trofoblastide poolt sekreteeritud eksosoomide ning kindlaks teha, kas CD63-CFP on nende koosseisu läinud. Kui selgub, et CD63-CFP liitvalk läheb eksosoomide koosseisu, siis saab seda plasmidi kasutada väga erinevate katsete läbiviimiseks. Näiteks saab rakkude poolt sekreteeritud eksosoomide fluorestsentsmärgise olemasolu tõttu eristada mikrovesiikulitest ja jälgida nende sissevõtmist retsipientrakku *in vivo* tingimustes, kasutades selleks elusate rakkude mikroskopeerimist. Meie edasise töö eesmärgiks on teha rakuliin, mis ekspresseeriks seda liitvalku konstitutiivselt. Samuti saab seda plasmidi kasutada tööriistana primaarsete trofoblastide uurimisel koekultuuris.

## KOKKUVÕTE

Käesoleva magistritöö kirjanduse ülevaate osas käsitletakse lühidalt platsenta põhifunktsioone ja ehitust. Samuti antakse ülevaade platsenta põhilistest arneguetappidest nagu implantatsioon ja invasioon. Töös kirjeldatakse erinevaid trofoblastide alampopulatsioone ja räägitakse põgusalt platsenta rakkude omavahelistest interaktsioonidest. Põhjalikumad käsitlemist leiavad mikrovesiikulid ja eksosoomid ning nende erinevad biogeneesi rajad. Antakse ka ülevaade nende vesiikulite erinevustest ja osalemisest rakkudevahelise informatsiooni kandjatena ning nende rollist platsenta füsioloogias ja patoloogiliste korral. Samuti tutvustatakse töös lühidalt integriine.

Magistritöö eksperimentaalse osa võib jägada keheks alampeatükiks sõltuvalt püstitatud eesmärgist. Kõigepealt uuriti hiliste trofoblastide rakuliinide poolt sekreteeritud mikrovesiikulite pinnamarkereid, milleks valiti integriinide  $\beta 1$ ,  $\beta 4$  ja  $\alpha 6$  ahelad. Töö teises osas käsitletakse eksosoomide fluorestseeruvat liitmarkervalku CD63-CFP ekspresseeriva plasmidi konstrueerimist, Rakkude poolt sekreteeritavate mikroosakeste uurimist raskendab see, et suuremad eksosoomid langevad oma mõõtmetelt kokku väiksemate mikrovesiikulitega. Selletõttu konstrueeriti vastav plasmid, et saaks juba eksosoomide sünteesi käigus neid raku sees märgistada fluorestseeruvad CFP valguga abil. Saadud plasmidi ekspressiooni kontrolliti trofoblastide HTR8/SVneo rakuliinil, mis vastab varastele, invasiivsetele trofoblastidele.

Mikrovesiikulite integriinide uurimise käigus selgus, et mikrovesiikutes tuvastati samad integriinid kui rakulüsaadis. Huvitav on asjaolu, et mikrovesiikulites ei leitud mitte täispikkasid integriine vaid nende fragmente, mis olid võrreldes rakkudes ekspresseerivatega väiksema molekulmassiga. Kõigi kolme integriini puhul oli sama tendents. Kui integriinide tuvastamiseks kasutati nende erinevate otste vastaseid antikehi, siis selgus, et uuritud integriinide C-terminaalne tsütoplasmaatiline ots on proteolüütiliselt ära lõigatud. Oletust, et integriine võidakse mikrovesiikulite tekkimise käigus proteolüütiliselt modifitseerida kontrolliti nende fragmentide mass-spektromeetrilise analüüsi abil. Meie esmased mass-spektromeetria andmed, olid ebatäpsed, sest proovide ettevalmistuse käigus sattus nendesse keratiini. Sellele vaatamata selgus, et tuvastatud peptiidid vastavad integriinide  $\beta 1$  ja  $\beta 4$  ahelatele. Saadud tulemuste usaldatavust tõstab see, et integriini  $\beta 4$  ahela puhul oli see kooskõlas immunobloti tulemusega. See tähendab, et tuvastatud peptiidid olid pärit integriinide rakuvälisest N-terminaalsest osast.

