

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT  
RAKUBIOLOOGIA ÕPPETOOL

Arina Lavrits

**Trofoblasti rakuliini JAR rakkude poolt toodetud laminiinide 111 ja 511 sekretsioon  
ning rakuvälise maatriksi moodustamine**

Bakalaureusetöö

Juhendajad:  
Sulev Ingerpuu, dotsent

TARTU 2014

## SISUKORD

|   |    |
|---|----|
| SISUKORD .....  | 2  |
| KASUTATUD LÜHENDID .....  | 4  |
| SISSEJUHATUS.....   | 5  |
| 1. Kirjanduse ülevaade .....  | 7  |
| 1.1. Laminiinid.....  | 7  |
| 1.2. Ekstratsellulaarsete vesiikulite tüübid.....   | 9  |
| 1.2.1. Mikrovesiikulid. ....  | 10 |
| 1.2.1.1. Mikrovesiikulite teke. ....  | 10 |
| 1.2.1.2. Mikrovesiikulite seostumine sihtmärkrakkudega. ....                                  | 14 |
| 1.2.1.3. Mikrovesiikulite funktsioonid. ....  | 15 |
| 1.2.1.4. Mikrovesiikulid sisaldavad maatriks metalloproteaase (MMP). ....                     | 16 |
| 1.2.2. Apoptootilised kehad.....  | 17 |
| 1.2.3. Eksosoomid. ....   | 17 |
| 1.3. Erinevatele rakkudele omased sekretsiooni tüübid.....                                    | 19 |
| 1.4. Platsenta .....  | 21 |
| 1.5. Trofoblastid.....  | 22 |
| 1.6. Ekstratsellulaarne maatriks (ECM).....   | 23 |
| 2. Eksperimentaalne osa .....   | 25 |
| 2.1 Töö eesmärgid.....  | 25 |
| 2.2. Materjalid ja meetodika .....  | 26 |
| 2.2.1. Kasutatud antikehad .....  | 26 |
| 2.2.1.1. Western Blot analüüsil kasutatud antikehad.....                                      | 26 |
| 2.2.1.2. Immunofluorestsentsmikroskoopias kasutatud antikehad.....                            | 27 |
| 2.2.2. Kasutatud rakuliin .....   | 28 |
| 2.2.3. Mikrovesiikulite eraldamine .....  | 28 |
| 2.2.4. JAR rakkude tsükloheksimiidiga mõjutamine .....  | 29 |
| 2.2.5. JAR rakkude lüüsimine .....  | 29 |
| 2.2.6. JAR rakkude poolt toodetud rakuvaheaine e ECM-i eraldamine koekultuuri plastikult..... | 29 |
| 2.2.7. Valkude SDS-polüakrüülamiidgeel elektroforees ja <i>Western blot</i> analüüs .....     | 29 |
| 2.2.8. Immunofluorestsentsmikroskoopia .....  | 30 |
| 2.3. Tulemused ja arutelu.....  | 32 |
| 2.3.1. Immunofluorestsentsmikroskoopia.....   | 33 |

|  |    |
|--|----|
| 2.3.2. LM 111 ja LM 511 sekretsioonitüübi määramine.....   | 34 |
| 2.3.3. Laminiinide proteolüütilise töötlemise tuvastamine JAR rakkudes.....  | 38 |
| 2.3.3.1. Laminiini $\alpha$ 1-, $\alpha$ 5- ja $\beta$ 1-ahelad rakulüsaatides. ....   | 39 |
| 2.3.3.2. Laminiinide $\alpha$ 1-, $\alpha$ 5- ja $\beta$ 1-ahelate tuvastamine JAR rakkude kasvukeskkonnast. ....                      | 39 |
| 2.3.3.3. Laminiinide $\alpha$ 1-, $\alpha$ 5- ja $\beta$ 1-ahelate tuvastamine JAR rakkude poolt sekreteeritud mikrovesiikulites. .... | 40 |
| 2.3.3.4. Laminiinide 111 ja 511 tuvastamine JAR rakkude poolt tekitatud maatriksist. ....  | 41 |
| 2.3.3.5. Laminiinide $\alpha$ 1-, $\alpha$ 5- ja $\beta$ 1-ahelate proteolüütiline muster. ....  | 42 |
| KOKKUVÕTE.....   | 44 |
| SUMMARY .....  | 46 |
| KASUTATUD KIRJANDUS .....  | 47 |
| KASUTATUD VEEBIAADRESSID .....   | 58 |
| LIHTLITSENTS .....   | 60 |
| TÄNUSÕNAD .....  | 59 |

## KASUTATUD LÜHENDID

- CCR5 – C-C kemokiinne retseptor tüüp 5 (ingl. k. *C-C chemokine receptor type 5*)
- CHX – tsükloheksimiid (ingl. k. *cycloheximide*)
- COX-2 – tsüklooksügenaas (ingl. k. *cyclooxygenase-2*)
- DAPI - 4',6-diamidino-2-fenüülindool
- ECM – rakuvaheaine ehk ekstratsellulaarne maatriks (ingl. k. *extracellular matrix*)
- EDTA - etüleendiamiintetraädikhape (ingl. k. *ethylenediaminetetraacetic acid*)
- ER – tsütoplasma võrgustik ehk endoplasmaatiline retiikulum (ingl. k. *endoplasmic reticulum*)
- FCS - veise loote seerum (ingl. k. *fetal calf serum*)
- GAG – glükoosamiinoglükaan (ingl. k. *glycosaminoglycan*)
- GPK – Golgi-plasmamembraan kandja
- hCG – inimese koorioni gonadotropiin (ingl. k. *human chorionic gonadotropin*)
- hPL – inimese platsenta laktogeen (ingl. k. *human placenta lactogene*)
- HIV – inimese immuundefitsiitsust põhjustav viirus (ingl. k. *human immunodeficiency virus*)
- LM – laminiin
- MAK – monoklonaalne antikeha
- MHC II – peamine koesobivuskompleks tüüp II (ingl. k. *major histocompatibility complex type II*)
- MMP - maatriks metalloproteinaas (ingl. k. *matrix metalloproteinase*)
- PAK – polükloonaalne antikeha
- PBS – fosfaadiga puhverdatud soolalahus (ingl. k. *phosphate buffered saline*)
- PMSF – fenüülmetüülsulfonüülfluoriid (ingl. k. *phenylmethylsulfonyl fluoride*)
- PS – fosfatidüülseriin (ingl. k. *phosphatidylserine*)
- PSGL-1 – P-selektiini glükoproteiinne ligand-1 (ingl. k. *P-selectin glycoprotein ligand-1*)
- PVDF – polüvinülideenfluoriid (ingl. k. *polyvinylidene fluoride*)
- ROCK – *Rho*-ga seotud proteiinkinaas I (ingl. k. *Rho-associated protein kinase I*)
- SG – sekretoorne graanul
- TGN – *trans*-Golgi võrgustik (ingl. k. *trans-Golgi network*)
- Tris – tris(hüdroksümetüül)aminometaan

## SISSEJUHATUS

Trofoblastide põhiliseks ülesandeks on ankurdada platsenta emakaseinale ja varustada loodet piisava hulga toitainetega. On kaks põhilist trofoblastide tüüpi – süntsütio- ja tsütotrofoblastid. Süntsütiotrofoblastid tungivad ümbritsevasse koesse sekreteerides proteolüütilisi ensüüme, et lagundada endomeetriumi strooma valke ja rakuvälise maatriksi (ECM) makromolekule, sealhulgas ka laminiine, millede külge nad seostuvad migreerumise käigus. Tsütotrofoblastid on paljunemisvõimelised rakud, mis diferentseeruvad kas süntsütiotrofoblastideks või hattudevälisteks trofoblastideks. Hattude sees asuvad tsütotrofoblastid loote veresoonte endoteeli rakkude pinnal. Mõlemad rakutüübid ladestavad ECM makromolekule, valdavalt laminiine, mis moodustavad basaalmembraani, mis on ECM erivorm. Nii toitained kui ka laguproduktid läbivad selle „laminiini filtri“, mis omakorda tagab efektiivse ainevahetuse loote- ja ema vere vahel. Laminiinid mängivad olulist rolli raseduse toetamises: nad soodustavad trofoblastide migreerumist, platsenta ankurdamist emakaseinale ja vastutavad ainevahetuse eest ema ja loote organismi vahel. Sellest lähtuvalt võivad laminiinide sekretsiooni häired rikkuda loote normaalset arengut.

Meie töö eesmärgiks oli kindlaks teha, millist tüüpi sekretsiooniga on tegemist kui koorioni kartsinoomi JAR rakkude poolt sekreteeritakse laminiine (LM) 111 ja 511 rakkudevälisesse keskkonda. Praeguseks on teada, et enamuse ECM makromolekule sekreteeritakse konstitutiivselt. Laminiinide pidev väljaviskamine on eriti iseloomulik vähirakkudele, sest nende põhiliseks ülesandeks on migreeruda ümbritsevasse kudedesse, tekitades metastaase. Kuna trofoblastid käituvad väga sarnaselt vähirakkudega, siis me eeldasime, et ka nemad sekreteerivad laminiine konstitutiivset rada pidi. Rakud sekreteerivad valke nii vabal kujul kui ka vesiikulite koosseisus. On teada, et trofoblastide mikrovesiikulid võivad esile kutsuda B-, T-rakkude ja makrofaagide immuunvastuse (Southcombe jt., 2011; Pap jt., 2008). Samas on väga vähe teada selle kohta, millist osa mängivad mikrovesiikulid laminiinide sekretsioonis ja ECM-i ladestamises. Me leidsime, et JAR rakuliini rakud, kui oma olemuselt süntsütiotrofoblastid, võiksid olla sobivaks mudeliks nende küsimuste lahendamisel.

On teada, et trofoblastid kasutavad laminiine endomeetriumi strooma rakkude vahel liikumiseks, kuid pole teada, kuidas toimub nende valkude sekreteerimine ja ladustamine stroomarakkude vahelisse maatriksisse. Samal ajal on teada, et trofoblastid sünteesivad aktiivselt maatriksmetalloproteaase (MMP), mille põhiliseks funktsiooniks on lagundada ECM makromolekule ning seetõttu võib eeldada, et laminiinide 111 ja 511 ahelad võiksid

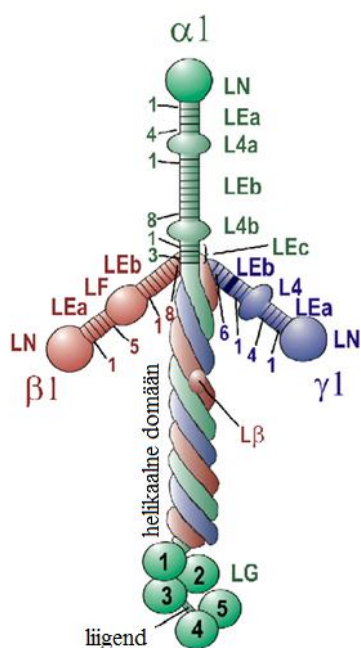
alluda proteolüütilisele töötlusele. Mõned valkude proteolüüsi käigus tekkivad fragmendid muudavad ümbritsevate rakkude käitumist, mõjutades nende diferentseerumist või adhesiooni, kuid soodustavad ka rakkude migreerumist ning lülitavad sisse erinevaid signaaliradasid, mis võivad omakorda aktiveerida geenide ekspressiooni (Faisal Khan jt., 2002; Horejs jt., 2014; Deutzmann jt., 1990). Käesolevas töös me uurisime just JAR rakkude poolt toodetud laminiinide 111 ja 511 sekretsiooni, nende valkude modifitseerimist rakkude kasvukeskkonnas ning ladustamist rakuvälisesse maatriksisse.

# 1. Kirjanduse ülevaade

## 1.1. Laminiinid

Laminiinid on multidomäänsed heterotrimeersed valgud, mis koosnevad kolmest erinevast polüpeptiidahelast:  $\alpha$ ,  $\beta$  ja  $\gamma$ . Need on suured ( $\sim 400$  kuni  $\sim 900$  kDa) (Aumailley jt., 2005) risti- või T-kujulised molekulid kolme lühikese ja ühe pika õlaga. Lühikese õla moodustab kas  $\alpha$ ,  $\beta$  või  $\gamma$  ahel, samas kui pikk õlg koosneb kõigist ahelaist, mis on kokku kõietaoliselt keerdunud. Selgroogsetel on viis  $\alpha$ , kolm  $\beta$  ja kolm  $\gamma$  ahelat. Vaatamata sellele, et need kolm ahelat võiksid anda 45 kombinatsiooni, on tänapäeval leitud ainult 16 laminiinide isovormi (Durbeej, 2010).

Iga ahel on jagatud domäänideks. Neid on kahte tüüpi: globulaarsed ja epidermise kasvufaktorisarnased, kusjuures viimased paiknevad globulaarsete domäänide vahel.  $\alpha$  ahelad erinevad  $\beta$  ja  $\gamma$  ahelatest selle poolest, et nende C-terminaalses otsas paikneb viis homoloogset globulaarset domääni. Peale selle on iga ahela C-terminaalse otsa juures spiraalselt keerdunud piirkonnad, mis omakorda moodustavad domäänid (Joonis 1).



**Joonis 1. Laminiini struktuur.** Joonisel on toodud LM-111.

LN – globulaarne domään ahela N-terminaalses otsas. LG – globulaarne domään  $\alpha$ -ahela C-terminaalses otsas. LF – globulaarne domään  $\beta$ -ahelas. L4 – globulaarne domään  $\alpha$ -,  $\gamma$ -

ahelates. Kui L4 domään on mitu, siis need tähistatakse L4a, L4b, ... LE – epidermise kasvufaktorisarnane domään. LE domäänid tähistatakse väikeste tähtedega ja araabia numbriga.  $\gamma$ 1- ja  $\gamma$ 3-ahelates on nidogeeni siduv domään (joonisel tähistatud tumedana).  $\beta$ -ahela helikaalne domään ( $L\beta$ ) ja  $\alpha$ 1-ahela LG4 domään seostuvad agriiniga (Kadoya jt., 1997; Gersdorff jt., 2005). Liigend on side LG3 ja LG4 vahel (Aumailley jt., 2005). Modifitseeritud (Aumailley jt., 2005) järgi.

Laminiinide trimeerid pannakse kokku rakkude tsütoplasma võrgustikus kolmeastmeliselt, milleks on ahelate väljavahimine, kokkupanemine ja stabiliseerimine (Aumailley ja Smyth, 1998). Igal laminiini ahelal on spetsiifiline aminohappeline järjestus, mille alusel nad üksteisega sobitatakse ja kokku pannakse (Beck jt., 1993). Kuid lisaks spetsiifilistele järjestustele aitavad ka tugevad ioonsed jõud ahelaid koos hoida (Beck jt., 1993). Laminiinide trimeeride kokkupanemine toimub järgmiselt:

1. Laminiini  $\gamma$ 1 ahela C-terminaalses otsas paikneb kümnest aminohappejärgist koosnev peptiid, mis võimaldab  $\beta$  ja  $\gamma$  ahelate vahel moodustada stabiilse disulfiidsideme. (Utani jt., 1994; Yurchenco jt., 1997).
2.  $\alpha$  ahela lisamine vastmoodustunud  $\beta\gamma$ -dimeeri koosseisu. Seda kontrollib piirkond, mis asub N-terminaalses otsas II domäänis (Niimi ja Kitagawa, 1997).

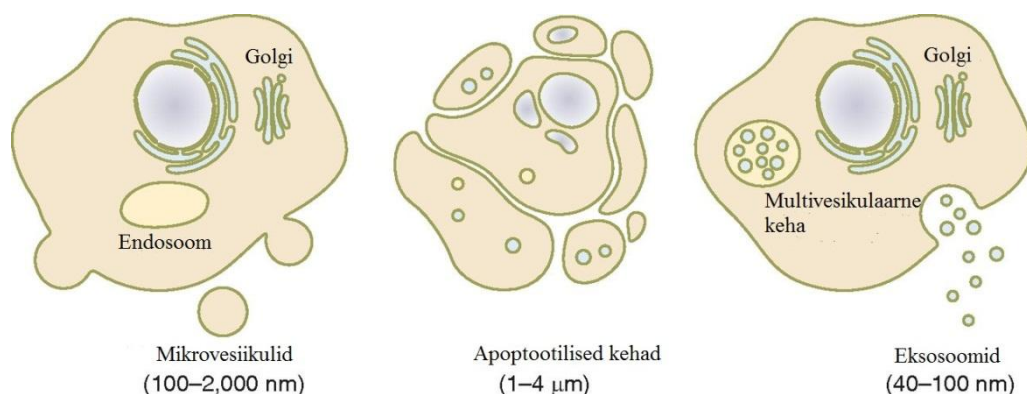
Kui trimeer on moodustunud, siis on see signaaliks, et kompleks tuleb rakust välja sekreteerida (Yurchenco jt., 1997). Heterotrimeeri kokkupanemine ja stabiliseerimine disulfiidsidemete abil on vajalik selleks, et laminiini molekul saaks minna endoplasmaatilisest retiikulumist Golgi kompleksi, kus toimub selle glükosüleerimine, mille järel võib öelda, et heterotrimeer on valmis rakuvälisesse ruumi viimiseks (Cooper jt., 1981). Vastüteesitud ja töödeldud heterotrimeeril lõigatakse enne rakust väljumist ära signaalpeptiid ning rakuvälisesse ruumi sattudes ei toimu enam mingit valgu töötlemist (Aumailley ja Smyth, 1998) (välja arvatud  $\alpha$ 1,  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 ja  $\gamma$ 1 ahelad). Mõned ahelad aga siiski alluvad proteolüütilisele töötlemisele. Näiteks  $\alpha$ 2 ja  $\alpha$ 3 ahelate C-terminaalses otsas paiknevad G4 ja G5 domäänid lõigatakse ära, kuigi mitte alati (Burgeson, 1996). Proteolüütilise töötlemise iseloomulikuks näideteks on  $\gamma$ 2 ahel, sest see tekibki N-terminaalsete otsade III domäänide ärälõikamise tagajärjel (Vailly jt., 1994).

Kõik koespetsiifilised laminiinid erinevad üksteisest ainult  $\alpha$  ahelate poolest. Teiste sõnadega igas konkreetses koes või kudede kogumis sünteesitakse ainult ühte tüüpi  $\alpha$  ahel, samal ajal kui kõik  $\beta$  ja  $\gamma$  ahelate tüübid esinevad igas koes.  $\alpha$  ahelate geenide ekspressiooni



mehhanismid on siiani ebaselged.  $\alpha 1$  ahel ekspresseerub varases embrüos (parietaalses endodermis) (Niimi jt., 2004), neerus (ka loote- ja vastsündinud neerus), võrkkestas ja ajus (Vuolteenaho jt., 1994).  $\alpha 2$  ahelat on leitud võõt- ja südamelihaskoes, perifeerses närvisüsteemis, veresoonte kapillaarses osas ja platsentas (Yurchenco jt., 2004; Korhonen ja Virtanen, 2001).  $\alpha 3$  ahel on laialt levinud epiteelikoos (Goldfinger jt., 1999; Plopper jt., 1996; Esco jt., 2001).  $\alpha 4$  ahela ekspressioon on iseloomulik lihaskoe basaalmembraanile, kopsu- ja närvikoele, aga ka endoteelile ja rasvarakkudele (Ichikawa jt., 2005; Petajaniemi jt., 2002; Pierce jt., 1998; Niimi jt., 1997; Frieser jt., 1997; Iivanainen jt., 1995). Kõige leinumaks ahelaks organismis on  $\alpha 5$ . See on esindatud peaaegu kõigis kudedes (embrüonaalne basaalmembraan, epiteel, endoteel, silelihaskude, närvi ja lihase vahelised sünapsid) (Hallmann jt., 2005; Scheele jt., 2007; Miner, 2008, Tzu ja Marinkovich, 2008).

## 1.2. Ekstratsellulaarsete vesiikulite tüübid.



## Joonis 2. Rakuväliste vesiikulite tüübid.

Mikrovesiikulid moodustuvad raku plasmamembraani väljasopistumisel. Apoptootilised kehad tekivad apoptoosi käigus ja eksosoomid multivesikulaarse keha membraani kokkusulamisel raku plasmamembraaniga, mis põhjustab vesiikulite vabastamist rakuvälisesse ruumi. Modifitseeritud (Turturici jt., 2014) järgi.

Käesoleval hetkel võib öelda, et enamus pro- ja eukarüootide rakke sekreteerivad rakuvälisesse ruumi vesiikuleid. Rahvusvaheline Rakuväliste Vesiikulite Ühing (ingl. k. *International Society for Extracellular Vesicles*) on seisukohal, et rakkude poolt sekreteeritud

vesiikuleid tuleks nimetada „rakuvälisteks“ või siis „ekstratsellulaarseteks“ vesiikuliteks ning need tuleks jagada kolme klassi: eksosoomid, mikrovesiikulid ja apoptootilised kehad. Rakuvälised vesiikulid erinevad suuruse ja tekkimise mehhanismi poolest (Joonis 2).

### **1.2.1. Mikrovesiikulid.**

#### **1.2.1.1. Mikrovesiikulite teke.**

Rakumembraani põhiliseks komponendiks on fosfolipiidid, mis moodustavad kaksikkihti. Fosfolipiid koosneb hüdrofiilsest pea- (glütserool, fosfaatrühm) ja hüdrofoobsest sabaosast (kaks pikka rasvhappe ahelat). Hüdrofiilsed peaosad on pööratud kas tsütoplasma või rakuvälise ruumi poole. Hüdrofoobsed sabaosad paiknevad aga membraani sisemuses. Fosfaatrühma külge on estersideme kaudu kinnitunud aminoalkohol (koliin, etanoolamiin) või aminohape seriin. Kui rakk on vigastamata, siis on tema plasmamembraan asümmeetriline: fosfatidüülseriin ja fosfatidüületanoolamiin paiknevad plasmamembraani siseküljel ning fosfatidüülkoliin koos sfingomüeliiniga välisküljel (Zwaal jt., 1975). Selline asümmeetria säilitatakse tänu kolmele ensüümile: aminofosfolipiid translokaas (flipaas), flopaas, skramblaas (Diaz ja Schroit, 1996; Connor jt., 1992; Seigneuret ja Devaux, 1984).

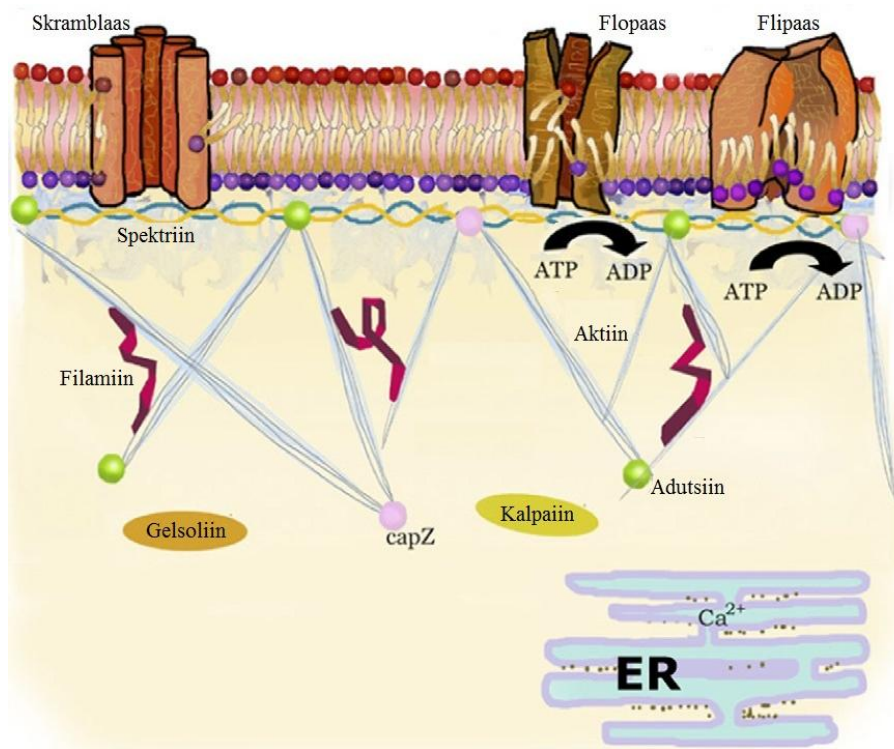
Mikrovesiikulid (diameeter 100 nm-1µm) võivad eralduda paljude erinevat tüüpi rakkude plasmamembraanist. Nende väljasekreeteerimine toimub nii spontaanselt (puhkavas olekus olevast rakust) (Pilzer jt., 2005; Tetta jt., 2011; Gasser ja Schifferli, 2004) kui ka rakkude aktiveerumisel (Barry ja FitzGerald, 1999). Mikrovesiikulite teket kutsuvad esile ka apoptoos, komplemendi süsteemi aktiveerimine (MAC-i ehk „membrane attack complex“ moodustumine rakkude pinnal), rakkude kahjustused ning stress (Horstman jt., 2004; Pilzer jt., 2005).

Mikrovesiikulite väljaviskamisele eelneb  $\text{Ca}^{2+}$ -ioonide taseme tõus raku tsütoplasmas, mille tulemusena aktiveeritakse gelsoliin (esineb paljudes eri tüüpi rakkudes), mis lõikab aktiinifilamente (Harris jt., 1980) ning eemaldab aktiiniga seotud valke (Piccin jt., 2007) (Joonis 3). Sellele lisaks lõikab aktiveerunud kalpaiin ( $\text{Ca}^{2+}$ -sõltuv proteaas) nii aktiini (Piccin jt., 2007) kui ka aktiini ja plasmamembraani kokkusiduvaid valke. Sellisel viisil katkeb plasmamembraani ja tsütoskeleti vaheline ühendus, kuivõrd plasmamembraani all olev tsütoskelett lagundatakse, ning järgneb plasmamembraani pungumine. Lõpptulemusena moodustub vesiikul, mis vabaneb plasmamembraanist (Fox jt., 1990; Fox jt., 1991).

Rakkude plasmamembraanis paiknevad nn „lipiidseid parved“, mis on kolesteroolirikkad piirkonnad, millest just eelistatult toimub mikrovesiikulite väljapungumine. On näidatud, et mida kõrgem on kolesterooli sisaldus, seda rohkem moodustub mikrovesiikuleid. Lisaks sellele on leitud, et lipiidseid parved sisaldavad palju adhesioonimolekule, mille abil mikrovesiikulid seostuvad sihtmärkrakkudega (Del Conde jt., 2005).

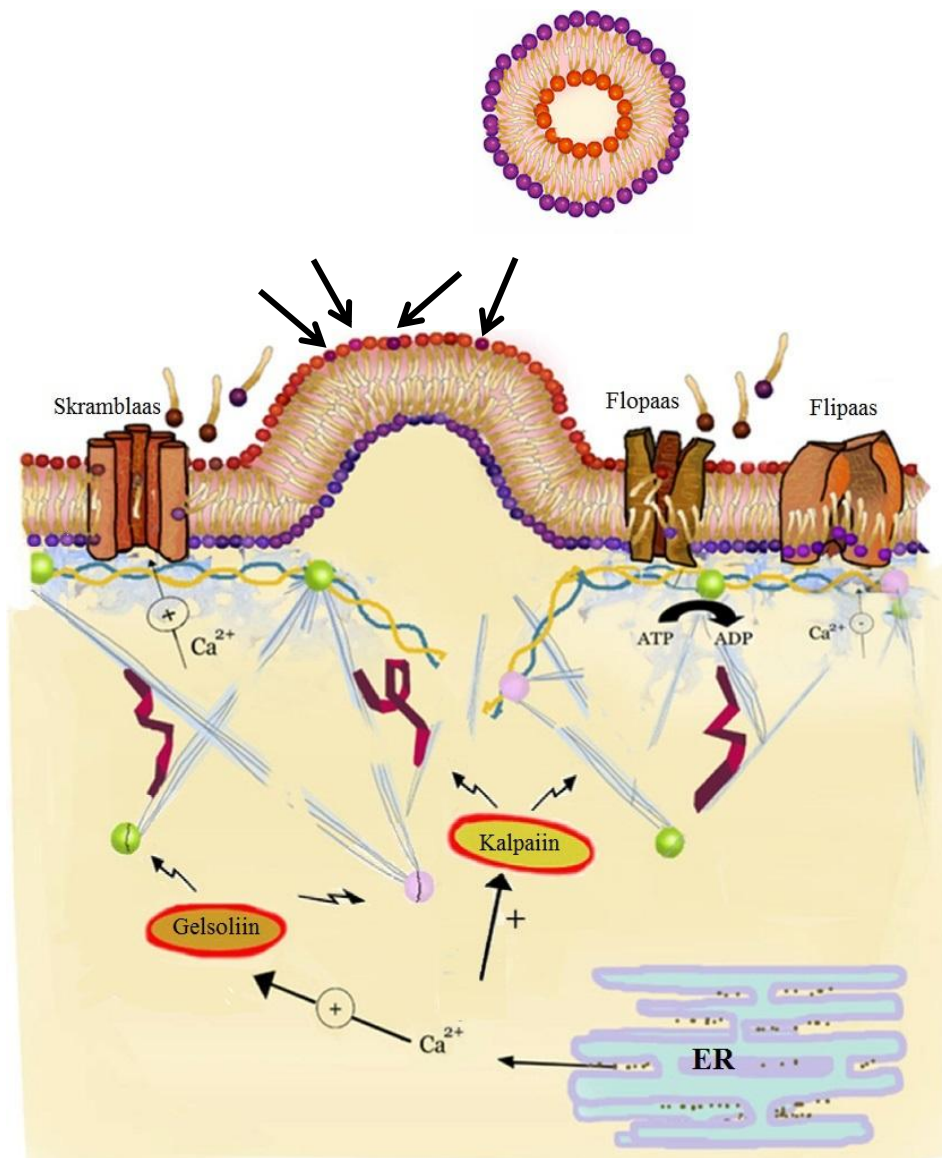
Tsütoplasma võrgustikust vabanenud  $Ca^{2+}$ -ioonid inhibeerivad flipaasi (ATP-sõltuvat translokaasi), mille tagajärjel fosfatidüülseriini ja fosfatidüületanoolamiini transport plasmamembraani välisküljest siseküljele peatub (Seigneuret ja Devaux, 1984; Red jt., 1992). Võrreldes flipaasiga ei ole flopaas fosfolipiidide suhtes spetsiifiline ning seetõttu ei reageeri rakusisese  $Ca^{2+}$ -ioonide taseme tõusule. Tema funktsiooniks on transportida fosfolipiide plasmamembraani siseküljelt välisküljele (nn ABC-tüüpi translokaas). Kuna flopaas transpordib fosfolipiide väiksema kiirusega kui seda teeb flipaas, siis nad ei kompenseeri teineteist, mille tulemusena tagatakse plasmamembraani asümmeetria. Flipaasi inhibeerimisel ei transpordita fosfatidüülseriini ja fosfatidüületanoolamiini plasmamembraani sisepinna, mille tulemusena muutub see sümmeetriliseks (Red jt., 1992; Bitbol & Devaux, 1988; Zwaal ja Schroit, 1997). Kolmas ensüüm, skramblaas, ei sõltu ATP-st. Rakusisese  $Ca^{2+}$ -ioonide kontsentratsiooni järsu tõusu tulemusel see ensüüm aktiveerub ning fosfolipiidiidid paigutatakse plasmamembraanis ümber. Selle tulemusel fosfatidüülseriin ja fosfatidüületanoolamiin liiguvad plasmamembraani välisküljele ning fosfatidüülseriin koos skramblaasiga siseküljele (Williamson jt., 1992; Sahu jt., 2007; Bishop ja Bell, 1985).

See, et fosfatidüülseriin paikneb mikrovesiikulite membraani välispinnal on väga oluline, sest, a) fosfatidüülseriini kogunemine plasmamembraani välispinnale (so negatiivse laengu suurenemine) kutsub esile selle pungumise; b) fosfatidüülseriin soodustab mikrovesiikulite membraani kokkusulamist sihtmärkraku plasmamembraaniga (Del Conde jt., 2005); c) sihtmärkrakkude pinnal paiknevad fosfatidüülseriini-vastased retseptorid, millede läbi toimub mikrovesiikulite seostumine sihtmärkrakuga; d), fosfatidüülseriin soodustab plasmamembraani all asuva tsütoskeleti katkemist (side spektriini ja fosfatidüülseriini vahel katkeb, kuna viimane transporditakse plasmamebraani välispinnale), mis omakorda soodustab mikrovesiikulite teket (Muralidharan-Chari jt., 2010).



**Joonis 3. Puhkavas olekus olev rakk.**

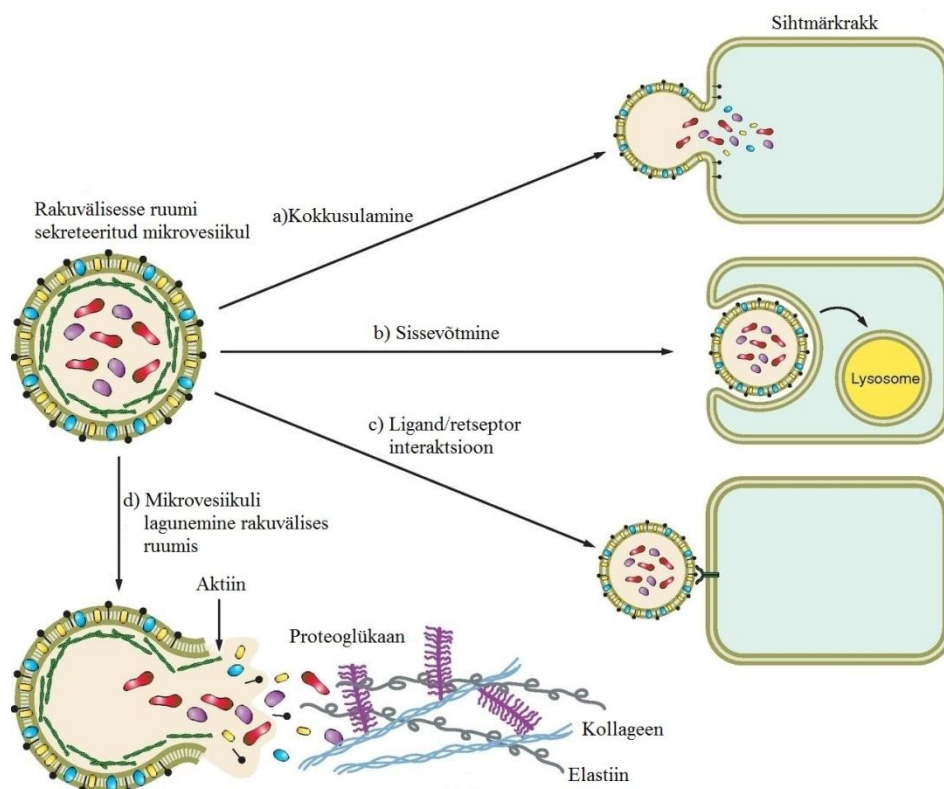
Kui rakk ei ole aktiveerunud, siis hoitakse  $\text{Ca}^{2+}$ -ioone tsütoplasmaõrgustiku valendikus. Fosfatidüülseriin paikneb sellise raku plasmamembraani sisepinnal ja fosfatidüülkoliin välispinnal, kusjuures skramblaas on inaktiivne, aga flopaas ja flipaas aktiivsed. Samal ajal on ka gelsoliin ja kalpaiin inaktiivsed. Aktiin on põhiline tsütoskeleti komponent, mis moodustab raku mikrofilamente. Spektriin, filamiin, aduktiin, capZ ja aktiin on tsütoskeleti valgud. Spektriini abil tekitatakse ühendus aktiinifilamentide ja plasmamembraani vahel, kusjuures seal osalevad veel ka transmembraansed valgud ja fosfolipiidid (Baines, 2009). Filamiin ühendab omavahel aktiinifilamente (Pudas jt., 2005). capZ seostub aktiinifilamentide otstega, takistades seeläbi monomeeride lisamist või kadumist (Yamashita jt., 2003). Aduktiin paikneb aktiini ja spektriini kooshoidvas sõlmes. Selle ülesandeks on soodustada spektriini seostumist aktiinifilamentidega. Nimelt ta seob aktiinifilamente kokku ja seostub ka aktiinifilamentide otstega (Matsuoka jt., 2000). Modifitseeritud (Piccin jt., 2007) järgi.



#### Joonis 4. Mikrovesiikulite moodustumine.

$\text{Ca}^{2+}$ -ioonide kontsentratsiooni tõus raku tsütoplasmas kutsub esile flipaasi aktiivsuse kadumise, millega kaasneb skramblaasi, kalpaiini ja gelsoliini aktiveerumine. Kui skramblaas transpordib fosfolipiide plasmamembraani sisele pinnale, siis gelsoliin eemaldab aktiini filamentide otsedest capZ-i ja aduktiini ning samal ajal lõikab kalpain aktiini ja spektriini molekule. Selle tulemusel transporditakse fosfatidüülseriin plasmamembraani välispinnale ja tsütoskelett lagundatakse. Plasmamembraani pinnal hakkab moodustuma vesiikul, mis sellelt lõpuks vabaneb. Nooled – fosfatidüülseriinid (PS). Modifitseeritud (Piccin jt., 2007) järgi.

### 1.2.1.2. Mikrovesiikulite seostumine sihtmärkrakkudega.



**Joonis 5. Mikrovesiikulite seostumine sihtmärkrakkudega.**

Mikrovesiikulite seostumine sihtmärkrakkudega toimub kolmel viisil:

- Mikrovesiikulite membraan nõ „sulab“ sihtmärkraku plasmamembraaniga kokku ning vesiikuli sisaldised vabanevad sihtmärkraku tsütoplasmasse;
- Terviklikud mikrovesiikulid sisenevad sihtmärkraku endotsütoosi teel. Endotsüteeritud mikrovesiikulid võivad ühineda lüsoosoomiga;
- Mikrovesiikulid seostuvad oma pinnavalkudega sihtmärkrakkude pinnaretseptoritele;
- Mikrovesiikulid on väga ebastabiilsed ja võivad laguneda juba rakkudevahelises ruumis, ilma et toimuks nende seostumist sihtmärkrakuga.

Mikrovesiikulite sisaldisteks on proteoglükaanid, kollageenid ja elastiin. Aktiin paikneb raku vahetult plasmamembraani all. Modifitseeritud (Turturici jt., 2014) järgi.

Mikrovesiikulite seostumine sihtmärkrakkudega ei ole juhuslik ja sõltub nii mikrovesiikulite päritolust, kui ka sihtmärkrakkude tüübist. Näiteks, neutrofiilidest pärit mikrovesiikulid seostuvad monotsüütide ja endoteeliga. Neutrofiilidest pärit mikrovesiikulid seostuvad ka erütrotsüütidega, kuid see toimub komplemendi valkude abil. Nimelt mikrovesiikulitele seostuvad vereseerumist komplemendi valgud ja erütrotsüüdid püüavad need läbi komplemendi retseptori kinni (Gasser jt., 2003; Eken jt., 2013; Gasser ja Schifferli, 2005).

Seevastu trombotsüütidest pärit mikrovesiikulid seostuvad monotsüütide ja endoteelirakkudega, kuid mitte neutrofiilidega (Lösche jt., 2004; Faille jt., 2012). Mikrovesiikulite seostumine sihtmärkrakkudele ning sisenemine tsütoplasmasse toimub kolmel viisil: ühinemine, sissevõtmine (endotsütoos) ja retseptor-ligand seose teke (Joonis 5). Ühinemise puhul mikrovesiikuli membraan sulab sihtmärkraku plasmamembraaniga kokku ning mikrovesiikuli sisaldised vabanevad sihtmärkraku tsütoplasmasse. Seda protsessi reguleerib plasmamembraani valk anneksiin (Köppler jt., 2006). Endotsütoosi korral pakitakse tsütoplasmasse jõudnud mikrovesiikul sihtmärkraku endosoomi. Hiljem võib endosoom ühineda lüsoosoomiga (Faille jt., 2012) või ka plasmamebraaniga, sekreteerides sissevõetud mikrovesiikuli rakuvälisesse ruumi tagasi. Näiteks, monotsüüdid on võimelised fagotsüteerima neutrofiilidest pärit mikrovesiikuleid (Gasser jt., 2003). Kui tekib side mikrovesiikuli pinnal paikneva valgu ja sihtmärkraku pinnal paikneva retseptori vahel (retseptor-ligand seos), siis järgneb sellele mitmete signaaliradade aktiveerumine sihtmärkrakkude tsütoplasmas. Näiteks, neutrofiilidest pärit mikrovesiikulid seostuvad makrofaagide pinnale läbi fosfatidüülseriini vastase retseptori, blokeerides sellega makrofaagide poolt esilekutsutud põletikulist vastust (Gasser ja Schifferli, 2004). Lisaks sellele võib mikrovesiikul oma pinnalt kanda antigeene üle sihtmärkraku pinnale (Janowska-Wieczorek jt., 2001).