Eksosoomide uurimiseks konstrueeriti plasmid, mille abil saab ekspresserida CD63-CFP fluorestseerivat liitvalku. Saadud plasmiidiga transfekteeriti kopsukasvaja H1299 rakuliini ja varaste invasiivsete trofoblastide HTR8/SV neo rakuliini. Nende kahe rakuliini puhul uuriti ka CD63-CFP liitvalgu paiknemist. See liitvalk esines põhiliselt rakutuuma lähedal, mis vastab Golgi kompleks piirkonnale. Oli näha, et sellest piirkonnast eemalduvad vesiikulitelaadsed struktuurid raku plasmamembraani suunas. Väiksemaid vesiikuleid võis leida raku jätketes, kuhu on nad ilmselt liikunud tuuma piirkonnast. Me märgistasime ka raku mikrotuubulid  $\alpha$ -tubuliini vastase antikeha abil. Selgus, et peenemates raku jätketest asuvad vesiikulid mikrotuubulite läheduses. Põhimõtteliselt võiksid need vesiikulid olla multivesikulaarsed kehad, mis sisaldavad endas suurel hulgal eksosoomi. Meie poolt konstrueeritud plasmidi saab edasipidi kasutada erinevates uuringutes, kus on vaja tuvastada eksosoomi. See tähendab, et eksosoomi ei ole vaja enam spetsiaalselt märgistada, kuna nad juba sisaldavad fluorestseeruvat CFP märgist, mis on seotud CD63-ga. Selle plasmiidiga saab ka transfekteeritud rakkudest teha rakkude püsiliini, mis annab võimaluse eristada eksosoomi mikrovesiikulitest nende spetsiifilise märgistuse tõttu.



# **Modification of integrins in microvesicles secreted by trophoblasts and production of tetraspanin CD63 and CFP fusion protein**

**Artjom Stepanjuk**

## **SUMMARY**

Placenta is a unique organ because its temporary existence ends with the newborn delivery. Placenta is principally composed of two components because it contains cells originated from embryonic trophoblast and maternal uterine endometrial cells. It contains also maternal immune cells. In brief, in placenta proceeds communication between very many different types of cells which are originated in fact from different organisms. Cells in placenta get and transfer information by endocrine, paracrine and juxtacrine (ie cell-cell contacts) mechanisms but they are also in direct contact with extracellular matrix proteins. Lately have been discovered a new way of communication that cells use in the body. This is the communication by microparticles (exosomes and microvesicles) secreted by one cell and endocytosed by another. During that process many different components of microparticles (proteins, mRNA, miRNA) are transferred from cell to the cell that eventually can change the target cell differentiation, proliferation, adhesion or migration. Several authors have found that not only placental but also endometrial cells produce and secrete considerable amount of microparticles. These vesicles have a certain role in placental cell communication and trophoblast invasion into endometrial cells. It is anticipated that problems in trophoblast cell vesicle production may bring along severe complications of pregnancy, as preeclampsia. Vesicles secreted by trophoblasts may also promote their invasion between endometrial or uterine endothelial cells.

The aim of current work was to study the protein composition of microvesicles secreted by human trophoblasts. We attempted to find the proper surface marker for microvesicle identification and therefore studied integrin  $\alpha 6$ ,  $\beta 1$  and  $\beta 4$  subunit expression on trophoblast cell lines' JAR and JEG-3 cells and also on microvesicles secreted by these cells. To our surprise, when we used immunoblotting and proper anti-integrin antibodies occurred that the most probably trophoblast microvesicle do not express on their surface intact integrin subunits but rather their proteolytically degraded fragments. We separated the integrin subunit fragments from the microvesicle lysate and did their mass-spectromerical analysis. The gained results supported our biochemical finding. Based on these findings we suppose that during formation of microvesicles from these cells are the integrins in plasmamembrane degraded to smaller fragments.

In the second part of this work we tried to make a fusion protein between CD 63 and CFP (cyan fluorescent protein) to get specific and stable marker for exosomes. At present the tetraspanin CD63 is considered as relatively specific marker for exosomes. CD63-CFP construct would help to follow the interaction (or take up) of exosomes secreted by trophoblasts by the target endometrial cells. We have succeeded to produce the CD63-CFP construct which is expressed in trophoblast cell line HTR8/Svneo cells. Our studies by immunofluorescence microscopy revealed that CD63-CFP fusion protein localizes in trophoblast cell endosomes. Moreover, these intracellular vesicles have moved to the trophoblast cell projections. We can conclude here that the CD63-CFP is expressed in trophoblast cell endosomal vesicles and in our further experiments we plan to test its expression in exosomes secreted by trophoblasts.

## **TÄNUSÕNAD**

Täna oma juhendajaid Sulev Ingerpuud ja Andres Salumetsa igakülgse toetuse eest käesoleva töö valmimisel. Sulevile eriline tänu teksti põhjaliku läbivaatamise eest ja Andresele antud töö rahastamise eest. Minu tänusõnad kuuluvad ka Viljarile, kes oli abiks ja nõustajana molekulaarse klonereimise planeerimisel. Samuti tahan tänada ka Annikat, selle eest et ta tegutses minuga ja näitas palju uusi laborivõtteid kui ma valmistasin töös kasutatud plasmidi. Täna ka Marianni töö puudutavate diskussioonide eest ja meie väikse rühma koosolekute organiseerimise eest. Täna ka kõiki teisi rakubioloogia inimesi huvitava ja mõnusa atmosfääri eest!

## KIRJANDUSE LOETELU

- Achache, H., & Revel, A. (2006). Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. *Human Reproduction Update*, 12(6), 731–746. <http://doi.org/10.1093/humupd/dml004>
- Aharon, A., & Brenner, B. (2009). Microparticles and placental hemostasis. *Thrombosis Research*, 123 Suppl (SUPPL. 2), S88–92. [http://doi.org/10.1016/S0049-3848\(09\)70019-2](http://doi.org/10.1016/S0049-3848(09)70019-2)
- Aronow, B. J., Richardson, B. D., & Handwerger, S. (2001). Microarray analysis of trophoblast differentiation: gene expression reprogramming in key gene function categories. *Physiological Genomics*, 6(2), 105–116.
- Baczyk, D., Dunk, C., Huppertz, B., Maxwell, C., Reister, F., Giannoulas, D., & Kingdom, J. C. P. (2006). Bi-potential behaviour of cytotrophoblasts in first trimester chorionic villi. *Placenta*, 27(4-5), 367–374. <http://doi.org/10.1016/j.placenta.2005.03.006>
- Barney, L. E., Dandley, E. C., Jansen, L. E., Reich, N. G., Mercurio, A. M., & Peyton, S. R. (2015). A cell-ECM screening method to predict breast cancer metastasis. *Integrative Biology: Quantitative Biosciences from Nano to Macro*, 7(2), 198–212. <http://doi.org/10.1039/c4ib00218k>
- Bauvois, B. (2012). New facets of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 as cell surface transducers: outside-in signaling and relationship to tumor progression. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1825(1), 29–36. <http://doi.org/10.1016/j.bbcan.2011.10.001>
- Bazer, F. W., Spencer, T. E., Johnson, G. a., Burghardt, R. C., & Wu, G. (2009). Comparative aspects of implantation. *Reproduction*, 138(2), 195–209. <http://doi.org/10.1530/REP-09-0158>
- Candiano, G., Bruschi, M., Musante, L., Santucci, L., Ghiggeri, G. M., Carnemolla, B., ... Righetti, P. G. (2004). Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis*, 25(9), 1327–33. <http://doi.org/10.1002/elps.200305844>
- Carson, D. D., Bagchi, I., Dey, S. K., Enders, a C., Fazleabas, a T., Lessey, B. a, & Yoshinaga, K. (2000). Embryo implantation. *Developmental Biology*, 223(2), 217–237. <http://doi.org/10.1006/dbio.2000.9767>
- Chang, C., Goel, H. L., Gao, H., Pursell, B., Shultz, L. D., Greiner, D. L., ... Mercurio, A. M. (2015). A laminin 511 matrix is regulated by TAZ and functions as the ligand for the  $\alpha 6 \beta 1$  integrin to sustain breast cancer stem cells. *Genes & Development*, 29(1), 1–6. <http://doi.org/10.1101/gad.253682.114>
- Clancy, J. W., Sedgwick, A., Rosse, C., Muralidharan-Chari, V., Raposo, G., Method, M., ... D'Souza-Schorey, C. (2015). Regulated delivery of molecular cargo to invasive tumour-derived microvesicles. *Nature Communications*, 6, 6919. <http://doi.org/10.1038/ncomms7919>