### **1.2.1.3. Mikrovesiikulite funktsioonid.**

Mikrovesiikulite funktsioonid sõltuvad enamasti nende päritolust st, selle raku koelisest päritolust kust nad tekivad. Mikrovesiikulid mõjutavad sihtmärkrakke retseptor-ligand seose kaudu ning sellega, et kannavad oma pinnaretseptoreid sihtmärkraku plasmamembraani. Lisaks sellele mikrovesiikulid sisaldavad bioaktiivseid lipiide, mRNA-d, miRNAd ja teisi aineid, mis sattudes sihtmärkrakusse muudavad selle metabolismi. Vähirakkude poolt sekreteeritud mikrovesiikulid, mis lagunevad rakuvälises keskkonnas, vabastavad sinna maatriks metalloproteaase ja angiogeneesi faktoreid (Taraboletti jt., 2006).

1. Retseptor-ligand seostumine. Kui neutrofiile aktiveerida stimuleerivate ainetega, siis nende poolt sekreteeritud mikrovesiikulid ekspresseerivad oma pinnal integriini  $\alpha_M\beta_2$  funktsionaalset vormi ja P-selektiini ligandi. Juhul kui neutrofiilide mikrovesiikulid seostuvad puhkavate trombotsüütide vastavate pinnaretseptoritega, siis põhjustab see nende aktiveerumist. Trombotsüüdid, mis kuuluvad trombi koosseisu, seovad läbi P-selektiin-PSGL-1 kompleksi koefaktorit sisaldavaid mikrovesiikuleid, kutsudes esile koefaktori akumulatsioonide ja koagulatsiooni (Falati jt., 2003; Pluskota jt., 2008). Sama päritoluga mikrovesiikulid toimivad ka endoteelile, stimuleerides tsütokiinide

sekretsiooni, aga ka makrofaagidele, seostudes fosfatidüülseriini ja tema retseptori kaudu. Selliste seoste teke stimuleerib TGF $\beta$ 1 sekretsiooni ja inhibeerib IL-8, -10 ja TNF $\alpha$  sekretsiooni, millega kaasneb põletikulise efekti vähenemine (Gasser ja Schifferli, 2004; Mesri jt., 1999). Aktiveerunud trombotsüütidest pärit mikrovesiikulid seovad P-selektiini kaudu leukotsüüte omavahel, põhjustades nende agregatsiooni (Forlow jt., 2000).

2. Retseptorite ülekanne. Trombotsüütidest pärit mikrovesiikulid kannavad antigeene hematopoeetiliste tüvirakkude pinnale, stimuleerides nende rakkude seostumist fibrinogeenile ja endoteelile, elus püsimist, jagunemist, aga ka erinevate signaaliradade aktiveerumist (Janowska-Wieczorek jt., 2001; Baj-Krzyworzeka jt., 2002). Perifeerse vere mononukleaarsetest rakkudest pärit mikrovesiikulid ekspresseerivad oma pinnal inimese immuundefitsiitsust põhjustava viiruse (HIV) koretseptorit (CCR5). Need mikrovesiikulid kannavad koretseptori nii CCR5<sup>-</sup> monotsüütide kui ka T-rakkude pinnale (Mack jt., 2000).
3. Bioaktiivsed lipiidid. Arahidoonhapest sünteesitakse trombotsüüdis tromboksaan, mis põhjustab rakkude aktivatsiooni ja agregatsiooni. On näidatud, et trombotsüütide mikrovesiikulid sisaldavad arahidoonhapet, mis vesiikulitest vabanedes põhjustab teiste rakkude aktiveerumist. Näiteks arahidoonhape mõjutab nii endoteeli rakke kui ka monotsüüte, indutseerides COX-2 (ensüüm, mis sünteesib prostaglandiine) ekspressiooni (Barry jt., 1999; Barry jt., 1997; Barry jt., 1998).
4. Mikrovesiikulid sisaldavad mRNA-d ja miRNAsid. Vähirakkude poolt sekreteeritud mikrovesiikulid sisaldavad mRNA-d. Väga palju füsioloogilisi katseid on läbiviidud just rakuväliste vesiikulite, so mikrovesiikulite ja eksosoomide seguga. Kui rääkida ainult mikrovesiikulitest, siis Baj-Krzyworzeka jt. (2006) näitasid, et vaatamata sellele, et vähirakkude mikrovesiikulid sisaldavad mRNA-d ei ole selge, kas sihtmärkrakus see mRNA ikkagi transleeritakse. Üldiselt vähirakkude mikrovesiikulid sisaldavad palju faktoreid, mis muudavad sihtmärkrakus geenide ekspressiooni ning lülitavad erinevaid signaalradasid sisse ja välja (Baj-Krzyworzeka jt., 2006).

#### **1.2.1.4. Mikrovesiikulid sisaldavad maatriks metalloproteaase (MMP).**

MMP-sid toodavad suures hulgas just vähirakud, sest nad peavad kudedesse tungimisel ja metastaseerimisel lagundama ekstratsellulaarset maatriksit. Kuid peale selle sünteesivad MMP-sid ka trofoblastid, endoteelirakud ja mesoangioblastid, mis on veresoone läheduses paiknevad multipotentsed tüvirakud. Trofoblastid tungivad endomeetriumi rakkude vahele viisil, mis meenutab vähirakkude liikumist, sekreteerides samal ajal MMP-sid. Samal moel liiguvad mesoangioblastid mööda endoteelirakke põletiku koldesse. Endoteelirakud osalevad aktiivselt angiogeneesi protsessis, mis tähendab uute veresoonte moodustumist. Kõikide



eelnimetatud protsesside puhul mängib ekstratsellulaarse maatriksi ümberkorraldamine suurt rolli ning selles on oluline osa ka MMP-del (Stetler-Stevenson, 1999).

Mikrovesiikulid, mida sekreteerivad munasarja- ja rinnavähist pärit rakuliinid, sisaldavad MMP-2 ja MMP-9. Samad MMP-d on leitud ka endoteelirakkude ja mesoangioblastide mikrovesiikulitest (Taraboletti jt., 2002; Candela jt., 2010). Kui mikrovesiikulid kinnituvad integriinide kaudu ekstratsellulaarse maatriksi valkude külge, siis võivad nad kutsuda esile nende lagundamise (Muralidharan-Chari jt., 2009; Taraboletti jt., 2006). Lipiidsed parved muudavad mikrovesiikulite membraani jäigemaks, tänu millele nad rakuvälises ruumis koheselt ei lagune, vaid kuhjuvad ekstratsellulaarsse maatriksisse ning järk-järgult vabanevad nendest MMP-d (Candela jt., 2010). Mis puutub trofoblastidesse, siis siiani ei ole teada, kas nende rakkude poolt sekreteeritud mikrovesiikulid kannavad endas MMP-sid.

### **1.2.2. Apoptootilised kehad.**

Apoptoos on programmeeritud raku surm, mille käigus mitokondrid, tsütoplasmaõrgustik (Frank jt., 2001), Golgi kompleks (Lane jt., 2002), tsütoskelett (Taylor jt., 2008) ja rakutuum lagunevad ning DNA lõigatakse fragmentideks (Kerr jt., 1972). Apoptootilised kehad, mis moodustuvad apoptoosi käigus, on kõige suuremad rakuvälised vesiikulid (diameeter 1-4µm). Enamus lagundamise protsesse on seotud kaspasididega, so Cys-sõltuvate proteaasididega, mis aktiveeruvad raku stimuleerimisel. On teada, et peale proteaasidide toimet muutuvad mõned valgud funktsionaalselt aktiivseks. Näiteks ROCK I valk aktiveerub kui temale toimivad kaspasid, mis aitab kaasa plasmamembraani all paiknevate müosiini ahelate fosforüleerimisele ja aktiinifilamentide kokkutõmbumisele. Tekkiv pingeline lükkab tsütosooli vastu plasmamembraani, tekitades suuri väljasopistumisi piirkondades, kus tsütoskelett on lagundatud (Taylor jt., 2008). Selle protsessi tulemusena laguneb terve rakk vesiikuliteks, mida nimetatakse apoptootilisteks kehadeks. Nii mikrovesiikulite tekkimisel kui ka apoptoosi käigus tõuseb rakusisene  $Ca^{2+}$ -ioonide kontsentratsioon, mis omakorda inhibeerib flippaasi ja aktiveerib skramblaasi (Martin jt., 1995; Bratton jt., 1997). Selle tulemusena transporditakse fosfatidüülseriin plasmamembraani välispinnale ning apoptootilised kehad seostuvad fagotsütootivatele rakkudele fosfatidüülseriini retseptori kaudu. Sel viisil tekkinud apoptootilised kehad muudavad fagotsütoosi kulgemise lihtsamaks.

### **1.2.3. Eksosoomid.**

Eksosoomid on kõige väiksemad rakuvälised vesiikulid (diameeter 40-100 nm) (Simons ja Raposo, 2009). Kui eksosoomide preparaate on saadud sisestusmaterjale kasutades, siis elektronmikroskoopia preparaatidel näivad nad nõrgad, kuid külmutuselektronmikroskoopia

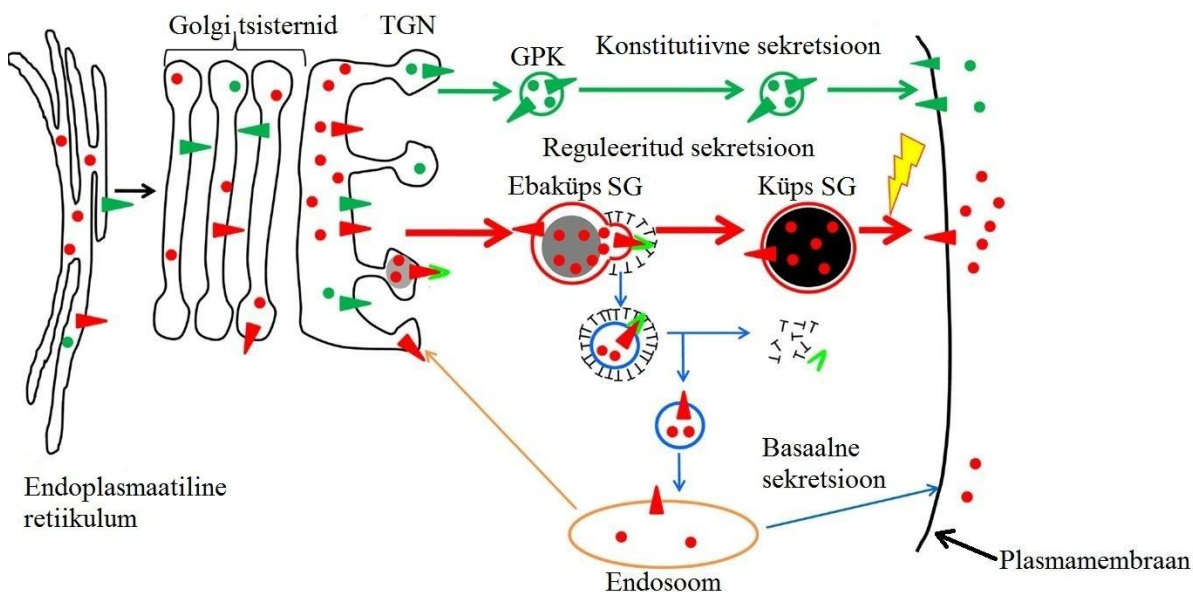
preparaatidel on näha ümmargusi vesiikuleid (Simons ja Raposo, 2009; Conde-Vancells jt., 2009).

Kui rakus toimub endotsütoos, siis sopistub plasmamembraan sisse, moodustades varajase endosoomi. Endosoomi küpsemise käigus selle sisemus hapestub ning tema membraan hakkab sisse sopistuma, mille tulemusena tekivad endosoomi luumenisse vesiikulid. Sellist hilist endosoomi, mille luumenis on vesiikulid, nimetatakse multivesikulaarseks kehaks. Kui multivesikulaarne keha liigub lüsoosoomi või plasmamembraani lähedusse, siis nende organellide membraanide kokkupuute korral sulavad nende membraanid kokku. Kui multivesikulaarse keha membraan sulab kokku plasmamembraaniga, siis vabanevad luumenisisened vesiikulid rakuvälisesse ruumisse. Sellise tekkega vesiikuleid nimetatakse eksosoomideks. Nii nagu mikrovesiikuleidki sekreteeritakse ka eksosoomi kas konstitutiivselt või raku aktiveerumisel stimuleerivate ainete toimel (Beach jt., 2014; Pant jt., 2012).

Eksosoomidel on organismides palju funktsioone. Esiteks, on neil suur osa immuunvastuse kujunemises. Näiteks epiteelirakud endotsüteerivad soole valendikku sattunud antigene. Soole epiteeli rakkude poolt sekreteeritud eksosoomide pinnal ekspresseerub MHC II/peptiid. Lümfisõlmede dendriitirakud on võimelised neid eksosoomi endotsüteerima, mille lõpptulemusena esitletakse MHC II antigeeni T-rakkudele (Van Niel jt., 2003). Kuid antigeeni esitlevad dendriitirakud on ka ise võimelised eksosoomi sekreteerima. Need eksosoomid ei stimuleeri naiivseid T-rakke, kuid dendriitrakkude erinevate populatsioonide vahendusel, tagatakse T-rakkude pikaajaline mälu (Théry jt., 2002; Raposo jt., 1996). Samas on näidatud, et vähirakkude poolt sekreteeritud eksosoomid suruvad NK rakkude tsütotoksilise aktiivsuse maha (Liu et al., 2006). Teiseks on leitud, et vähirakkude eksosoomid sisaldavad tetraspaniini ja angiogeneetilisi faktoreid, mis soodustavad angiogeneesi (Skog jt., 2008; Nazarenko jt., 2010; Hood jt., 2009). Kolmandaks, eksosoomid sisaldavad mRNA-d ja miRNA-sid, mis reguleerivad geenide ekspressiooni neid vastuvõtvates rakkudes ning selle kaudu ka rakkude funktsioone. Näiteks, monotsüütide eksosoomid soodustavad endoteelirakkude migreerumist (Valadi jt., 2007; Zhang jt., 2010; Pegtel jt., 2010). Neljandaks, eksosoomid on transpordivahendiks viirustele (näit. HIV ja Epstein-Barri viirus). Rakud endotsüteerivad nii eksosoomi kui ka nende külge kinnituvaid viiruseid (Wiley ja Gummuluru, 2006; Meckes jt., 2010). Viiendaks, eksosoomid sisaldavad morfogeene, signaalmolekule, mille kontsentratsiooni gradient määrab konkreetsete geenide ekspressiooni mustri, mis mõjutab organismide morfogeneesi (Lakkaraju ja Rodriguez-Boulan, 2008). Kuuendaks, eksosoomid sisaldavad ka MMP-sid. Kui nad kinnituvad integriinide kaudu ekstratsellulaarsele

maatriksile, siis vabanevad neist MMP-d, mis lagundavad kollageeni ja laminiini (Lozito ja Tuan, 2012; Hakulinen jt., 2008).

### 1.3. Erinevatele rakkudele omased sekretsiooni tüübid.



⊥ Klatriinkate

↗ Adaptorvalk

### Joonis 6. Rakkude erisugused sekretsiooni tüübid.

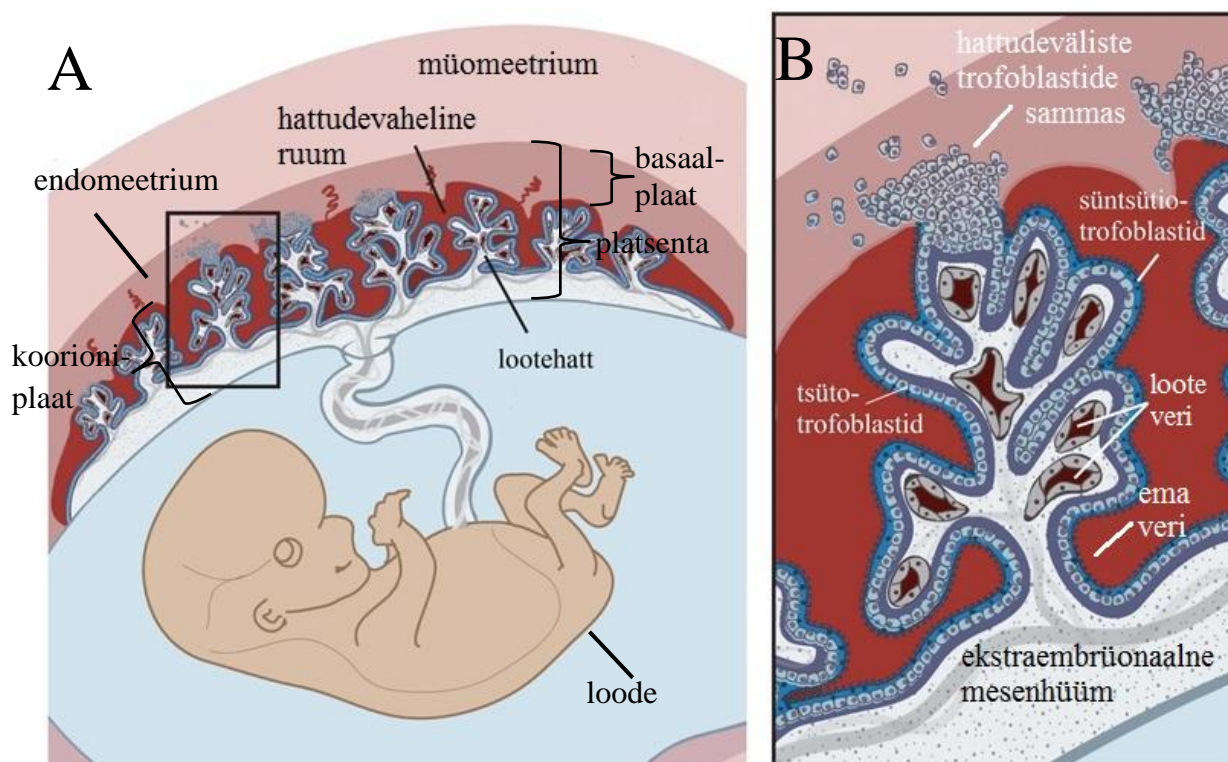
Ring – lahustuv valk; kolmnurk – transmembraanne valk; SG – sekretoorne graanul; TGN – *trans*-Golgi võrgustik; GPK – transpordivesiikul nn Golgi-plasmamembraan kandja. Valgud satuvad tsütosooli võrgustikust Golgi kompleksi, kus toimub nende modifitseerimine ja sorteerimine. Sorteerimiskeskuseks on TGN, kust valgud pakitakse kas transpordivesiikulitesse (GPK) või ebaküpsetesse sekretoorsetesse graanulitesse. TGN membraan sopistub välja, moodustades transpordivesiikuli, mis liigub kohe plasmamembraani poole (Polishchuk jt., 2003). Sekretoorsete graanulite tekkimisel kinnituvad adaptervalgud koos klatriiniga TGN membraani pinnale, soodustades selle väljasopistumist. Tulemusena vabaneb sekretoorne vesiikul, mis kaotab oma klatriinse katte. Sellise ebaküpse sekretoorse graanuli membraan võib adapteri ja klatriini kaasabil uuesti välja sopistuda. Moodustunud vesiikuli modifitseeritakse ja selle sisaldis kas sekreteeritakse rakust välja või transporditakse TGN tagasi. Sellist tüüpi sekretsiooni nimetatakse konstitutiivseks või basaalseks sekretsiooniks. Reguleeritud sekretsiooni puhul sekretoorsed graanulid nõ „küpsevad“ raku tsütosoolis ning neid säilitatakse seal kuni raku tabab stimuleeriv signaal (Urbé jt., 1997; Bonnemaision jt., 2013). Modifitseeritud (Bonnemaision jt., 2013) järgi.