- Clark, P. a, Xie, J., Li, S., Zhang, X., Coonrod, S., & Roberson, M. S. (2013). Matrix metalloproteinase 9 is a distal-less 3 target-gene in placental trophoblast cells. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 305(2), C173–81. <http://doi.org/10.1152/ajpcell.00205.2012>
- Colombo, M., Moita, C., van Niel, G., Kowal, J., Vigneron, J., Benaroch, P., ... Raposo, G. (2013). Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *Journal of Cell Science*, 126(Pt 24), 5553–65. <http://doi.org/10.1242/jcs.128868>
- Cottrell, E. C., & Seckl, J. R. (2009). Prenatal stress, glucocorticoids and the programming of adult disease. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 3(September), 19. <http://doi.org/10.3389/neuro.08.019.2009>
- Delorme-Axford, E., Donker, R. B., Mouillet, J.-F., Chu, T., Bayer, A., Ouyang, Y., ... Coyne, C. B. (2013). Human placental trophoblasts confer viral resistance to recipient cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(29), 12048–53. <http://doi.org/10.1073/pnas.1304718110>
- Desgrosellier, J. S., & Cheresch, D. a. (2010). Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nature Reviews. Cancer*, 10(1), 9–22. <http://doi.org/10.1038/nrc2965>
- Ding, J., Huang, F., Wu, G., Han, T., Xu, F., Weng, D., ... Zhu, X. (2015). MiR-519d-3p Suppresses Invasion and Migration of Trophoblast Cells via Targeting MMP-2. *Plos One*, 10(3), e0120321. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0120321>
- Dominguez, F., Yáñez-Mó, M., Sanchez-Madrid, F., & Simón, C. (2005). Embryonic implantation and leukocyte transendothelial migration: different processes with similar players? *The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 19(9), 1056–1060. <http://doi.org/10.1096/fj.05-3781hyp>
- Dragovic, R. a, Southcombe, J. H., Tannetta, D. S., Redman, C. W. G., & Sargent, I. L. (2013). Multicolor flow cytometry and nanoparticle tracking analysis of extracellular vesicles in the plasma of normal pregnant and pre-eclamptic women. *Biology of Reproduction*, 89(6), 151. <http://doi.org/10.1095/biolreprod.113.113266>
- Elad, D., Levkovitz, R., Jaffa, A. J., Desoye, G., & Hod, M. (2014). Have We Neglected the Role of Fetal Endothelium in Transplacental Transport? *Traffic*, 15(1), 122–126. <http://doi.org/10.1111/tra.12130>
- Fitzpatrick, K. E., Sellers, S., Spark, P., Kurinczuk, J. J., Brocklehurst, P., & Knight, M. (2013). The management and outcomes of placenta accreta , increta , and percreta in the UK : a population-based descriptive study, 62–71. <http://doi.org/10.1111/1471-0528.12405>
- Fournier, T., Guibourdenche, J., & Evain-Brion, D. (2015). Review: hCGs: Different sources of production, different glycoforms and functions. *Placenta*, 36, S60–S65. <http://doi.org/10.1016/j.placenta.2015.02.002>