Valkude transport tsütoplasma võrgustikust *cis*-Golgi võrgustikku toimub COP II valgulise kattega vesiikulite kaudu. COP II valgud on kattevalgud, mis kutsuvad esile membraani väljasopistumise ja kindlate valkude pakkimise moodustuvatesse vesiikulisse (Schmid 1997; Urbé jt., 1997). TGN on valkude sorteerimis- ja modifitseerimiskeskus (Keller ja Simons, 1997; De Matteis ja Luini, 2008). Sõltuvalt sekretsioonitüübist pakitakse valgud kas GPK-desse või sekretoorsetesse graanulitesse (Joonis 6). GPK-d on lamedad torujad-kotikujulised membraansed struktuurid, mis kannavad edasi konstitutiivsel viisil sekreteeritavaid valke. Need struktuurid on suuremad (dimeeter 0,5-1µm) kui sekretoorsed graanulid (60-100 nm) (Polishchuk jt., 2000) ja nende moodustumises ei osale kattevalgud. Kõigepealt tekivad TGN-i membraanile GPK domäänid, mis sisaldavad ainult konstitutiivsel viisil sekreteeritavaid valke (Keller jt., 2001; White jt., 2001) ning siis kinnitub vesiikuli membraanile kinesiin, mis seob GPK domääni mikrotuubulile. Kinesiin libiseb piki mikrotuubulit, venitades TGN-i membraani välja, mille tulemusena vabaneb GPK, mis kohe transporditakse piki mikrotuubulit plasmamembraanile (Polishchuk jt., 2003). Sekretoorsed graanulid moodustuvad klatriiniga kaetud domäänidest. Klatriin on kattevalk, mis kutsub esile TGN-i membraani väljasopistumise ja valkude kogunemise sellesse piirkonda (Klumperman jt., 1993; Höning jt., 1996; Dittié jt., 1999). Peale graanuli vabanemist klatriinkate dissotseerub. Ebaküpse sekretoorse graanuli membraan võib uuesti välja punguda, moodustades klatriinkattega vesiikuleid. Sellele järgneb vesiikuli modifitseerimine ja sekreteerimine rakust välja või transporditakse see tagasi TGN-i. Vaatamata sellele, et sellisel viisil tekkinud vesiikulite valgud sekreteeritakse ilma stiimulita, ei saa seda nimetada „konstitutiivseks“, sekretsiooniks, kuna vesiikul pärineb sekretoorsete graanulite rajast. Selletõttu nimetatakse seda basaalseks ehk konstitutiivsetmoodi sekretsiooniks (Bonnemaison jt., 2013). Reguleeritud sekretsiooni puhul modifitseeritakse sekretoorse graanuli membraan ja selle sisaldis vesiikuli „küpsemise“ käigus. Tulemusena moodustub küps sekretoorne graanul, millest valgud vabanevad rakuvälisesse ruumi ainult peale raku stimuleerimist (Bonnemaison jt., 2013). Sarnaselt GPK-ga toimub sekretoorsete graanulite transport piki mikrotuubuleid (Tooze ja Burke 1987; Matsuuchi jt., 1988).

Sekretsioonitüübi määramiseks kasutatakse tavaliselt mürke, mis peatavad valgusünteesi rakus või vesiikulite tekke. Kõige levinumad on brefeldin A ja tsükloheksimiid. Brefeldiin A on antibiootikum, mida toodavad seened (näit *Eupenicillium brefeldianum*). See takistab COP I ja klatriinkattega vesiikulite teket (Peyroche jt., 1999; Jackson ja Casanova, 2000), mille tagajärjel kaob Golgi kompleksi struktuur ning toimub selle kontrollimatu kokkusulamine tsütoplasma võrgustikuga läbi tubulo-vesikulaarsete Golgi väljasopistuste.

Lisaks sellele blokeeritakse nii GPK-de kui ka sekretoorsete graanulite teke, kusjuures juba olemasolevad küpsed sekretoorsed graanulid jäävad puutumatuks (Elazar jt., 1994; Nebenführ jt., 2002). Tsükloheksimiid (CHX) on bakterist *Streptomyces griseus* eraldatud antibiootikum (Schneider-Poetsch jt., 2010), mis põhiliselt blokeerib polüpeptiidahela pikenemist valgusünteesil (Obrig jt., 1971). Tsükloheksimiidi toimetel blokeeritakse nii sekretoorselt kui konstitutiivselt sekreteeritavate valkude süntees. Raku tsütoplasmas säiluvad ainult küpsed sekretoorsed graanulid ja nendes olevad valgud, mis sünteesiti enne tsükloheksimiidi toimet.

#### 1.4. Platsenta



**Joonis 7. Platsenta ehitus.** Modifitseeritud (Zeldovich jt., 2011) järgi.

Platsenta on raseduse perioodil moodustuv organ, mis tagab loote ja emavahelise ainevahetuse kulgemise. See koosneb loote- ja emapoolsest osast, mida kutsutakse vastavalt koorioniplaadiks ja basaalplaadiks (Joonis 7A). Koorioniplaat koosneb omakorda kolmest kihist, milleks on ekstraembrüonaalne mesenhüüm, tsütotrofoblastid ja süntsütiotrofoblastid. Koorioniplaadi pind moodustub koorioni ja vesikesta mesenhüümi kokkusulamise tulemusel. Platsenta arengu algetapil sisaldab koorioniplaat ainult tsütotrofoblaste, mis hakkavad jagunema ja diferentseeruma, moodustades süntsütiotrofoblastidega kaetud väljakasvusid ehk lootehattusid. Tekkivad lootehatud tungivad endomeetriumi sisse ning lagundavad seda. Lootehatud koosnevad alguses on ainult trofoblastidest, kuid edasise hargnemise ja suurenemise käigus tungib nende sisse loote veresooni sisaldav ekstraembrüonaalne

mesenhüüm. Basaalplaadiks nimetatakse müomeetriga piirnevat lootehattudevaba endomeetriumi osa. Sellele kinnituvad trofoblastid, et ankurdada platsenta emakaseinale.

### **1.5. Trofoblastid**

Platsentas moodustavad trofoblastid kaks põhilist populatsiooni, milleks on hattudesised ja hattudevälised trofoblastid. Hattudesised trofoblastid jagatakse tsüto- ja süntsütiotrofoblastideks. Tsütotrofoblastid on ühe tuumaga ovaalsed rakud, mis on võimelised veel mitootiliselt jagunema. Diferentseerumise käigus need rakud liituvad ja tekivad nn paljutuumsed süntsütiotrofoblastid. Raseduse lõpu poole moodustub üks suur miljardeid tuumi sisaldav rakk, nn süntsüütium (Joonis 7B), mis katab lootehattusid. Süntsütiotrofoblastid sünteesivad nii lüütilisi ensüüme, kui ka pro-apoptoosi faktoreid, mis kutsuvad esile endomeetriumi rakkude apoptoosi. Lüütiliste ensüümide kaasabil tungivad süntsütiotrofoblastid läbi basaalembraani ning lagundavad nii näärmete kui ka verekapillaaride seina, tekitades sekreedi ja ema verega täidetud sinusoide. Sinusoidid liituvad omavahel moodustades ühtset süsteemi, mis nimetatakse hattudeväliseks ruumiks. Sellele lisaks sekreteerivad süntsütiotrofoblastid veel ka progesterooni, inimese koorioni gonadotropiini (hCG) ja inimese platsenta laktogeeni (hPL). Progesteroon hoiab raseduse perioodil endomeetriumi terviklikkust, hCG soodustab angiogeneesi, varustades loodet toitainetega ning tagab tsütotrofoblastide kokkuliitumise ning hPL reguleerib ema organismi metabolismi. hPL toimel tõuseb rasvhapete tase ema veres, langeb insuliini tundlikkus, millele järgneb glükoosi taseme tõus ning toimuvad ka muutused rinnanäärmetes. Esimese kolme raseduskuu jooksul ei ole verevool hattudevälises ruumis piisavalt tugev, et varustada loodet toitainetega. Sellel perioodil mängib eriti suurt rolli histiotroofne toitumisviis: mille käigus süntsütiotrofoblastid fagotsüteerivad näärme sekreedi glükoproteiine (Burton jt., 2002) ja endomeetriumi surnud rakke, resorbeerides sealt valke, suhkruid ja lipiide. Basaalplaadile ankurduvate lootehattude tipus moodustavad tsütotrofoblastid rakkude samba, kus need rakud diferentseeruvad migreeruvateks hattudeväliseks trofoblastideks. Hattudevälised trofoblastid jagatakse kolmeks tüübiks: koe-, veresoone- ja näärmesisesteks trofoblastideks. Koesisesed trofoblastid liiguvad endomeetriumi sisse, kus nad seostuvad immuunrakkudega, kujundades sel viisil immuunvastust (Trowsdale ja Moffett, 2008) ning kinnituvad ka spiraalsetele arteritele, laiendades nende valendikku (Pijnenborg jt., 2006). Müomeetriumi võib leida suuri mitmetuumseid trofoblaste, mis moodustuvad koesiseste trofoblastide diferentseerumise lõppjärgus. Need on liikumisvõimetud hiidrakud, mis tagavad platsenta täieliku ankurdamise emaka seinale (al-Lamki jt., 1999; Aplin, 1991). Veresoonesisesed trofoblastid tungivad läbi spiraalarterite seina, lagundavad elastseid kiudusid, ladustavad fibrinoidi ning asendavad

osid endoteelirakke, mille tulemusena veresoone valendik laieneb mitu korda. Sel viisil muutunud spiraalarterid ei allu enam vasomotoorsele kontrollile, mille tõttu suunatakse hattudevälisesse ruumi tugev verevool, mis tagab loote ja ema organismi vahel efektiivse ainevahetuse (Hirano jt., 2002; Kaufmann jt., 2003). Veresoonesised trofoblastid liiguvad ainult arteritesse, kuid mitte veenidesse (Gude jt., 2004). Näärmesised trofoblastid käituvad samal viisil kui veresoonesised trofoblastid. Need rakud tungivad läbi juhade seinte asendades osa epiteelirakke, mis suunduvad omakorda näärmejuha hattudevälisesse ruumi laiendades selle valendikku (Moser jt., 2010).

### **1.6. Ekstratsellulaarne maatriks (ECM)**

Koed koosnevad põhiliselt kahest komponendist, milleks on rakud ja nendevaheline aine (nn ekstratsellulaarne maatriks, ECM), mis seob rakud kokku. ECM-i struktuur peab vastama koe funktsioonile, mistõttu on igas koetüübis erinev ECM-i makromolekulide koostis ja omavaheline paigutus. Rakud sekreteerivad kahte tüüpi ECM-i makromolekule – polüsahhariide ja valke. Polüsahhariidid annavad ECM-le geelitaolise struktuuri ning valgud vastutavad selle ülesehituse eest. Glükoosamiinoglükaanide (GAG) klassi kuuluvad polüsahhariidid moodustavad hargnemata ahelaid ning kui need on seotud mingi valguga, siis need kompleksid kannavad nimetust proteoglükaanid. Kuna GAG-d on negatiivselt laetud, seovad nad palju Na<sup>+</sup>-ioone, so osmootselt aktiivseid katioone, mis põhjustavad vee sissevoolu maatriksisse. ECM-i paisumise tulemusel tekib turgor, mis võimaldab survele vastu pidada. Lisaks sellele, et ECM toimib kui mehhaaniline toes, on tal ka teisi funktsioone. GAG ahelad moodustavad erineva pooride suuruse ja laengu tihedusega geelja struktuuri, mis laseb läbi ainult teatud suurusega molekulide. Peale selle võivad proteoglükaanid muuta signaalmolekulide aktiivsust, kas siis blokeerides nende aktiivtsentrit, kontsentreerides neid kindlasse kohta või sidudes neid oma pinnale. Plasmamembraaniga seotud proteoglükaanid toimivad kas koretseptorite või retseptoritena, mis seovad ECM-i makromolekule. ECM koosneb kiudjatest valkudest nagu kollageen, laminiin, elastiin ja fibronektiin. Kollageeni molekul koosneb kolmest omavahel kokku keerdunud polüpeptiidahelast ning tema põhiliseks funktsiooniks on vastu pidada tõmbejõududele. Rakud sekreteerivad kahte tüüpi kollageeni. Esimest tüüpi kollageeni molekulid seostuvad peale sekretsiooni omavahel, selleks et moodustada kollageenikiudusid. Teist tüüpi kollageen ei moodusta kiudjat struktuuri, kuid ta tekitab sideme kollageeni kiudude ja teiste makromolekulide vahel. Elastiin on kiudjate valkude hulka kuuluv ECM-i makromolekul, mis annab maatriksile elastsuse. Nagu kollageen, nii moodustab ka elastiin elastseid kiudusid, mis on kaetud glükoproteiinidest koosnevate mikrokiududega, mis soodustavad elastsete kiudude kokkupakkimist. Peale selle

on elastsed kiud seotud kollageeni kiududega, mis piiravad venituse ulatust ega lase koel rebeneda. Kolmas kiudjas valk on fibronektiin, mis seob ECM-i komponente omavahel kokku, andes sellega maatriksile kindla struktuuri. Fibronektiinil on kaks isovormi: plasma fibronektiin ja kiudjas fibronektiin. Veres ja teistes keha vedelikes ringleb fibronektiini lahustuv plasma vorm, samas kui lahustamatu isovorm on rakkude pinnal koondunud kiududeks. Fibronektiini kiudude kokku pakkimist raku pinnal reguleerivad raku pinna retseptorid, kusjuures kõige määravam osa selles on integriinidel. Eelöeldust lähtuvalt on fibronektiin võimeline omavahel siduma rakke ja ECM-i makromolekule. Neljas kiudjas valk on laminiin, mis seostub nii rakupinna retseptorite kui ka ECM-i makromolekulidega, korraldades maatriksi struktuuri. Erisugustes koetüüpides pakitakse laminiinid kokku erinevateks struktuurideks. Näiteks, Schwanni rakkude pinnal moodustavad nad võrgustiku (Tsiper ja Yurchenco, 2002), seevastu kopsu epiteelirakkude ECM-s koonduvad nad kiududeks (DeBiase jt., 2006) ning embrüonaalsete rakkude maatriksis pakitakse hoopis täpikujulisteks struktuurideks (Hamill jt., 2009; Henry jt., 2001).



## **2. Eksperimentaalne osa**

### **2.1 Töö eesmärgid**

Käesoleva töö eesmärgiks oli määrata laminiini sekretsioonitüüpi trofoblasti rakuliini JAR poolt, uurida, kas trofoblastide mikrovesiikulid sisaldavad laminiini ja kas ECM-sse kokkupakitud laminiin töödeldakse proteaaside poolt.

Eesmärgi saavutamiseks püstitati järgmised ülesanded:

1. Töödelda JAR rakke tsükloheksimiidiga.
2. Uurida laminiini sisaldust töödeldud ja töötlemata rakkudes.
3. Eraldada JAR rakkude poolt kasvukeskkonda sekreteeritud mikrovesiikulid.
4. Määrata, kas JAR rakkude poolt sekreteeritud mikrovesiikulid sisaldavad laminiini.
5. Eraldada JAR rakkude poolt sekreteeritud rakuvaheainet.
6. Uurida, kas rakuvaheaine degradeeritakse maatriks metalloproteaaside poolt.

## 2.2. Materjalid ja meetodika

### 2.2.1. Kasutatud antikehad

#### 2.2.1.1. Western Blot analüüsil kasutatud antikehad

| Antikeha   | Firma/autor, riik             | Algkontsentratsioon | Lahjendus |
|--|-------------------------------|---------------------|-----------|
| Primaarsed antikehad   |                               |                     |           |
| inimese laminiini $\beta$ 1 ahela vastane hiire MAK DG10                     | I. Virtanen, Helsingi ulikool | 2,9 mg/ml           | 1:3000    |
| inimese laminiini $\alpha$ 5 ahela vastane hiire MAK LM 4B5                  | Ingerpuu ja Juronen, Eesti    | 2,45 mg/ml          | 1:250     |
| inimese laminiini $\alpha$ 1 ahela vastane küüliku PAK H-300                 | Santa Cruz Biotechnology, USA | 0,2 mg/ml           | 1:500     |
| inimese $\beta$ -aktiini vastane hiire MAK AC-15                             | Abcam, UK                     | 2,8 mg/ml           | 1:10000   |
| Negatiivne kontroll  |                               |                     |           |
| hiire IgG isotüüpide segu  | Santa Cruz Biotechnology, USA | 0,4 mg/ml           | 1:1000    |
| Sekundaarsed antikehad   |                               |                     |           |
| mädarõika peroksüdaasiga seotud hiire immunoglobuliinide vastane kitse PKA   | Lab AS, Eesti                 | 1 mg/ml             | 1:10000   |
| mädarõika peroksüdaasiga seotud küüliku immunoglobuliinide vastane kitse PKA | Santa Cruz Biotechnology, USA | 0,4 mg/ml           | 1:5000    |

### 2.2.1.2. Immunofluorestsismikroskoopias kasutatud antikehad

| Antikeha   | Firma/autor, riik                   | Algkontsentratsioon | Lahjendus/<br>kasutatud<br>kontsentratsioon   |
|--|-------------------------------------|---------------------|---|
| Primaarsed<br>antikehad  |                                     |                     |   |
| inimese laminiini $\beta$ 1<br>ahela vastane hiire<br>MAK DG10                     | I. Virtanen,<br>Helsingi ulikool    | 2,9 mg/ml           | 5 $\mu$ g/ml  |
| inimese laminiini $\alpha$ 1<br>ahela vastane<br>kүүлiku PAK H-300                 | Santa Cruz<br>Biotechnology,<br>USA | 0,2 mg/ml           | 1:500   |
| inimese laminiini $\alpha$ 5<br>ahela vastane hiire<br>MKA LM 4F2.1                | Ingerpuu ja<br>Juronen, Eesti       | 1,2 mg/ml           | 5 $\mu$ g/ml  |
| inimese laminiini $\alpha$ 5<br>ahela vastane hiire<br>MKA LM 5A6.1                | Ingerpuu ja<br>Juronen, Eesti       | 0,5 mg/ml           | 5 $\mu$ g/ml  |
| Negatiivne<br>kontroll   |                                     |                     |   |
| hiire IgG isotüüpide<br>segu   | Santa Cruz<br>Biotechnology, USA    | 0,4 mg/ml           | Negatiivse kontrolli<br>ja primaarse<br>antikeha<br>lõppkontsentratsioon<br>võrdsustati ja<br>vastavalt sellele<br>arvutati lahjendus |
| kүүлiku IgG<br>isotüüpide<br>segu  | Abcam, UK                           | 0,2 mg/ml           |   |
| Sekundaarsed<br>antikehad  |                                     |                     |   |
| hiire<br>immunoglobuliinide<br>vastane eesli PKA,<br>seotud Alexa Fluor<br>488-ga  | Molecular Probes,<br>USA            | 2 mg/ml             | 1:200   |
| kүүлiku<br>immunoglobuliinide<br>vastane kana PKA,<br>seotud Alexa Fluor<br>488-ga | Molecular Probes,<br>USA            | 2 mg/ml             | 1:200   |

### 2.2.2. Kasutatud rakuliin

Käesolevas töös kasutati inimese koorioni kartsinoomi rakuliini JAR.

JAR rakuliini kasvatati RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute medium) söötmes (PAA Laboratories, Austria), mille mahust oli 10% veise loote seerum (FCS, ingl. k. *foetal calf serum*) (PAA Laboratories, Austria) ja kuhu oli lisatud 100 µg/ml streptomütsiini ja 100 U/ml penitsilliini. Rakke kasvatati 5% CO<sub>2</sub> keskkonnas temperatuuril 37°C. Ümberkülvamiseks pesti rakke steriilse 1×PBS-ga, võeti trüpsiiniga lahti ja lisati nendele värsket söödett trüpsiini lahusega samas mahus. Rakud sadestati tsentrifuugis 5 minuti jooksul 399×g ja 4°C juures. Peale sadestamist supernatant eemaldati, rakkudele lisati värsket söödett, suspendeeriti ja jagati Petri tassidesse. Rakke passeeriti 2-3 päeva pärast, kui nad olid saavutanud 100%-lise konfluentsuse. Immunofluorestsentsmikroskoopia jaoks kasvatati JAR rakke 12 mm läbimõõduga klaasidel 24 tunni jooksul.

### 2.2.3. Mikrovesiikulite eraldamine

Selleks et eraldada JAR rakkude poolt sekreteeritud mikrovesiikuleid teistest rakuvälistest vesikulitest, kasutati ultratsentrifuugimist. See meetod põhineb sellel, et erineva suuruse ja tihedusega struktuurid sadenevad erineva tsentrifugaaljõuga. Mida suuremad ja tihedamad on vesikulid, seda väiksemat jõudu tuleb rakendada (van der Pol jt., 2012). Enne rakkudele kandmist ultratsentrifuugiti söödett (RPMI 1640+10% FBS) 1 tund 100000×g juures (ultratsentrifuug L8-M, rootor 45Ti, Beckman, USA), et eemaldada veise loote seerumist pärit mikrovesiikulid ja eksosoomid (Muralidharan-Chari jt., 2009). Peale tsentrifuugimist söödett filtreeriti (filtri poori läbimõõt 0,2 µm; Thermo Scientific, USA) ning kasvatati selles rakke 24 tundi. 24 tunni pärast eemaldati rakkudelt söödett ja tsentrifuugiti seda 20 minutit 2000×g ja 4°C juures (tsentrifuug 4K15C, Sigma), et eraldada surnud rakkude tükid ja apoptootilised kehad (Crescitelli jt., 2013). Selleks, et sadestada mikrovesiikuleid ultratsentrifuugiti supernatanti 1 tund 10000×g ja 4°C juures (ultratsentrifuug L8-M, rootor 45Ti) (Muralidharan-Chari jt., 2009). Mikrovesiikulite külge kleepunud söötme valkude eemaldamiseks pesti neid 1×PBS-ga ning sadestati 10 minutit 16000×g ja 4°C juures (tsentrifuug 5415R, Eppendorf, Saksamaa). Pärast seda mikrovesiikulid suspendeeriti 1×PBS-s ja lüüsiiti lüüsilahuses (vaata punkt 2.2.5).

#### **2.2.4. JAR rakkude tsükloheksimiidiga mõjutamine**

Peale ümberkülvamist kasvatati JAR rakke 36 tundi, kuni saavutati 40%-line konfluentsus. Kontrollrühma rakkudelt eemaldati vana kasvukeskkond, pesti rakke steriilse 1×PBS-ga ja viidi uude söötmesse. Teine osa JAR rakke viidi söötmesse, millele oli lisatud tsükloheksimiid (24 µg/ml). Mõlemaid rakupopulatsioone kasvatati 12, 24, 36 ja 48 tundi. Eelnimetatud ajavahemiku järel eemaldati rakkudelt sööde ning pesti neid steriilse 1×PBS-ga, misjärel eemaldati Petri tassidelt trüpsiiniga 37°C juures. Seejärel lisati rakkudele steriilset 1×PBS-i samas mahus trüpsiini lahusega ja sadestati 5 minutit 399×g ja 4°C juures. JAR rakke pesti steriilse 1×PBS-ga veel 2 korda rakkude arv loendati lugemiskambris.

#### **2.2.5. JAR rakkude lüüsimine**

JAR rakke inkubeeriti 45 minutit jääl 50 mM TrisHCl lüüsipuhvris (pH 7,5), millele oli lisatud 1% Triton X-100, inhibiitorite kokteil (Roche Diagnostics GmbH, Šveits) ja 1 mM PMSF-i (fenüülmetüülsulfonüülfluoriid). Peale inkubatsiooni toimiti lüsaadile ultraheliga, et lõhkuda DNA-d ja RNA-d ning tsentrifuugiti 10 minutit 16000×g ja 4°C juures (tsentrifuug 5415R, Eppendorf, Saksamaa), et sadestada rakkude tükke. Supernatanti säilitati -20°C juures.

#### **2.2.6. JAR rakkude poolt toodetud rakuvaheaine e ECM-i eraldamine koekultuuri plastikult**

Kõigepealt viidi JAR rakud uude koekultuuri söötmesse ning kasvatati seal 1, 2, 3 ja 4 päeva. Vastava aja möödudes pesti JAR rakke üks kord 1×PBS-ga ja eemaldati soojendatud (37°C) 20 mM EDTA-ga PBS-is. Seejärel pesti JAR-i rakkude poolt sekreteeritud maatriksiga kaetud Petri tasse 2 korda 50 mM Tris-HCl-ga, pH 6,8. Maatriksi valgud eemaldati Petri tassilt kahekordse SDS-PAGE proovipuhveriga, millele oli lisatud ditiotritool. Lõpuks kuumutati valkude segu 5 minutit 100°C juures ning säilitati -20 °C juures.

#### **2.2.7. Valkude SDS-polüakrüülamiidgeel elektroforees ja *Western blot* analüüs**

SDS-polüakrüülamiidgeelile kantavate proovide mahu määramise aluseks võeti tsükloheksimiidiga mõjutamata (nn kontrollrakkude) arv. Kuna tsükloheksimiidiga

mõjutamata JAR-i rakkude kasv ei peatunud, siis kõige suurem rakkude hulk saadi selles kultuuris 48 tunni pärast. Nende rakkude valguproovi maht võeti aluseks ülejäänud katsepunktide valguproovide mahu määramiseks. Eelduseks oli see, et kõikide SDS-PAGE geelile kantavate valguproovide puhul oleks proovi maht selline, et nendes sisalduvad valgud oleksid pärit võrdsest arvust rakkudest. Kui toimus JAR rakkudelt eraldatud söötmest pärit valkude elektroforeetiline lahutamine, siis rakkude hulka ei arvestatud, mistõttu kõikide proovide mahud olid võrdsed. Valkude lahutamiseks kasutati 4%-, 5%- ja 9%-lisi SDS-PAGE geele, kusjuures 4%-line geel sisaldas peale akrüülamiidi veel ka 5% agarooši (agarooši tüüp ja firma). SDS-PAGE geelis lahutatud valgusegu kanti PVDF membraanile (polüvinülideenfluoriid; Immobilon, Millipore, USA) nn „märja“ ülekande meetodil 1 tunni jooksul 100 V juures. Selleks, et vältida antikehade mittespetsiifilist seostumist inkubeeriti membraani 1 tunni jooksul 1×PBS-is, mis sisaldas 0,1% Tween-20 ja 5% lõssipulbrit. Seejärel pesti membraani 3 korda 1×PBS-ga, milles oli 0,1% Tween-20. Membraani inkubeeriti primaarsete antikehadega blokeerimissegus 1 tunni jooksul ning loksutati 3 korda 1×PBS-s, mis sisaldas 0,1% Tween-20, 15 minutit. Järgnevalt inkubeeriti membraani sekundaarsete antikehadega blokeerimissegus 1 tunni jooksul ning loksutati 3 korda 1×PBS-s, mis sisaldas 0,1% Tween-20, 15 minutit. Lõpuks inkubeeriti membraani 5 minutit kemoluminestsentsi esilekutsuvas lahuses (Millipore, USA) ning eksponeeriti röntgenfilmile (Agfa). Film ilmutati vastavalt etteantud protokollile.

### **2.2.8. Immunofluorestsentsmikroskoopia**

Klaasidel kasvanud rakke pesti kolm korda 1×PBS-s ja fikseeriti 4%-lise paraformaldehüüdiga 10 minuti jooksul. Seejärel pesti rakke kolm korda 1×PBS-ga ja inkubeeriti 10 minutit Perm puhvris (1×PBS, milles on 0,2% Triton X-100). Seejärel pesti JAR rakke kolm korda PBS-ga ning blokeeriti 1 tund 1×PBS-s, mis sisaldas 1% BSA ja 0,1% saponiini. Järgnevalt inkubeeriti rakke primaarsete antikehadega 1 tund toatemperatuuril, pesti kolm korda 1×PBS-ga ning siis 1 tund sekundaarsete antikehadega ja lõpuks 10 minutit DAPI-ga toatemperatuuril pimedas. Nii primaarsed kui ka sekundaarsed antikehad lahjendati blokeerimispuhvris ning DAPI lahjendati 1×PBS-s (1:10000). Rakkude fikseerimine, permeabiliseerimine, blokeerimine ning antikehade ja DAPI-ga inkubeerimine toimus niiskes kambris parafilmlil 35 µl-tes tilkades. Peale DAPI-ga

inkubeerimist pesti preparaate 1 kord 1×PBS-ga ja sulundati sulundusse. JAR rakkude preparaate analüüsi fluoresentsmikroskoobiga Olympus BX61 ning kujutisi töödeldi arvutiprogrammiga Olympus cellSens Standard 1.8.1.

### 2.3. Tulemused ja arutelu

Käesoleva töö eesmärgiks oli kindlaks teha kas JAR rakuliini rakud sekreteerivad rakuvälisesse keskkonda laminiine 111 ja 511 mööda regulatoorset või konstitutiivset sekretsioonirada. On teada, et trofoblastid sekreteerivad põhiliselt LM 111 ja LM 511, kuid vähemal määral võivad sekreteerida ka LM 211, LM 221 ja LM 521 (Korhonen ja Virtanen, 2001; Tiger jt., 1997; Korhonen ja Virtanen, 1997; Naom jt., 1997). Trofoblastid sünteesivad rohkem LM 111 kui LM 511. Tsütotrofoblastide ja loote veresooni katvate endoteelirakkude vahel paiknev basaalmembraan koosneb peamiselt LM 111-st ja LM 511-st. Selles piirkonnas vastutavad endoteelirakud eelkõige LM 511 sünteesi eest, samas kui trofoblastid sekreteerivad LM 111. Rakud sekreteerivad nii laminiine kui ka teisi ECM komponente valdavalt konstitutiivset rada pidi. See on iseloomulik näiteks vähirakkudele, mis migreerumise käigus (metastaseerimisel) sekreteerivad kogu aeg nii laminiine, kui ka teisi ECM makromolekule (Katayama jt., 2007; Chung, 1993). Varem on näidatud, et trofoblastid on väga liikumisvõimelised rakud, sest nad tungivad endomeetriumi rakkude vahelt läbi ning samal ajal sekreteerivad MMP-sid ja laminiine. MMP-d on proteaasid, mis lagundavad ECM valke, võimaldades rakkudel rajada teed stroomarakkude vahel. Endomeetriumi rakkude vahel migreeruvad trofoblastid nõ libisevad mööda laminiine, sest neid valke on sinna ladestunud suures hulgas.

On teada, et tsükloheksimiid blokeerib valkude biosünteesi. Kui on tegemist valkude konstitutiivse sekretsiooniga, siis sekreteeritakse rakuvälisesse ruumi neid valke, mis olid sünteesitud enne tsükloheksimiidi toimet. Sekretoorsetes graanulites olevad valgud säilitatakse aga raku tsütoplasmas ning nende sekretsioon sõltub rakule toimivatest signaalidest ning seega ei allu otseslt tsükloheksimiidi toimele. Seega kui võrrelda laminiinide hulka tsükloheksimiidiga mõjutatud ja mõjutamata rakkude tsütosoolis ja väliskeskkonnas, võib määrata, mis sekretsioonitüübiga on tegu.

Erinevat tüüpi rakud sekreteerivad ka väga erinevaid mikrovesiikuleid, mis oma sisalduste poolest on väga heterogeensed. Seega ilmselgelt täidavad rakkude poolt sekreteeritud mikrovesiikulid väga erinevaid ja samas spetsiifilisi funktsioone. Mikrovesiikulid muudavad läbi retseptor-ligand seostumise sihtmärkrakkude käitumist. Lisaks sellele sisaldavad mikrovesiikulid miRNA-sid, bioaktiivseid aineid ja kannavad ka raku pinnamolekule. Kuivõrd JAR rakud sünteesivad ja sekreteerivad märkimisväärses koguses mitmeid laminiine, siis lähtuvalt sellest võiks eeldada, et need valgud võiksid paikneda ka rakkude pinnalt eralduvates mikrovesiikulites. Siinkohal tuleb märkida, et mikrovesiikulite osa laminiinide

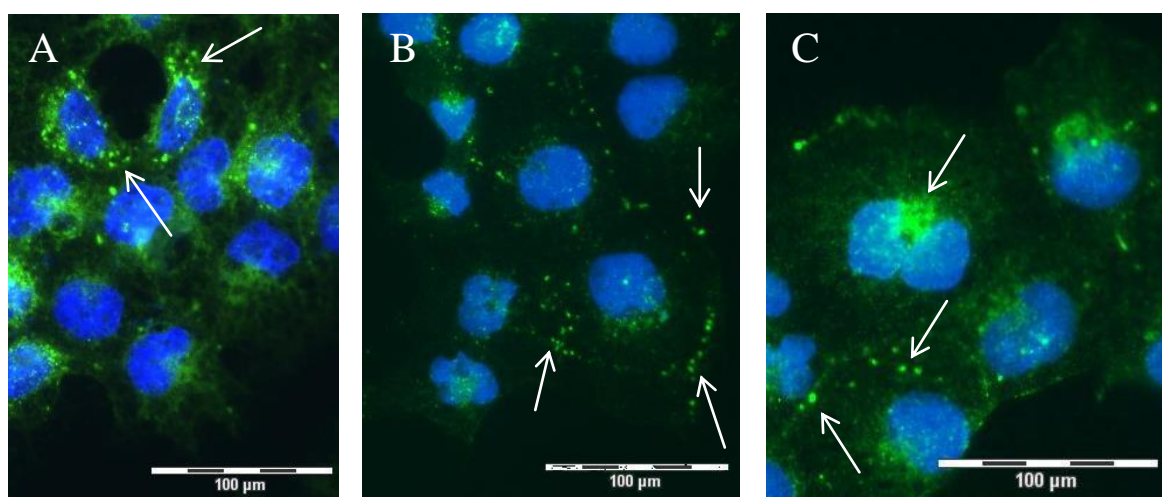


411/412 ja 511/521 sekretsioonis on varem näidatud inimese vereliistakute puhul (Pook jt., 2014).

Käesolevaks ajaks on kogunenud palju tõendeid, mis näitavad, et nii vähirakud kui ka trofoblastid sünteesivad MMP-sid, mis aitavad neil rakkudel tungida läbi ümbritsevate kudede. MMP-d nimelt lagundavad ECM kiudjaid valke (kollageen, laminiin, elastiin). Meie seadsime oma eesmärgiks kasutada SDS-PAGE elektroforeesi ja Western Bloti meetodeid, selleks, et leida, kas JAR rakuliini poolt sekreteeritud LM 111 ja LM 511 ahelad alluvad proteolüüsile või ei. Sel viisil oleks võimalik kindlaks teha, milliseid konkreetseid laminiini ahelaid proteolüütiliselt lõigatakse ning kas see toimub juba JAR rakkude tsütosoolis, sekreteeritud mikrovesiikulites, rakkude kasvukeskkonnas või siis hoopis rakkude poolt ladestatud matriksis. Kui tõesti on tegu nimetatud laminiinide ahelate proteolüüsiga, siis võiksime eeldada, et tekkinud fragmentidel on trofoblastide füsioloogias oma kindel funktsioon.

### 2.3.1. Immunofluorestsentsmikroskoopia

Selleks, et tuvastada LM 111 ja LM 511 olemasolu JAR rakkudes kasutasime immunofluorestsentsmikroskoopi ja laminiini  $\alpha$ 5- ja  $\beta$ 1-ahela vastaseid monoklonaalseid antikehi.



#### Joonis 8. JAR rakkude immunofluorestsentsmikroskoopia.

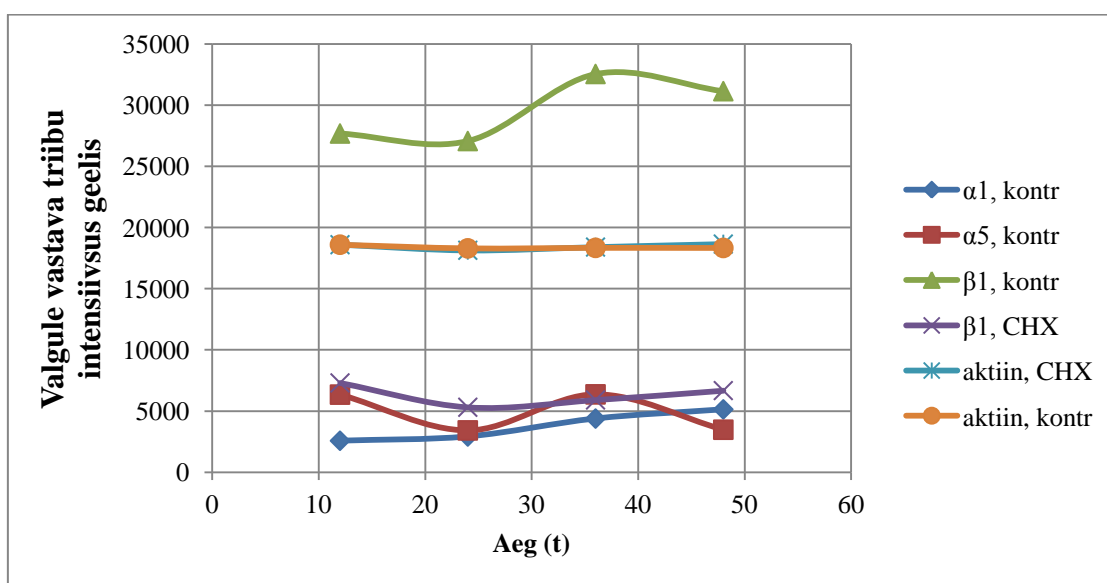
(A) Laminiini  $\beta$ 1-ahela vastane antikeha LM DG10; (B) laminiini  $\alpha$ 5-ahela vastane antikeha 5A6.1; (C) laminiini  $\alpha$ 5-ahela vastane antikeha 4F2.1. Rakutuomad on värvitud DAPI-ga. Kasutatud sekundaarne antikeha on hiire immunoglobuliinide vastane eesli PKA, mis on

seotud Alexa Fluor 488-ga. Nooled tähistavad antikehadega märgistatud laminiinide kogumikke rakkude sees.

Joonisel 8 on näha, et laminiinid paiknevad JAR rakkude sees kogumikena, mis paiknevad rakutuuma lähedal (ilmselt Golgi piirkond) kui ka raku perifeerias granulaarsetes struktuurides. Selles katses me kasutasime kahte erinevat laminiini  $\alpha 5$ -ahela vastast antikeha LM 4F2.1 ja LM 5A6.1, mis annavad JAR rakkudes sarnase värvingu. Joonisel 8 (A) kus kasutati laminiini  $\beta 1$ -ahela vastast antikeha on laminiinide olemasolu tuvastatav üle kogu JAR rakkude tsütoplasma.

### 2.3.2. LM 111 ja LM 511 sekretsioonitüübi määramine.

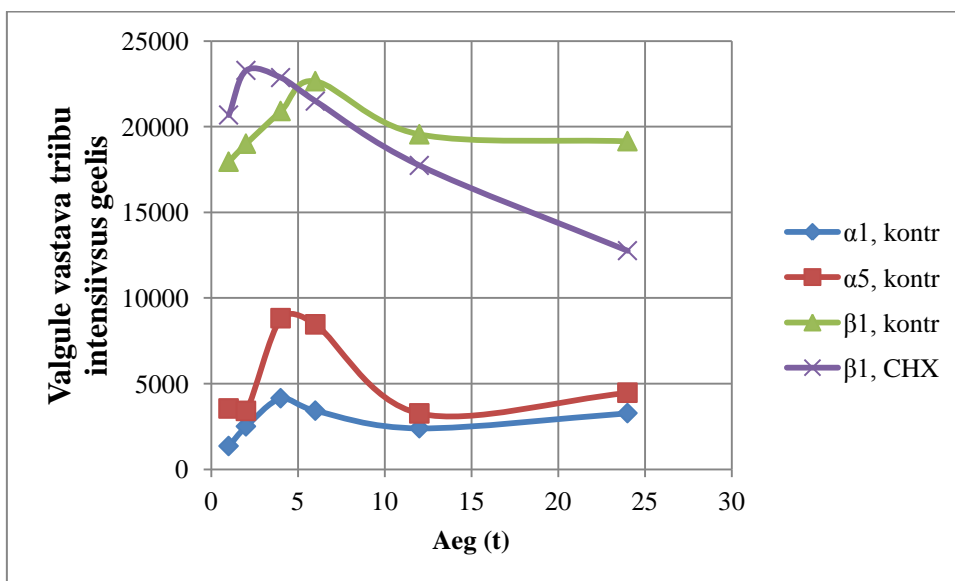
Selleks, et määrata LM 111 ja LM 511 sekretsioonitüüpi JAR-i rakkudes, analüüsisime laminiinide hulga muutumise dünaamikat tsükloheksimiidiga mõjutatud rakkude lüsaadis ja söötmes 48 tunni jooksul. Kontrollina kasutasime JAR rakke, mida ei mõjutatud tsükloheksimiidiga. Kuna tsükloheksimiid peatab valgusünteesi, siis me eeldasime, et laminiinide hulk tsükloheksimiidiga mõjutatud rakkudes peab katseperioodil jääma madalamaks kui mõjutamata rakkudes. Joonisel 9 esitatud tulemused on saadud kasutades SDS-PAGE elektroforeesi ja Western blotti ning laminiini  $\beta 1$ -ahela immunotuvastamist vastava antikehaga JAR rakkude lüsaadis. Graafikul on esitatud laminiini  $\beta 1$ -ahelale vastava triibu intensiivsus röntgenfilmil, mis kaudselt vastab valgu hulgale.



### Joonis 9. Laminiin $\alpha 1$ -, $\alpha 5$ - ja $\beta 1$ -ahelate hulga muutus JAR rakkudes.

Tsükloheksimiidiga mõjutatud rakkudes ei muutunud laminiini  $\beta 1$ -ahela hulk 48 tunni jooksul, kuid kontrollrakkudes see veidi tõuseb. Kuid laminiini  $\beta 1$ -ahela üldhulk on kontrollis tunduvalt suurem kui tsükloheksimiidiga mõjutatud rakkudes. Laminiin  $\alpha 1$ - ja  $\alpha 5$ -ahelate hulk kontrollis praktiliselt ei muutu. Joonisel ei ole esitatud  $\alpha 1$ - ja  $\alpha 5$ -ahelate hulga muutust tsükloheksimiidiga töödeldud rakkudes, sest nende valkude ekspressioon oli nii madal, et neid ei olnud võimalik tuvastada. Kasutatud antikehad olid DG10, LM 4B5 ja H-300. Ajavahemikud, mille järel JAR rakke lüüsi on vastavalt 12, 24, 36 ja 48 tundi.