- Gnainsky, Y., Granot, I., Aldo, P. B., Barash, A., Or, Y., Schechtman, E., ... Dekel, N. (2010). Local injury of the endometrium induces an inflammatory response that promotes successful implantation. *Fertility and Sterility*, 94(6), 2030–2036. <http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.02.022>
- Göhner, C., Weber, M., Tannetta, D. S., Groten, T., Plösch, T., Faas, M. M., ... Fitzgerald, J. S. (2015). A New Enzyme-linked Sorbent Assay (ELSA) to Quantify Syncytiotrophoblast Extracellular Vesicles in Biological Fluids. *American Journal of Reproductive Immunology*, 73, n/a–n/a. <http://doi.org/10.1111/aji.12367>
- Graham, C. H., Hawley, T. S., Hawley, R. G., Macdougall, J. R., Kerbel, R. S., Khoo, N., & Lala, P. K. (1993). Establishment and characterization of first trimester human trophoblast cells with extended lifespan. *Experimental Cell Research*, 206(2), 204–211. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0027327733&partnerID=tZOtx3y1>
- Gruenwald, P. (1977). The development of the placental lobular pattern in the human. Review and reinterpretation of the material. *Obstetrics and Gynecology*. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0017690716&partnerID=tZOtx3y1>
- Haider, S., Meinhardt, G., Velicky, P., Otti, G. R., Whitley, G., Fiala, C., ... Knöfler, M. (2014). Notch signaling plays a critical role in motility and differentiation of human first-trimester cytotrophoblasts. *Endocrinology*, 155(1), 263–274. <http://doi.org/10.1210/en.2013-1455>
- Halasz, M., & Szekeres-Bartho, J. (2013). The role of progesterone in implantation and trophoblast invasion. *Journal of Reproductive Immunology*, 97(1), 43–50. <http://doi.org/10.1016/j.jri.2012.10.011>
- Hannan, N. J., Paiva, P., Dimitriadis, E., & Salamonsen, L. a. (2010). Models for study of human embryo implantation: choice of cell lines? *Biology of Reproduction*, 82(2), 235–245. <http://doi.org/10.1095/biolreprod.109.077800>
- Hunter, M. P., Ismail, N., Zhang, X., Aguda, B. D., Lee, E. J., Yu, L., ... Marsh, C. B. (2008). Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS ONE*, 3(11). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0003694>
- HYNES, R. (1987). Integrins: A family of cell surface receptors. *Cell*, 48(4), 549–554. [http://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90233-9](http://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90233-9)
- Hynes, R. O. (2002). Integrins Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. *Cell*, 110(6), 673–687. [http://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00971-6](http://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00971-6)
- Inal, J. M., Ansa-Addo, E. a, Stratton, D., Kholia, S., Antwi-Baffour, S. S., Jorfi, S., & Lange, S. (2012). Microvesicles in health and disease. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 60(2), 107–21. <http://doi.org/10.1007/s00005-012-0165-2>
- Ishikawa, A., Omata, W., Ackerman, W. E., Takeshita, T., Vandr , D. D., & Robinson, J. M. (2014). Cell fusion mediates dramatic alterations in the actin cytoskeleton, focal adhesions, and E-cadherin in trophoblastic cells. *Cytoskeleton*, 71(4), 241–256. <http://doi.org/10.1002/cm.21165>

- Ishikawa, T., Wondimu, Z., Oikawa, Y., Ingerpuu, S., Virtanen, I., & Patarroyo, M. (2014). Monoclonal antibodies to human laminin  $\alpha 4$  chain globular domain inhibit tumor cell adhesion and migration on laminins 411 and 421, and binding of  $\alpha 6\beta 1$  integrin and MCAM to  $\alpha 4$ -laminins. *Matrix Biology : Journal of the International Society for Matrix Biology*, *36*, 5–14. <http://doi.org/10.1016/j.matbio.2014.03.003>
- Knöfler, M. (2010). Critical growth factors and signalling pathways controlling human trophoblast invasion. *International Journal of Developmental Biology*, *54*(2-3), 269–280. <http://doi.org/10.1387/ijdb.082769mk>
- Knott, J. G., & Paul, S. (2014). Transcriptional regulators of the trophoblast lineage in mammals with hemochorial placentation. *Reproduction*, *148*(6), R121–R136. <http://doi.org/10.1530/REP-14-0072>
- Kryczka, J., Stasiak, M., Dzikis, L., Mik, M., Dziki, A., & Cierniewski, C. S. (2012). Matrix metalloproteinase-2 cleavage of the  $\beta 1$  integrin ectodomain facilitates colon cancer cell motility. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(43), 36556–36566. <http://doi.org/10.1074/jbc.M112.384909>
- Liao, W.-C., Liu, C.-H., Chen, C.-H., Hsu, W.-M., Liao, Y.-Y., Chang, H.-M., ... Shyu, M.-K. (2015).  $\beta$ -1,4-galactosyltransferase III suppresses extravillous trophoblast invasion through modifying  $\beta 1$ -integrin glycosylation. *Placenta*, *36*(4), 357–64. <http://doi.org/10.1016/j.placenta.2015.01.008>
- Lima, P. Da, Zhang, J., Dunk, C., Lye, S. J., & Anne Croy, B. (2014). Leukocyte driven-decidual angiogenesis in early pregnancy. *Cellular & Molecular Immunology*, (May), 522–537. <http://doi.org/10.1038/cmi.2014.63>
- Liu, H., Li, Y., Zhang, J., Rao, M., Liang, H., & Liu, G. (2015). The defect of both angiogenesis and lymphangiogenesis is involved in preeclampsia. *Placenta*, *36*(3), 279–286. <http://doi.org/10.1016/j.placenta.2014.12.013>
- Lokossou, A. G., Toudic, C., & Barbeau, B. (2014). Implication of human endogenous retrovirus envelope proteins in placental functions. *Viruses*, *6*(11), 4609–27. <http://doi.org/10.3390/v6114609>
- Lunghi, L., Ferretti, M. E., Medici, S., Biondi, C., & Vesce, F. (2007). Control of human trophoblast function. *Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E*, *5*, 6. <http://doi.org/10.1186/1477-7827-5-6>
- Mathivanan, S., Ji, H., & Simpson, R. J. (2010). Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *Journal of Proteomics*, *73*(10), 1907–20. <http://doi.org/10.1016/j.jprot.2010.06.006>
- Mercurio, A. M., Rabinovitz, I., & Shaw, L. M. (2001). The  $\alpha 6\beta 4$  integrin and epithelial cell migration. *Current Opinion in Cell Biology*, *13*(5), 541–545. [http://doi.org/10.1016/S0955-0674\(00\)00249-0](http://doi.org/10.1016/S0955-0674(00)00249-0)
- Montoro-García, S., Shantsila, E., Marín, F., Blann, A., & Lip, G. Y. H. (2011). Circulating microparticles: new insights into the biochemical basis of microparticle release and activity. *Basic Research in Cardiology*, *106*(6), 911–23. <http://doi.org/10.1007/s00395-011-0198-4>

- Morel, O., Jesel, L., Freyssinet, J.-M., & Toti, F. (2011). Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *31*(1), 15–26. <http://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.200956>
- Moser, G., Gauster, M., Orendi, K., Glasner, a., Theuerkauf, R., & Huppertz, B. (2010). Endoglandular trophoblast, an alternative route of trophoblast invasion? Analysis with novel confrontation co-culture models. *Human Reproduction*, *25*(5), 1127–1136. <http://doi.org/10.1093/humrep/deq035>
- Moser, G., Orendi, K., Gauster, M., Siwetz, M., Helige, C., & Huppertz, B. (2011). The art of identification of extravillous trophoblast. *Placenta*, *32*(2), 197–9. <http://doi.org/10.1016/j.placenta.2010.11.008>
- Mouillet, J. F., Ouyang, Y., Bayer, A., Coyne, C. B., & Sadovsky, Y. (2014). The role of trophoblastic microRNAs in placental viral infection. *International Journal of Developmental Biology*, *58*(2-4), 281–289. <http://doi.org/10.1387/ijdb.130349ys>
- Nishida-Aoki, N., & Ochiya, T. (2015). Interactions between cancer cells and normal cells via miRNAs in extracellular vesicles. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, *72*(10), 1849–61. <http://doi.org/10.1007/s00018-014-1811-0>
- Oefner, C. M., Sharkey, a., Gardner, L., Critchley, H., Oyen, M., & Moffett, a. (2015). Collagen type IV at the fetal–maternal interface. *Placenta*, *36*(1), 59–68. <http://doi.org/10.1016/j.placenta.2014.10.012>
- Oksvold, M. P., Neurauter, A., & Pedersen, K. W. (2015). Magnetic bead-based isolation of exosomes. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *1218*, 465–81. [http://doi.org/10.1007/978-1-4939-1538-5\\_27](http://doi.org/10.1007/978-1-4939-1538-5_27)
- Ouyang, Y., Mouillet, J. F., Coyne, C. B., & Sadovsky, Y. (2014). Review: Placenta-specific microRNAs in exosomes - Good things come in nano-packages. *Placenta*, *35*(SUPPL), S69–S73. <http://doi.org/10.1016/j.placenta.2013.11.002>
- Pink, M., Verma, N., Rettenmeier, A. W., & Schmitz-Spanke, S. (2010). CBB staining protocol with higher sensitivity and mass spectrometric compatibility. *Electrophoresis*, *31*(4), 593–8. <http://doi.org/10.1002/elps.200900481>
- Plaisier, M. (2011). Decidualisation and angiogenesis. *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology*, *25*(3), 259–271. <http://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2010.10.011>
- Pollheimer, J., Fock, V., & Knöfler, M. (2014). Review: The ADAM metalloproteinases - Novel regulators of trophoblast invasion? *Placenta*, *35*(SUPPL), 57–63. <http://doi.org/10.1016/j.placenta.2013.10.012>
- Redman, C. W. G., & Sargent, I. L. (2007). Microparticles and immunomodulation in pregnancy and pre-eclampsia. *Journal of Reproductive Immunology*, *76*(1-2), 61–67. <http://doi.org/10.1016/j.jri.2007.03.008>
- Redman, C. W. G., & Sargent, I. L. (2008). Circulating Microparticles in Normal Pregnancy and Pre-Eclampsia. *Placenta*, *29*(SUPPL.), 73–77. <http://doi.org/10.1016/j.placenta.2007.11.016>