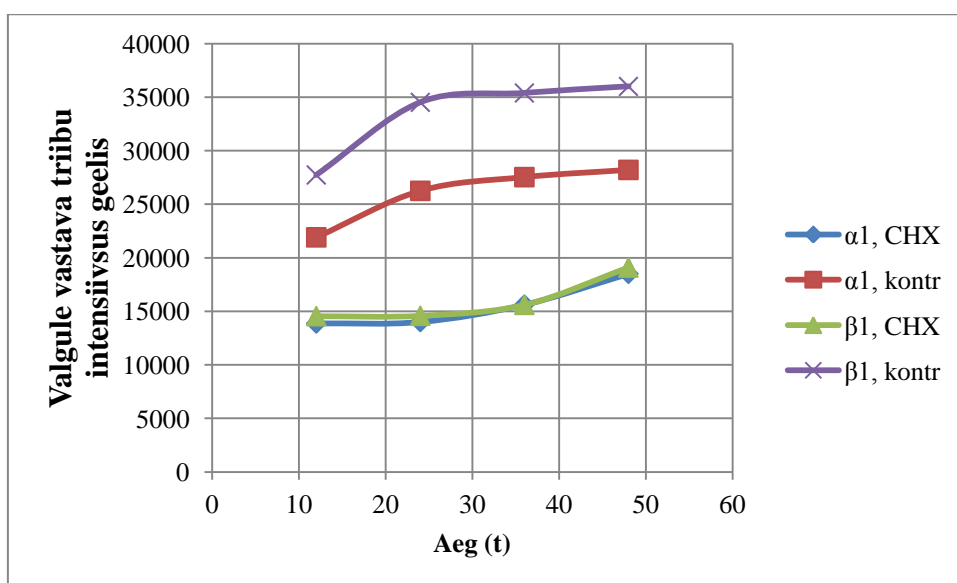
Joonisel 9 esitatud tulemuste põhjal võib väita, et tsükloheksimiidiga mõjutatud JAR rakud sisaldavad tunduvalt vähem laminiini  $\beta 1$ -ahelat sisaldavaid laminiine kui mõjutamata rakud. Samuti võib lisada, et tsükloheksimiid blokeerib laminiin  $\alpha 1$ - ja  $\alpha 5$ -ahelate sünteesi sellisel määral, et need ei ole enam JAR rakkude lüsaadis tuvastatavad. Ilmselt sünteesitakse laminiini  $\beta 1$ -ahelat niivõrd suure ülehulgas võrreldes  $\alpha 1$ - ja  $\alpha 5$ -ahelatega, et rakud sisaldavad seda ahelat isegi veel siis kui valgusüntees on peatatud.



### Joonis 10. Laminiin $\alpha 1$ -, $\alpha 5$ - ja $\beta 1$ -ahelate hulga muutus tsükloheksimiidiga mõjutatud ja mõjutamata JAR rakkudes 24 tunni jooksul.

Joonisel ei ole esitatud  $\alpha 1$ - ja  $\alpha 5$ -ahelate hulga muutust tsükloheksimiidiga töödeldud rakkudes, sest nende valkude ekspressioon oli nii madal, et neid ei olnud võimalik tuvastada. Kasutatud antikehad olid DG10, LM 4B5 ja H-300, mis olid vastavalt  $\beta 1$ -,  $\alpha 5$ - ja  $\alpha 1$  ahelate vastased. Ajavahemikud, mille järel JAR rakud lüüsi on vastavalt 1, 2, 4, 6, 12 ja 24 tundi.

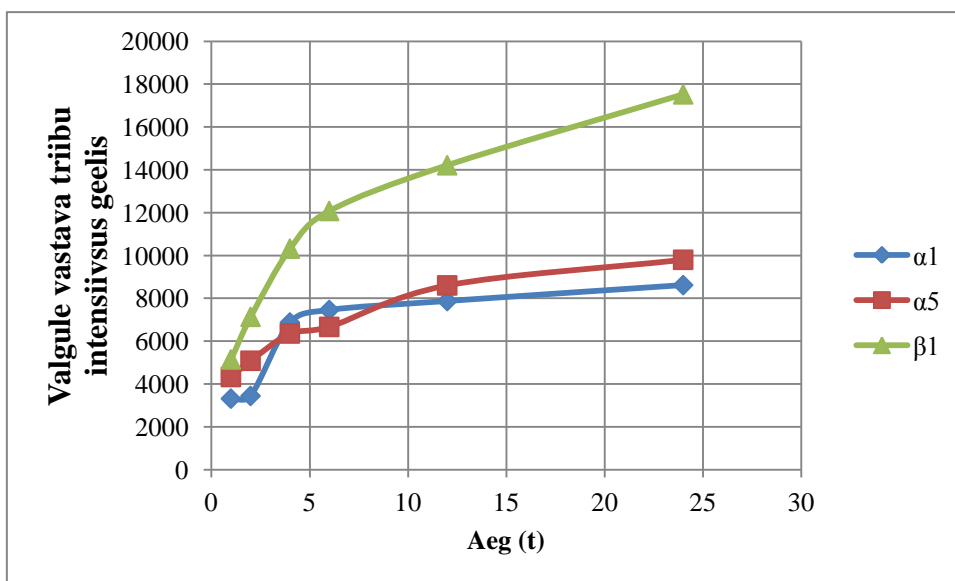
Selleks, et tuvastada, millisel ajahetkel muutub tsükloheksimiidi toime laminiinide sekretsioonile JAR rakkudest märgatavaks, mõjutati rakke lühema perioodi jooksul, so 1-24 tundi. Joonisel 10 toodud tulemused näitavad, et laminiini ahelate ekspressiooni tase JAR rakkudes esimese 5 tunni jooksul peale rakkude uude söötmesse viimist veidi tõuseb. Järgneva perioodi jooksul see kontrollrakkudes veidi langeb ja siis jääb püsivale tasemele. Tsükloheksimiidiga mõjutatud rakkudes järgneb  $\beta$ 1-ahela ekspressiooni tõusule aga pidev langus kuni katse lõpuni (24 tundi). Laminiini  $\alpha$ 1- ja  $\alpha$ 5-ahelate hulga muutust tsükloheksimiidiga töödeldud rakkudes ei olnud võimalik analüüsida, sest nende valkude ekspressioon jäi selleks liiga madalaks. Laminiini  $\beta$ 1-ahela ekspressiooni alusel võib siiski arvata, et tsükloheksimiidi toime laminiinide sekretsioonile hakkab ilmema umbes 10 tundi pärast toimeaine JAR rakkudele kandmist.



**Joonis 11. Laminiini  $\alpha$ 1- ja  $\beta$ 1- ahelate hulga muutus tsükloheksimiidiga mõjutatud ja mõjutamata JAR rakkude kasvukeskkonnas.** Laminiini  $\alpha$ 1- ja  $\beta$ 1- ahelate hulk on tsükloheksimiidiga mõjutatud rakkude kasvukeskkonnas väiksem võrreldes kontrolliga. Kasutatud antikehad olid H-300 ja DG10. Ajavahemikud, mille järel JAR rakkudelt eraldati kasvukeskkond on 12, 24, 36 ja 48 tundi.

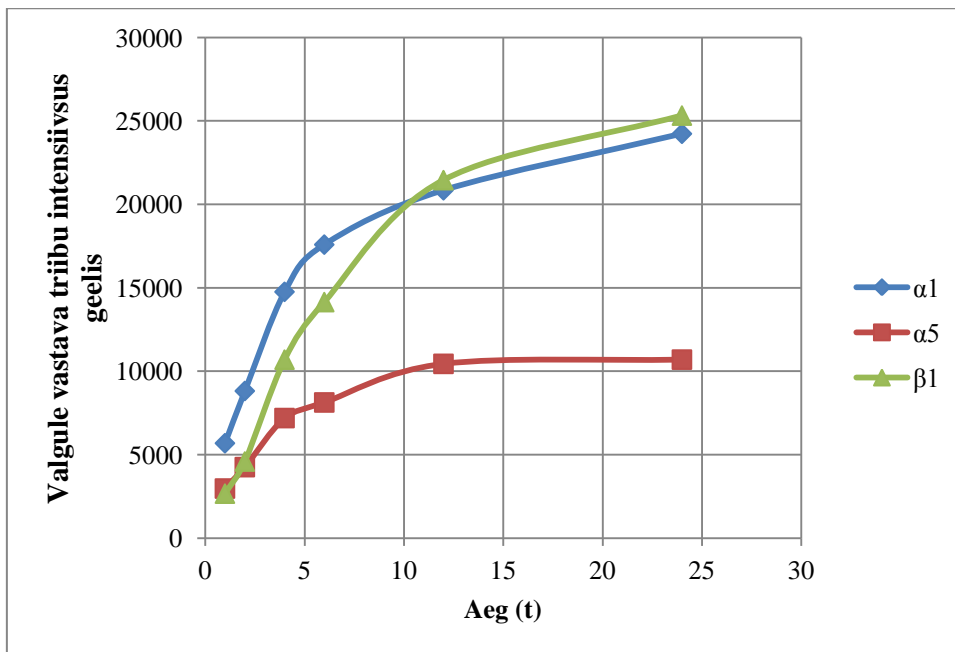
Konstitutiivse sekretsiooni puhul sekreteerivad rakud pidevalt valke ümbritsevasse keskkonda ning see toimub ilma rakuvälise stiimulita. Kui peatada rakkudes valgusüntees, kasutades inhibiitoreid, siis peab kõikide konstitutiivselt sekreteeritavate valkude hulk rakus aja jooksul langema. Samas aga nende valkude hulk, mis paiknevad sekretoorsetes graanulites ei peaks muutuma. Tulemused, mis on esitatud joonisel 11 viitavad sellele, et laminiin 111

sekreteeritakse JAR rakkudest välja konstitutiivset rada pidi. Seda seisukohta toetab asjaolu, et selle laminiini koosseisu kuuluvate  $\alpha 1$ - ja  $\beta 1$ -ahelate tase JAR rakkude kasvukeskkonnas langeb tsükloheksimiidi toimetel märkimisväärselt.



**Joonis 12. Laminiinide 111 ja 511 hulga muutus JAR rakkude kasvukeskkonnas tsükloheksimiidi toimetel.** Laminiinide hulk kasvukeskkonnas tõuseb järsult esimese 4 tunni jooksul. Pärast seda  $\alpha$ -ahelate hulk praktiliselt ei muutu, samal ajal kui  $\beta 1$ -ahela hulk tõuseb jätkuvalt. Kasutatud antikehad olid DG10, H-300 ja LM 4B5.. Ajavahemikud, mille järel JAR rakkudelt eraldati kasvukeskkond on 1, 2, 4, 6, 12 ja 24 tundi.

Praeguseks on teada, et laminiini  $\beta 1$ -ahelat sünteesitakse suuremas hulgas kui  $\alpha$ -ahelaid. Joonisel 12 toodud  $\beta$ -ahela hulga tõus võib olla just sellega seotud.



**Joonis 13. Laminiinide 111 ja 511 hulga muutus JAR rakkude kasvukeskkonnas kust puudus tsükloheksimiid.** Kui JAR rakke kasvatati söötmes, milles puudus tsükloheksimiid, siis laminiini  $\alpha 1$ - ja  $\beta 1$ -ahelate hulk selles pidevalt suurenes. Kuid samal ajal  $\alpha 5$ -ahela hulk ei tõusnud samas tempos. Kasutatud antikehad olid DG10, H-300 ja LM 4B5.. Ajavahemikud, mille järel JAR rakkudelt eraldati kasvukeskkond on 1, 2, 4, 6, 12 ja 24 tundi.

Joonistel 12 ja 13 toodud andmed kinnitavad meie oletust, et laminiinide sekretsioon JAR rakkudest toimub konstitutiivset rada pidi. Esiteks, JAR rakud sekreteerivad laminiine söötmesse ilma, et neile oleks toimitud mingi stiimuliga. Teiseks, joonisel 12 on näha, et tsükloheksimiidi toimetel pärast 6. tundi laminiinide sekretsioon aeglustub või hoopis peatub, samal ajal kui kontrollkultuuris nende hulk kogu aeg kasvab. Kuna tsükloheksimiid peatab valgusünteesi, siis mingil ajahetkel rakud sekreteerivad üha vähem valke, sest uusi ei toodeta juurde. Mis aga puutub  $\alpha 5$ -ahelasse, siis on teada, et trofoblastid sünteesivad seda üsna vähe ja sellepärast on laminiini 511 sekretsiooni tase isegi tsükloheksimiidi puudumisel väga madal (Kim jt., 2012).

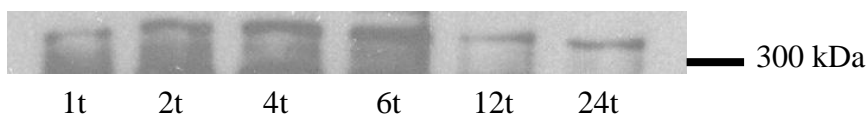
### 2.3.3. Laminiinide proteolüütilise töötlemise tuvastamine JAR rakkudes

Selleks, et uurida laminiinide võimalikku proteolüüsi me analüüsisime  $\alpha 1$ -,  $\alpha 5$ - ja  $\beta 1$ -ahelate terviklikkust JAR rakkude lüsaadis, söötmes, mikrovesiikulis ja rakuvälises maatriksis.

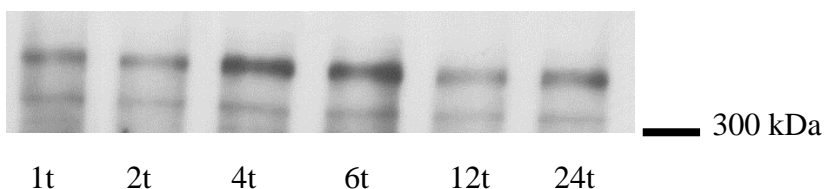
### 2.3.3.1. Laminiini $\alpha 1$ -, $\alpha 5$ - ja $\beta 1$ -ahelad rakulüsaatides.

Kui JAR rakud olid saavutanud 60%-lise konfluentsuse, siis vahetati nende sööde uue vastu ning kasvatati rakke selles 1, 2, 4, 6, 12 ja 24 tundi. Nimetatud aja möödumisel rakud lüüsiiti, ning rakulüsaati analüüsiti 5%-lise SDS-polüakrüülamiidgeeli ja immunoblot meetodi abil.

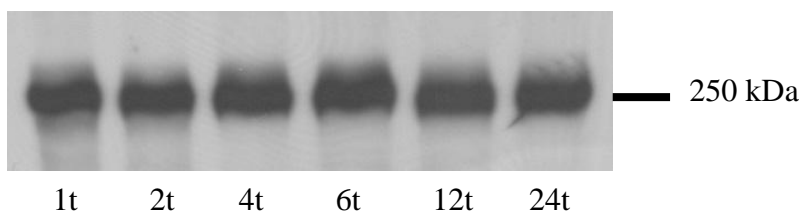
#### $\alpha 1$ -ahel



#### $\alpha 5$ -ahel



#### $\beta 1$ -ahel



**Joonis 14. Laminiini  $\alpha 1$ -,  $\alpha 5$ -, ja  $\beta 1$ -ahelad JAR rakkude lüsaatides.** Kasutatud antikehad on vastavalt H-300, LM 4B5 ja DG10. Ajavahemikud on 1, 2, 4, 6, 12 ja 24 tundi.

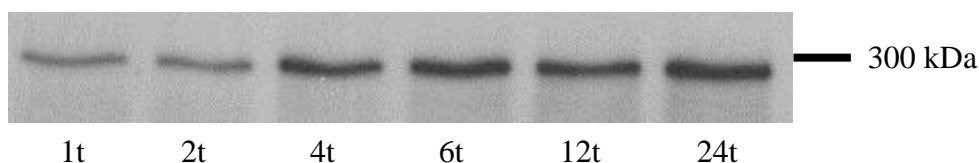
Joonisel 14 alusel võib öelda, et JAR rakkude lüsaadis esineb laminiini  $\alpha 5$ -ahel kahe eri suurusega variandina. Mis puutub  $\alpha 1$ - ja  $\beta 1$ -ahelatesse, siis need on esindatud ainult ühe täispika vormiga.

### 2.3.3.2. Laminiinide $\alpha 1$ -, $\alpha 5$ - ja $\beta 1$ -ahelate tuvastamine JAR rakkude kasvukeskkonnast.

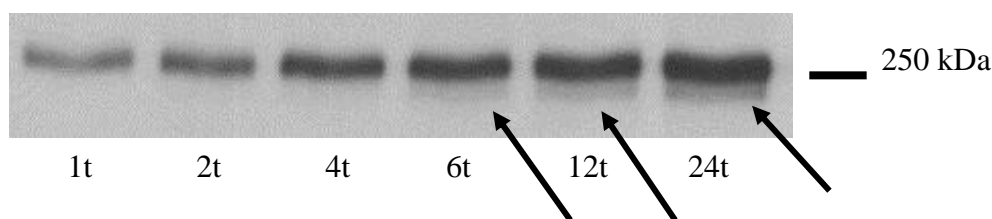
Järgmisena me uurisime, kas JAR rakkude poolt sekreteeritud laminiinid võivad olla allutatud proteolüüsile kasvukeskkonnas. Kui JAR rakud olid saavutanud 60%-lise konfluentsuse, siis vahetati nende sööde uue vastu ning kasvatati rakke selles 1, 2, 4, 6, 12 ja 24 tundi. Nimetatud

aja mõõõdumisel eemaldati rakkudelt kasvukeskkond ning analüüsi seda 5%-lise SDS-polüakrüülamiidgeeli ja immunoblot meetodi abil.

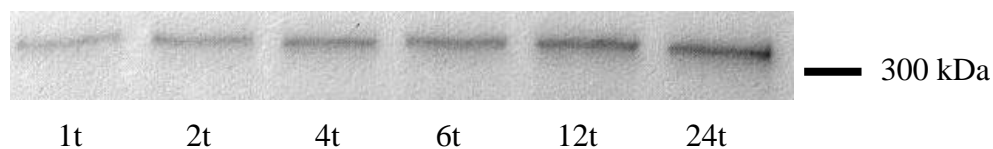
### $\alpha 5$ -ahel



### $\beta 1$ -ahel



### $\alpha 1$ -ahel



**Joonis 15. Laminiinide  $\alpha 1$ -,  $\alpha 5$ - ja  $\beta 1$ -ahelate tuvastamine JAR rakkude kasvukeskkonnast.** Kasutatud antikehad olid vastavalt DG10, LM 4B5 ja H-300. Ajavahemikud on 1, 2, 4, 6, 12 ja 24 tundi. Nooled tähistavad ajapunkte, kus on märgata  $\beta 1$ -ahela proteolüüsi.

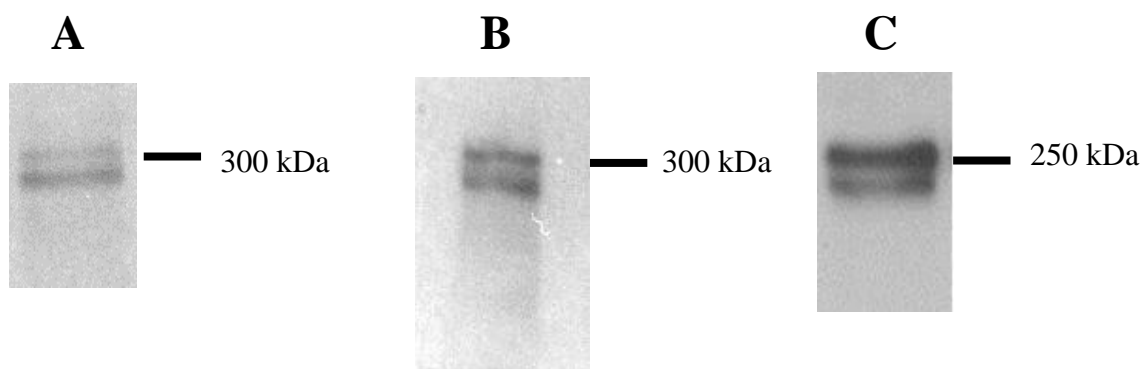
Jooniselt 15 selgub, et JAR rakkude kasvukeskkonnas esineb  $\beta 1$ -ahela kaks vormi – täispikk ja proteolüüsitud vorm, kusjuures proteolüüsitud vormi on palju väiksemas hulgas, kui täispikka molekuli. Mis puutub  $\alpha$ -ahelatesse, siis nii  $\alpha 1$ -, kui ka  $\alpha 5$ -ahel on esindatud ainult ühe proteolüüsitud vormina.