- Revenfeld, A. L. S., Bæk, R., Nielsen, M. H., Stensballe, A., Varming, K., & Jørgensen, M. (2014). Diagnostic and prognostic potential of extracellular vesicles in peripheral blood. *Clinical Therapeutics*, 36(6), 830–846. <http://doi.org/10.1016/j.clinthera.2014.05.008>
- Rossant, J., & Cross, J. C. (2001). Placental development: lessons from mouse mutants. *Nature Reviews. Genetics*, 2(7), 538–48. <http://doi.org/10.1038/35080570>
- Salomon, C., Sarah, Y., Scholz-Romero, K., Kobayashi, M., Vaswani, K., Kvaskoff, D., ... Rice, G. E. (2014). Extravillous trophoblast cells-derived exosomes promote vascular smooth muscle cell migration. *Frontiers in Pharmacology*, 5 JUL(August), 1–13. <http://doi.org/10.3389/fphar.2014.00175>
- Salomon, C., Torres, M. J., Kobayashi, M., Scholz-Romero, K., Sobrevia, L., Dobierzewska, A., ... Rice, G. E. (2014). A gestational profile of placental exosomes in maternal plasma and their effects on endothelial cell migration. *PLoS ONE*, 9(6). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0098667>
- Sarker, S., Scholz-Romero, K., Perez, A., Illanes, S. E., Mitchell, M. D., Rice, G. E., & Salomon, C. (2014). Placenta-derived exosomes continuously increase in maternal circulation over the first trimester of pregnancy. *Journal of Translational Medicine*, 12(1), 204. <http://doi.org/10.1186/1479-5876-12-204>
- Taglauer, E. S., Wilkins-Haug, L., & Bianchi, D. W. (2014). Review: Cell-free fetal DNA in the maternal circulation as an indication of placental health and disease. *Placenta*, 35(SUPPL), S64–S68. <http://doi.org/10.1016/j.placenta.2013.11.014>
- Tanaka, T., Wang, C., & Umesaki, N. (1998). Remodeling of the human endometrial epithelium is regulated by laminin and type IV collagen. *International Journal of Molecular Medicine*, 23(2), 173–180. [http://doi.org/10.3892/ijmm\\_00000114](http://doi.org/10.3892/ijmm_00000114)
- Théry, C., Boussac, M., Véron, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., Garin, J., & Amigorena, S. (2001). Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: A secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *Journal of Immunology*, 166(12), 7309–7318. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0035877018&partnerID=tZOtx3y1>
- Thuma, F., & Zöller, M. (2014). Outsmart tumor exosomes to steal the cancer initiating cell its niche. *Seminars in Cancer Biology*. <http://doi.org/10.1016/j.semcancer.2014.02.011>
- Vlassov, A. V, Magdaleno, S., Setterquist, R., & Conrad, R. (2012). Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1820(7), 940–8. <http://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.03.017>
- Zhang, Q., Zhang, H., Jiang, Y., Xue, B., Diao, Z., Ding, L., ... Hu, Y. (2015). MicroRNA-181a is involved in the regulation of human endometrial stromal cell decidualization by inhibiting Krüppel-like factor 12. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 13(1), 1–9. <http://doi.org/10.1186/s12958-015-0019-y>
- Zhou, Y., Fisher, S. J., Janatpour, M., Genbacev, O., Dejana, E., Wheelock, M., & Damsky, C. H. (1997). Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate:

A strategy for successful endovascular invasion? *Journal of Clinical Investigation*, 99(9), 2139–2151. <http://doi.org/10.1172/JCI119387>

## LIHTLITSENTS

### **Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina Artjom Stepanjuk (*autori nimi*)

(sünnikuupäev: 03.11.1991)

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

„Integriinide modifitseerimine trofoblastide poolt sekreteeritud mikrovesiikulites ning tetraspaniin CD63 ja CFP liitvalgu saamine“ ,

(*lõputöö pealkiri*)

mille juhendajad on Sulev Ingerpuu ja Andres Salumets, (*juhendajate nimed*)

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **1.01.2018** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 26.05.2015 (*kuupäev*)