#### 2.3.3.3. Laminiinide $\alpha 1$ -, $\alpha 5$ - ja $\beta 1$ -ahelate tuvastamine JAR rakkude poolt sekreteeritud mikrovesiikulites.

Selleks, et tuvastada kas JAR rakkude poolt sekreteeritud mikrovesiikulid sisaldavad laminiine, eraldati need rakkude kasvukeskkonnast mitmeetapilise tsentrifuugimise teel.



Eraldatud mikrovesiikulid lüüsi, ning saadud proove analüüsiti 5%-lise SDS-polüakrüülamiidgeeli ja immunoblot meetodi abil.

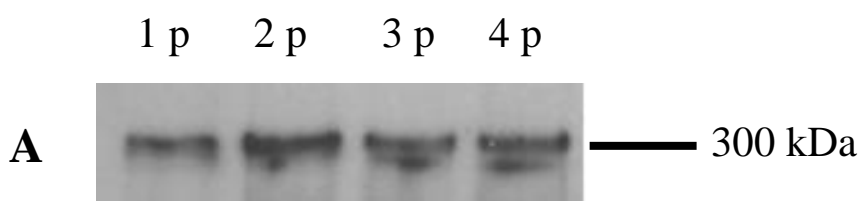


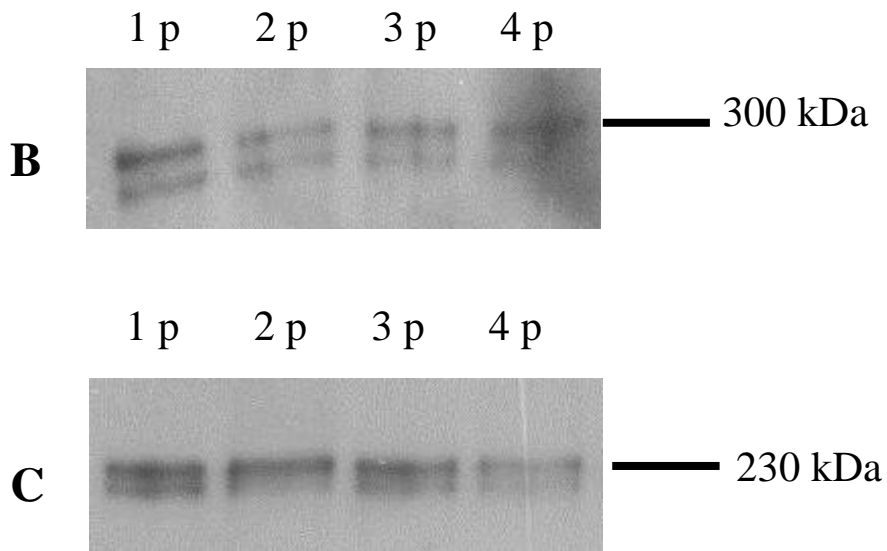
**Joonis 16. Laminiinide  $\alpha$ 1-,  $\alpha$ 5- ja  $\beta$ 1-ahelate tuvastamine mikrovesiikulitest.** (A) laminiini  $\alpha$ 5-ahel; kasutati 4B5 antikeha; (B) laminiini  $\alpha$ 1-ahel; kasutati H-300 antikeha; (C) laminiini  $\beta$ 1-ahel; kasutati DG10 antikeha.

Joonisel 16 esitatud tulemused näitavad, et mikrovesiikulites esinevad  $\alpha$ 1-,  $\alpha$ 5- ja  $\beta$ 1-ahelate kaks vormi. JAR rakkudest eraldunud mikrovesiikulid sisaldavad  $\alpha$ 1- ja  $\alpha$ 5-ahela proteolüüsitud vorme (Joonis 18, A, B), samal ajal  $\beta$ 1-ahela puhul on mikrovesiikulis olemas nii täispikk kui ka proteolüüsitud vorm.

#### 2.3.3.4. Laminiinide 111 ja 511 tuvastamine JAR rakkude poolt tekitatud maatriksist.

Selleks, et tuvastada laminiinide 111 ja 511 olemasolu JAR rakkude poolt tekitatud maatriksis kasvatati neid rakke 1, 2, 3 ja 4 päeva ja igas katsepunktis eraldati tekkinud maatriks. JAR rakkude poolt tekitatud maatriksi valgud lahutati 4%- või 5%-lise SDS-polüakrüülamiidgeel elektroforeesi abil redutseeritud tingimustes. Analüüsi tulemused (Joonis 17, A-C) näitavad, et JAR rakkude maatriksis paiknevad nii täispikad kui ka proteaaside poolt lühemaks lõigatud laminiini ahelad. Nii  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 5 kui ka  $\beta$ 1 ahelad esinevad täispika vormina, ning kõikide ahelate puhul fragmendid, mille näivat molekulkaalu on selle meetodi abil raske hinnata.





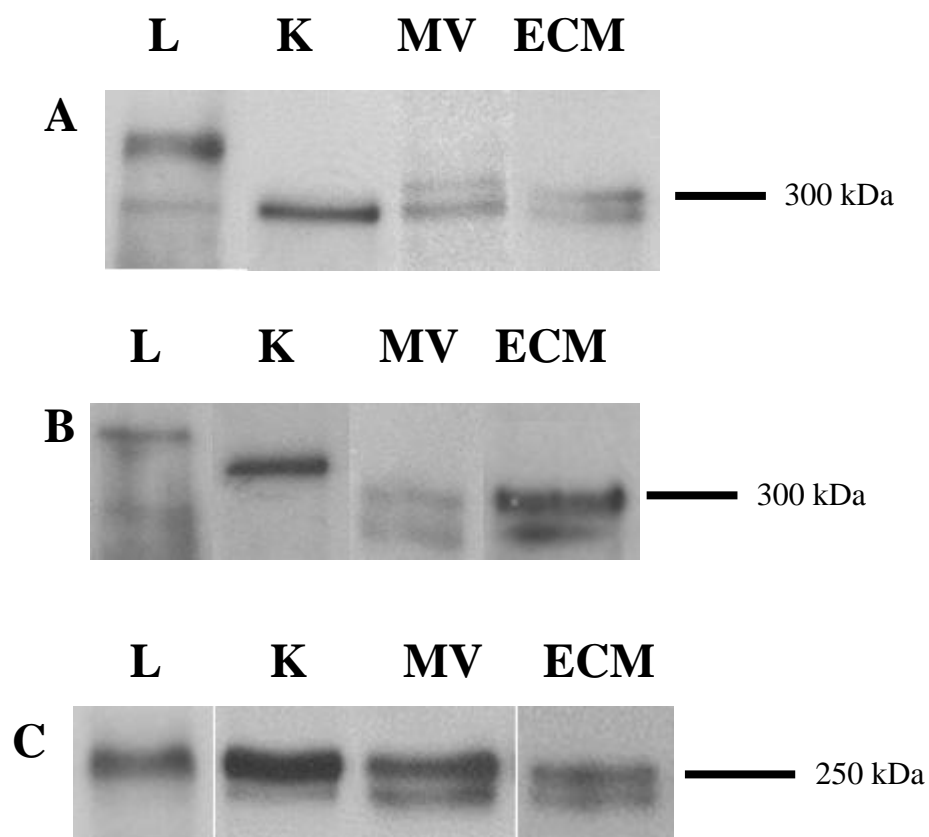
**Joonis 17. JAR rakkude poolt tekitatud maatriksi koostises olevate laminiinide 111 ja LM 511 analüüs.**

Maatriksi valgud lahutati 4%-lise (**B**) või 5%-lise (**A,C**) SDS-poliakrülamiidgeel elektroforeesi abil redutseeritud tingimustes ning kanti üle PVDF membraanile *Western blot* meetodil. (**A**). Laminiini  $\alpha 1$  ahel (antikeha H-300); (**B**). Laminiini  $\alpha 5$  ahel (antikeha LM 4B5); (**C**). Laminiini  $\beta 1$  ahel (antikeha DG10). Negatiivseks kontrolliks oli hiire IgG isotüüpide segu. **1 p – 4 p**: Aeg (päevades), mille järel eemaldati JAR rakkude poolt tekitatud maatriks koekultuuri plastikult.

### 2.3.3.5. Laminiinide $\alpha 1$ -, $\alpha 5$ - ja $\beta 1$ -ahelate proteolüütiline muster.

Jooniselt 18 (A) võime näha, et laminiini  $\alpha 5$ -ahela täispikk isovorm (340 kDa) esineb ainult JAR rakkude lüsaadis. Seda hakatakse proteolüüsima juba raku sees ning kasvukeskkonnas ja rakuvälises maatriksis esineb ainult proteolüüsitud vorm. Huvitav on see, et mikrovesiikulites ja rakuvälises maatriksis on tuvastatav veel ka pikem proteolüüsitud variant. Niisiis mikrovesiikulid ja rakuväline maatriks sisaldavad kahte laminiini  $\alpha 5$ -ahela proteolüüsitud varianti. Joonisel 18 (B) on näha, et rakulüsaadis esineb ainult täispikk  $\alpha 1$ -ahel. Rakkude kasvukeskkonnas on ainult proteolüüsitud vorm ning mikrovesiikulid ja rakuväline maatriks sisaldavad kahte proteolüüsitud vormi, mis on lühemad kui kasvukeskkonnas esinev vorm. Seega laminiini  $\alpha 1$ -ahel lõigatakse kolmeks eri pikkusega vormiks. Laminiini  $\beta 1$ -ahela puhul esineb täispikk ahel nii JAR rakkude tsütoplasmas, kasvukeskkonnas, mikrovesiikulites, aga ilmselt ka rakuvälises maatriksis (Joonis 18, C). Selle ahela proteolüüs algab ilmselt

mikrovesiikulites, jätkub kasvukeskkonnas ning rakuvälisesse maatriksisse ladustatakse nii täispikk ahel kui ka selle proteolüüsitud variant.



**Joonis 18. Laminiini  $\alpha$ 1-,  $\alpha$ 5- ja  $\beta$ 1-ahelate proteolüütiline muster JAR rakkude lüsaadis (L), kasvukeskkonnas (K), mikrovesiikulites (MV) ja rakuvälises maatriksis (ECM). (A) laminiini  $\alpha$ 5-ahel; (B) laminiini  $\alpha$ 1-ahel; (C) laminiini  $\beta$ 1-ahel. Kasutatud antikehad olid vastavalt LM 4B5 (A) ja H-300 (B), DG10 (C).**

## KOKKUVÕTE

Käesoleva töö tulemusena me leidsime, et koorioni kartsinoomi JAR rakuliini rakud sekreteerivad laminiine 111 ja 511 konstitutiivset rada pidi. Seda, et JAR rakuliini rakud sekreteerivad laminiini 111 on näidatud ka varem, kuid sekretsiooni viis on senini jäänud ebaselgeks (Peters jt., 1985). Meie näitasime, et konstitutiivselt sekreteeritud laminiinide hulk kasvukeskkonnas tõuseb pidevalt kogu katseperioodi jooksul. Kui aga peatada valgusüntees JAR rakkudes tsükloheksimiidi toimetel, siis suureneb laminiinide hulk kasvukeskkonnas ainult esimese nelja tunni jooksul. Pärast seda laminiinide hulk kasvukeskkonnas praktiliselt ei muutu. Tuleb märkida, et ka JAR rakkude tsütoplasmas langeb laminiini  $\beta 1$ -ahela tase peale tsükloheksimiidi toimet. Samal ajal tsükloheksimiidiga mõjutamata rakkudes laminiinide hulk eriti ei muutu. Huvitav on see, et tsükloheksimiidi toimetel ei ole  $\beta 1$ -ahela hulga langus JAR rakkude sees pidev, vaid peale 24 tundi selle tase rohkem ei muutu. Põhjuseks võib olla see, et laminiini  $\beta 1$ -ahelat sünteesitakse ülehulgas ning osa sellest ahelast jääb trimeeri pakkimata ning  $\beta 1$ -ahela nõ ülejäaki ei suuda rakk välja sekreteerida.

On teada, et nii trofoblastid kui ka vähirakud sekreteerivad MMP-sid, et lagundada neid ümbritsevas koes rakuvälise maatriksi makromolekule ning sealhulgas ka laminiine (Keeling ja Herrera, 2008). Käesolevas töös me näitame, et laminiini ahelad alluvad proteolüüsile. Kõigepealt tuleb märkida, et  $\alpha 5$ -ahela puhul hakkab proteolüüs toimuma juba raku sees, samas kui kasvukeskkonnas laminiini  $\alpha 1$ -,  $\alpha 5$ - ja  $\beta 1$ -ahelate täispikka vormi üldse ei esine. Me leidsime, et nii mikrovesiikulites kui ka ECM-s on kõigil laminiinide ahelatel sarnane proteolüütiline muster (kui võrrelda kaugust laminiini ahela kahe vormi vahel, siis selgub, et see on samasugune kõikide ahelate puhul). See võib tähendada, et laminiini ahelaid lõikav(ad) MMP(d) tunneb(vad) ainult ühte kindlat piirkonda  $\alpha 1$ -,  $\alpha 5$ - ja  $\beta 1$ -ahelates, mis kõige kergemini allub proteolüüsile. Me oletasime, et MMP-de sekretsioon JAR rakkudest on sõltuv rakkude tihedusest. Meie tulemused ei kinnitanud seda oletust, kuna laminiinide ahelate proteolüüs leidis aset juba esimesel päeval. Seega võib teha järelduse, et MMP-de sekretsioon JAR rakkude poolt on pidev protsess. Meie katsed näitasid, et rakkudevälisesse maatriksisse ladestatakse just laminiini ahelate proteolüüsitud vormid. Praeguseks hetkeks me ei saa täpselt öelda, mil viisil toimub laminiini ahelate proteolüüs. Laminiinid ja MMP-d sekreteeritakse nii vabal kujul kui ka rakkude poolt sekreteeritavate vesiikuliste koosseisus. Võimalik, et mikrovesiikulid võivad seostuda ECM-le ja vabastada rakuvälisesse ruumi MMP-de poolt proteolüüsitud laminiine. Samas meie katsetest selgus ka, et märkimisväärne kogus laminiinidest sekreteeritakse just vabal kujul ning kõik need alluvad proteolüüsile just

kasvukeskkonnas. Tõenäoliselt suur osa neist laminiinidest ladestatakse rakuvälisesse maatriksisse.

## **The secretion of laminins 111 and 511 from choriocarcinoma cell line JAR and the formation of ECM.**

### **SUMMARY**

Trophoblasts are known to produce the great amount of laminins. During migration into the stromal tissue, cells deposit laminins and attach to them by integrins. Moreover, cytotrophoblasts and endothelial cells from embryonic blood vessels secrete laminins into the space between them. These laminins assemble into the basal lamina that acts as a filter for the nutrients, which are transported between mother and embryonic blood. So, we can claim that these ECM constituents play an important role in the maintaining of pregnancy. The goal of our study was to determine the mechanism by which laminins 111 and 511 are secreted from JAR cells. Method that we used is based on the blocking of the protein biosynthesis. Trophoblasts were treated with cycloheximide (a toxin that inhibits protein translational elongation) for several hours. After that, both the cell lysates and medium, where trophoblasts grew, were analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and Western Blot. The results showed that there was a decrease in the amount of laminin  $\alpha 1$ -,  $\alpha 5$ - and  $\beta 1$ -chains both in the cell lysates and medium. These data mean that JAR cells secrete laminins 111 and 511 in a constitutive manner. If laminins are packed into the storage granules that release their cargo only upon cell stimulation, their amount in the cell lysates would remain at the same level. As for medium, there would not be any laminins detectable at all. In our study we also analyzed whether microvesicles released from the JAR cells contain laminins 111 and 511. According to our results JAR cells' microvesicles contain all three laminin chains, represented by two variants. To get more data about the proteolysis of laminin chains, we isolated ECM and analyzed its composition by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and Western Blot. The results showed that similarly to the microvesicles the ECM contains two variants of each laminin chain. The full-length variant of  $\beta 1$ -chain was found both in the cell lysate and in the medium, microvesicles, and ECM. As for  $\alpha 1$ - and  $\alpha 5$ -chains, all of them, that were released outside of the cells, were completely proteolysed. We suppose that microvesicles could deposit their proteolysed material to the ECM. However, at the moment we do not know whether laminin chains' fragments have any function or they are simply the result of spontaneous proteolysis.

## KASUTATUD KIRJANDUS

- Al-Lamki, R. S., Skepper, J. N. ja Burton, G. J. (1999). Are human placental bed giant cells merely aggregates of small mononuclear trophoblast cells? An ultrastructural and immunocytochemical study. *Hum. Reprod.* 14: 496–504.
- Aplin, J. D. (1991). Implantation, trophoblast differentiation and haemochorial placentation: mechanistic evidence *in vivo* and *in vitro*. *J. Cell Sci.* 99: 681–92.
- Aumailley, M. ja Smyth, N. (1998). The role of laminins in basement membrane function. *J. Anat.* 193: 1-21.
- Aumailley, M., Bruckner-Tuderman, L., Carter, W. G., Deutzmann, R., Edgar, D., Ekblom, P., Engel, J., Engvall, E., Hohenester, E., Jones, J. C., Kleinman, H. K., Marinkovich, M. P., Martin, G. R., Mayer, U., Meneguzzi, G., Miner, J. H., Miyazaki, K., Patarroyo, M., Paulsson, M., Quaranta, V., Sanes, J. R., Sasaki, T., Sekiguchi, K., Sorokin, L. M., Talts, J. F., Tryggvason, K., Uitto, J., Virtanen, I., von der Mark, K., Wewer, U. M., Yamada, Y. ja Yurchenco, P. D. (2005). A simplified laminin nomenclature. *Matrix Biol.* 24: 326–332.
- Baines, A. J. (2009). Evolution of spectrin function in cytoskeletal and membrane networks. *Biochem. Soc. Trans.* 37: 796–803.
- Baj-Krzyworzeka, M., Majka, M., Pratico, D., Ratajczak, J., Vilaire, G., Kijowski, J., Reza, R., Janowska-Wieczorek, A. ja Ratajczak, M. Z. (2002). Platelet-derived microparticles stimulate proliferation, survival, adhesion, and chemotaxis of hematopoietic cells. *Exp. Hematol.* 30: 450–459.
- Baj-Krzyworzeka, M., Szatanek, R., Weglarczyk, K., Baran, J., Urbanowicz, B., Brański, Ratajczak ja M. Z., Zembala, M. (2006). Tumour-derived microvesicles carry several surface determinants and mRNA of tumour cells and transfer some of these determinants to monocytes. *Cancer Immunol. Immunother.* 55: 808–818.
- Barry, O. P., Pratico, D., Lawson, J. A. ja FitzGerald, G. A. (1997). Transcellular activation of platelets and endothelial cells by bioactive lipids in platelet microparticles. *J. Clin. Invest.* 99: 2118–2127.
- Barry, O. P., Praticò, D., Savani, R. C. ja FitzGerald, G. A. (1998). Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles. *J. Clin. Invest.* 102: 136–144.
- Barry, O. P. ja FitzGerald, G. A. (1999). Mechanisms of cellular activation by platelet microparticles. *Thromb. Haemost.* 82: 794-800.
- Barry, O. P., Kazanietz, M. G., Praticò, D., Fitzgerald, G. A. ja Pratico, D. (1999). Arachidonic acid in platelet microparticles prostaglandin formation via a protein kinase C / mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* 274: 7545-7556.
- Bishop, W. R. ja Bell, R. M. (1985). Assembly of the endoplasmic reticulum phospholipid bilayer. *Cell* 42: 51-60.

- Beach, A., Zhang, H.-G., Ratajczak, M. Z. ja Kakar, S. S. (2014). Exosomes: an overview of biogenesis, composition and role in ovarian cancer. *J. Ovarian Res.* 7:14.
- Beck, K., Dixon, T. W., Engel, J. ja Parry, D. A. D. (1993). Ionic interactions in the coiled-coil domain of laminin determine the specificity of chain assembly. *J. Mol. Biol.* 231: 311-323.
- Bitbol, M. ja Devaux, P. F. (1988). Measurement of outward translocation of phospholipids across human erythrocyte membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 85: 6783–6787.
- Bonnemaison, M. L., Eipper, B. A. ja Mains, R. E. (2013). Role of adaptor proteins in secretory granule biogenesis and maturation. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* 4: 101.
- Bratton, D. L., Fadok, V. A., Richter, A., Kailey, J. M., A., Guthrie, L. A. ja Henson, P. M. (1997). Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *J. Biol. Chem.* 272: 26159-26165.
- Bryant, G., Rao, C. N., Brentani, M., Martins, W., Lopes, J. D., Martin, S. E., Liotta, L. A. ja Schiffmann, E. (1987). A role for the laminin receptor in leukocyte chemotaxis. *J. Leukoc. Biol.* 41: 220-227.
- Burton, G. J., Watson, A. L., Hempstock, J., Skepper, J. N. ja Jauniaux, E. (2002). Uterine glands provide histiotrophic nutrition for the human fetus during the first trimester of pregnancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87: 2954–2959.
- Candela, M. E., Geraci, F., Turturici, G., Taverna, S., Albanese, I. ja Sconzo, G. (2010). Membrane vesicles containing matrix metalloproteinase-9 and fibroblast growth factor-2 are released into the extracellular space from mouse mesoangioblast stem cells. *J. Cell. Physiol.* 224: 144–151.
- Chung, A. E. (1993). Embryonal carcinoma and the basement membrane glycoproteins laminin and entactin. *Int. J. Dev. Biol.* 37: 141-150.
- Conde-vancells, J., Rodriguez-suarez, E., Embade, N., Gil, D., Matthiesen, R., Valle, M., Elortza, F., Lu, S. C., Mato, J. M. ja Falcon-Perez, J. M. (2008). Characterization and comprehensive proteome profiling of exosomes secreted by hepatocytes. *J. Proteome. Res.* 7: 5157–5166.
- Connor, R. C., Smolker, R. A. ja Richards, A. F. (1992). Two levels of alliance formation among male bottlenose dolphins (*Tursiops* sp.). *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 89: 987–990.
- Cooper, A. R., Kurkinen, M., Taylor, A. ja Hogan, B. L. M. (1981). Studies on the Biosynthesis of laminin by murine parietal endoderm cells. *Eur. J. Biochem.* 119: 189-197.
- Crescitelli, R., Lässer, C., Szabó, T. G., Kittel, A., Eldh, M., Dinzani, I., Buzás, E. I. ja Lötvall, J. (2013). Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles and exosomes. *J. Extracell. Vesicles* 2: 1–10.
- DeBiase, P. J., Lane, K., Budinger, S., Ridge, K., Wilson, M. ja Jones, J. C. R. (2006). Laminin-311 (Laminin-6) fiber assembly by type I-like alveolar cells. *J. Histochem. Cytochem.* 54: 665–672.



- De Matteis, M. A. ja Luini, A. (2008). Exiting the Golgi complex. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 9: 273–284.
- Del Conde, I., Shrimpton, C. N., Thiagarajan, P. ja López, J. A. (2005). Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. *Blood* 106: 1604–1611.
- Deutzmann, R., Aumailley, M., Wiedemann, H., Pysny, W., Timpl, R. ja Edgar, D. (1990). Cell adhesion, spreading and neurite stimulation by laminin fragment E8 depends on maintenance of secondary and tertiary structure in its rod and globular domain. *Eur. J. Biochem.* 191:513-522.
- Diaz, C. ja Schroit, A. J. (1996). Role of translocases in the generation of phosphatidylserine asymmetry. *J. Memb. Biol.* 151: 1–9.
- Dittié, A. S., Klumperman, J. ja Tooze, S. A. (1999). Differential distribution of mannose-6-phosphate receptors and furin in immature secretory granules. *J. Cell Sci.* 112: 3955–3966.
- Durbeej, M. (2010). Laminins. *Cell Tissue Res.* 339: 259-268
- Eken, C., Sadallah, S., Martin, P. J., Treves, S. ja Schifferli, J. A. (2013). Ectosomes of polymorphonuclear neutrophils activate multiple signaling pathways in macrophages. *Immunobiology* 218: 382–392.
- Elazar, Z., Orci, L., Ostermann, J., Amherdt, M., Tanigawa, G. ja Rothman, J. E. (1994). ADP-ribosylation factor and coatamer couple fusion to vesicle budding. *J. Cell Biol.* 124: 415–424.
- Esco, M. A., Wang, Z., McDermott, M. L. ja Kurpakus-Wheatler, M. (2001). Potential role for laminin 5 in hypoxia-mediated apoptosis of human corneal epithelial cells. *J. Cell Sci.* 114: 4033-4040.
- Faille, D., El-Assaad, F., Mitchell, A. J., Alessi, M.-C., Chimini, G., Fusai, T., Grau, G. E. ja Combes, V. (2012). Endocytosis and intracellular processing of platelet microparticles by brain endothelial cells. *J. Cell Mol. Med.* 16: 1731–1738.
- Faisal Khan, K. M., Laurie, G. W., McCaffrey, T. A. ja Falcone, D. J. (2002). Exposure of cryptic domains in the  $\alpha$ 1-chain of laminin-1 by elastase stimulates macrophages urokinase and matrix metalloproteinase-9 expression. *J. Biol. Chem.* 277: 13778-13786.
- Falati, S., Liu, Q., Gross, P., Merrill-Skoloff, G., Chou, J., Vandendries, E., Celi, A., Croce, K., Furie, B. C. ja Furie, B. (2003). Accumulation of tissue factor into developing thrombi *in vivo* is dependent upon microparticle P-selectin glycoprotein ligand 1 and platelet P-selectin. *J. Exp. Med.* 197: 1585–1598.
- Forlow, S. B., McEver, R. P. ja Nollert, M. U. (2000). Leukocyte-leukocyte interactions mediated by platelet microparticles under flow. *Blood* 95: 1317–1323.
- Fox, J. E., Austin, C. D., Reynolds, C. C. ja Steffen, P. K. (1991). Evidence that agonist-induced activation of calpain causes the shedding of procoagulant-containing microvesicles from the membrane of aggregating platelets. *J. Biol. Chem.* 266: 13289–13295.

- Fox, J. E., Austin, C. D., Boyles, J. K. ja Steffen, P. K. (1990). Role of the membrane skeleton in preventing the shedding of procoagulant-rich microvesicles from the platelet plasma membrane. *J. Cell. Biol.* 111: 483–493.
- Frank, S., Gaume, B., Bergmann-Leitner, E. S., Leitner, W. W., Robert, E. G., Catez, F., Smith, C. L. ja Youle, R. J. (2001). The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev. Cell* 1: 515–525.
- Frieser, M., Nöckel, H., Pausch, F., Röder, C., Hahn, A., Deutzmann, R. ja Sorokin, L. M. (1997). Cloning of mouse laminin  $\alpha 4$  cDNA. Expression in a subset of endothelium. *Eur. J. Biochem.* 246: 727-735.
- Gasser, O., Hess, C., Miot, S., Deon, C., Sanchez, J.-C. ja Schifferli, J. A. (2003). Characterisation and properties of ectosomes released by human polymorphonuclear neutrophils. *Exp. Cell Res.* 285: 243–257.
- Gasser, O. ja Schifferli, J. A. (2004). Activated polymorphonuclear neutrophils disseminate anti-inflammatory microparticles by ectocytosis. *Blood* 104: 2543–2548.
- Gasser, O. ja Schifferli, J. A. (2005). Microparticles released by human neutrophils adhere to erythrocytes in the presence of complement. *Exp. Cell Res.* 307: 381–387.
- Gersdorff, N., Kohfeldt, E., Sasaki, T., Timpl, R. ja Miosge, N. (2005). Laminin  $\gamma 3$  chain binds to nidogen and is located in murine basement membranes. *J. Biol. Chem.* 280: 22146–22153.
- Goldfinger, L. E., Hopkinson, S. B., deHart, G. W., Collawn, S., Couchman, J. R. ja Jones, J. C. (1999). The  $\alpha 3$  laminin subunit,  $\alpha 6\beta 4$  and  $\alpha 3\beta 1$  integrin coordinately regulate wound healing in cultured epithelial cells and in the skin. *J. Cell Sci.* 112: 2615-2629.
- Gude, N. M., Roberts, C. T., Kalionis, B. ja King, R. G. (2004). Growth and function of the normal human placenta. *Thromb. Res.* 114: 397–407.
- Hakulinen, J., Sankkila, L., Sugiyama, N., Lehti, K. ja Keski-Oja, J. (2008). Secretion of active membrane type 1 matrix metalloproteinase (MMP-14) into extracellular space in microvesicular exosomes. *J. Cell. Biochem.* 105: 1211–1218.
- Hallmann, R., Horn, N., Selg, M., Wendler, O., Pausch, F. ja Sorokin, L. M. (2005). Expression and function of laminins in the embryonic and mature vasculature. *Physiol. Rev.* 85: 979-1000.
- Hamill, K. J., Kligys, K., Hopkinson, S. B. ja Jones, J. C. R. (2009). Laminin deposition in the extracellular matrix: a complex picture emerges. *J. Cell Sci.* 122: 4409–4417.
- Harris, H. E., Bamburg, J. R. ja Weeds, A. G. (1980). Actin filament disassembly in blood plasma. *FEBS lett.* 121: 175–177.
- Henry, M.D., Satz, J. S., Brakebusch, C., Costell, M., Gustafsson, E., Fässler, R. ja Campbell, K. P. (2001). Distinct roles for dystroglycan,  $\beta 1$  integrin and perlecan in cell surface laminin organization. *J. Cell Sci.* 114: 1137–1144.

- Hirano, H., Imai, Y. ja Ito, H. (2002). Spiral artery of placenta: development and pathology-immunohistochemical, microscopical, and electron-microscopic study. *Kobe J. Med. Sci.* 48: 13–23.
- Hood, J. L., Pan, H., Lanza, G. M. ja Wickline, S. A. (2009). Paracrine induction of endothelium by tumor exosomes. *Lab. Invest.* 89: 1317–1328.
- Horejs, C.-M., Serio, A., Purvis, A., Gormley, A. J., Bertazzo, S., Poliniewicz, A., Wang, A. J., DiMaggio, P., Hohenester, E. ja Stevens, M. M. (2014). Biologically-active laminin-111 fragment that modulates the epithelial-to-mesenchymal transition in embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*
- Horstman, L. L., Jy, W., Jimenez, J. J., Bidot, C. ja Ahn, Y. S. (2004). New horizons in the analysis of circulating cell-derived microparticles. *Keio J. Med.* 53: 210–230.
- Höning, S., Griffith, J., Geuze, H. J. ja Hunziker, W. (1996). The tyrosine-based lysosomal targeting signal in lamp-1 mediates sorting into Golgi-derived clathrin-coated vesicles. *EMBO J.* 15: 5230–5239.
- Ichikawa, N., Kasai, S., Suzuki, N., Nishi, N., Oishi, S., Fujii, N., Kadoya, Y., Hatori, K., Mizuno, Y., Nomizu, M. ja Arikawa-Hirasawa, E. (2005). Identification of neurite outgrowth active sites on the laminin  $\alpha$ 4 chain G domain. *Biochemistry* 44: 5755-5762.
- Iivanainen, A., Sainio, K., Sariola, H. ja Tryggvason, K. (1995). Primary structure and expression of a novel human laminin  $\alpha$ 4 chain. *FEBS Lett.* 365: 183-188.
- Jackson, C. L. ja Casanova, J. E. (2000). Turning on ARF: the Sec7 family of guanine-nucleotide-exchange factors. *Trends Cell Biol.* 6: 60–67.
- Janowska-Wieczorek, A., Majka, M., Kijowski, J., Baj-Krzyworzeka, M., Reca, R., Turner, A. R., Ratajczak, J., Emerson, S. G., Kowalska, M. A. ja Ratajczak, M. Z. (2001). Platelet-derived microparticles bind to hematopoietic stem/progenitor cells and enhance their engraftment. *Blood* 98: 3143–3149.
- Kadoya, Y., Salmivirta, K., Talts, J. F., Kadoya, K., Mayer, U., Timpl, R. ja Ekblom, P. (1997). Importance of nidogen binding to laminin  $\gamma$ 1 for branching epithelial morphogenesis of the submandibular gland. *Development* 124: 683–691.
- Kaufmann, P., Black, S. ja Huppertz, B. (2003). Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. *Biol. Reprod.* 69: 1–7.
- Katayama, H., Yamane, Y., Furukawa, Y., Kitagawa, S., Nakamura, Y. ja Yoshino, K. (2008). Activation of focal adhesion kinase in detached human epidermal cancer cells and their long-term survival might be associated with cell surface expression of laminin-5. *Acta. Derm. Venereol.* 88: 100–107.
- Keller, P. ja Simons, K. (1997). Post-Golgi biosynthetic trafficking. *J. Cell Sci.* 110: 3001–3009.

- Keller, P., Toomre, D., Díaz, E., White, J. ja Simons, K. (2001). Multicolour imaging of post-Golgi sorting and trafficking in live cells. *Nature Cell Biol.* 3: 140–149.
- Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H. ja Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26: 239-257.
- Kim, S. T., Adair-Kirk, T. L., Senior, R. M. ja Miner, J. H. (2012). Functional consequences of cell type-restricted expression of laminin  $\alpha 5$  in mouse placental labyrinth and kidney glomerular capillaries. *PLoS ONE* 7: 41348.
- Klumperman, J., Hille, A., Veenendaal, T., Oorschot, V., Stoorvogel, W., von Figura, K. ja Geuze, H. J. (1993). Differences in the endosomal distributions of the two mannose 6-phosphate receptors. *J. Cell Biol.* 121: 997-1010.
- Korhonen, M. ja Virtanen, I. (1997). The distribution of laminins and fibronectins is modulated during extravillous trophoblastic cell differentiation and decidual cell response to invasion in the human placenta. *J. Histochem. Cytochem.* 45: 569-581.
- Korhonen, M. ja Virtanen, I. (2001). Immunohistochemical localization of laminin and fibronectin isoforms in human placental villi. *J. Histochem. Cytochem.* 49: 313-322.
- Köppler, B., Cohen, C., Schlöndorff, D. ja Mack, M. (2006). Differential mechanisms of microparticle transfer to B cells and monocytes: anti-inflammatory properties of microparticles. *Eur. J. Immunol.* 36: 648–660.
- Lakkaraju, A. ja Rodriguez-Boulan, E. (2008). Itinerant exosomes: emerging roles in cell and tissue polarity. *Trends Cell Biol.* 18: 199–209.
- Lane, J. D., Lucocq, J., Pryde, J., Barr, F. A., Woodman, P. G., Allan, V. J. ja Lowe, M. (2002). Caspase-mediated cleavage of the stacking protein GRASP65 is required for Golgi fragmentation during apoptosis. *J. Cell Biol.* 156: 495–509.
- Liu, C., Yu, S., Zinn, K., Wang, J., Zhang, L., Jia, Y., Kappes, J. C., Barnes, S., Kimberly, R. P., Grizzle, W. E. ja Zhang, H. G. (2006). Murine mammary carcinoma exosomes promote tumor growth by suppression of NK cell function. *J. Immunol.* 176: 1375–1385.
- Lozito, T. P. ja Tuan, R. S. (2012). Endothelial cell microparticles act as centers of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) activation and vascular matrix remodeling. *J. Cell. Physiol.* 227: 534–549.
- Lüthi, A. U. ja Martin, S. J. (2007). The CASBAH: a searchable database of caspase substrates. *Cell Death Differ.* 14: 641–650.
- Mack, M., Kleinschmidt, A., Brühl, H., Klier, C., Nelson, P. J., Cihak, J., Plachý, J., Stangassinger, M., Erfle, V. ja Schlöndorff, D. (2000). Transfer of the chemokine receptor CCR5 between cells by membrane-derived microparticles: a mechanism for cellular human immunodeficiency virus 1 infection. *Nature Med.* 6: 769–775.
- Marinkovich, M. P., Lunstrum, G. P. ja Burgeson, R. E. (1992b). The anchoring filament protein kalinin is synthesized and secreted as a high molecular weight precursor. *J. Biol. Chem.* 267:17900–17906.

- Martin, S. J., Reutelingsperger, C. P. M., McGahon, A. J., Rader, J. A., van Schie, R. C. A. A., LaFace, D. M. ja Green, D. R. (1995). Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J. Exp. Med.* 182: 1545–1556.
- Matsuoka, Y., Li, X. ja Bennett, V. (2000). Adducin: structure, function and regulation. *Cell. Mol. Life Sci.* 57: 884–895.
- Matsuuchi, L., Buckley, K. M., Lowe, A. W. ja Kelly, R. B. (1988). Targeting of secretory vesicles to cytoplasmic domains in AtT-20 and PC-12 cells. *J. Cell Biol.* 106: 239–251.
- Meckes, D. G., Shair, K. H. Y., Marquitz, A. R., Kung, C.-P., Edwards, R. H. ja Raab-Traub, N. (2010). Human tumor virus utilizes exosomes for intercellular communication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 107: 20370–20375.
- Mesri, M. ja Altieri, D. C. (1999). Leukocyte microparticles stimulate endothelial cell cytokine release and tissue factor induction in a JNK1 signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 274: 23111–23118.
- Miner J.H. (2008). Laminins and their roles in mammals. *Microsc. Res. Tech.* 71: 349–356.
- Moser, G., Gauster, M., Orendi, K., Glasner, A., Theuerkauf, R. ja Huppertz, B. (2010). Endoglandular trophoblast, an alternative route of trophoblast invasion? Analysis with novel confrontation co-culture models. *Hum. Reprod.* 25: 1127–1136.
- Muralidharan-Chari, V., Clancy, J., Plou, C., Romao, M., Chavrier, P., Raposo, G. ja D'Souza-Schorey, C. (2009). ARF6-regulated shedding of tumor cell-derived plasma membrane microvesicles. *Curr. Biol.* 19: 1875–1885.
- Muralidharan-Chari, V., Clancy, J. W., Sedgwick, A. ja D'Souza-Schorey, C. (2010). Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression. *J. Cell Sci.* 123: 1603–1611.
- Naom, I., D'Alessandro, M., Sewry, C., Ferlini, A., Topaloglu, H., Helbling-Leclerc, A., Guicheney, P., Schwartz, K., Akcoren, Z., Dubowitz, V. ja Muntoni, F. (1997). The role of immunocytochemistry and linkage analysis in the prenatal diagnosis of merosin-deficient congenital muscular dystrophy. *Hum. Genet.* 99: 535–540.
- Nazarenko, I., Rana, S., Baumann, A., McAlear, J., Hellwig, A., Trendelenburg, M., Lochnit, G., Preissner, K. T. ja Zöller, M. (2010). Cell surface tetraspanin Tspan8 contributes to molecular pathways of exosome-induced endothelial cell activation. *Cancer Res.* 70: 1668–1678.
- Nebenführ, A., Ritzenthaler, C. ja Robinson, D. G. (2002). Brefeldin A: deciphering an enigmatic inhibitor of secretion. *Plant Physiol.* 130: 1102–1108.
- Niimi, T. ja Kitagawa, Y. (1997). Distinct roles of mouse laminin  $\beta$ 1 long arm domains for  $\alpha$ 1 $\beta$ 1 $\gamma$ 1 trimer formation. *FEBS Lett.* 400: 71–74.
- Niimi, T., Kumagai, C., Okano, M. ja Kitagawa, Y. (1997). Differentiation-dependent expression of laminin-8 ( $\alpha$ 4 $\beta$ 1 $\gamma$ 1) mRNAs in mouse 3T3-L1 adipocytes. *Matrix Biol.* 16: 223–230.

- Niimi, T., Hayashi, Y., Futaki, S. ja Sekiguchi, K. (2004). SOX7 and SOX17 regulate the parietal endoderm-specific enhancer activity of mouse laminin  $\alpha 1$  gene. *J. Biol. Chem.* 279: 38055-38061.
- Obrig, T. G., Culp, W. J., Wallace, L. ja Hardesty, B. (1971). The mechanism by which cycloheximide and related glutarimide antibiotics inhibit peptide synthesis on reticulocyte ribosomes. *J. Biol. Chem.* 246: 174-181.
- Pant, S., Hilton, H. ja Burczynski, M. E. (2012). The multifaceted exosome: biogenesis, role in normal and aberrant cellular function, and frontiers for pharmacological and biomarker opportunities. *Biochem. Pharmacol.* 83: 1484–1494.
- Pap, E., Pállinger, E., Falus, A., Kiss, A. A., Kittel, A., Kovács, P. ja Buzás, E. I. (2008). T lymphocytes are targets for platelet- and trophoblast-derived microvesicles during pregnancy. *Placenta* 29: 826-832.
- Pegtel, D. M., Cosmopoulos, K., Thorley-Lawson, D. A., van Eijndhoven, M. A. J., Hopmans, E. S., Lindenberg, J. L., de Gruijl, T. D., Würdinger, T. ja Middeldorp, J. M. (2010). Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 107: 6328–6333.
- Petajaniemi, N., Korhonen, M., Korttesmaa, J., Tryggvason, K., Sekiguchi, K., Fujiwara, H., Sorokin, L., Thornell, L.-E., Wondimu, Z., Assefa, D., Patarroyo, M. ja Virtanen, I. (2002). Localization of laminin  $\alpha 4$ -chain in developing and adult human tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 50: 1113–1130.
- Peyroche, A., Antonny, B., Robineau, S., Acker, J., Cherfils, J. ja Jackson, C. L. (1999). Brefeldin A acts to stabilize an abortive ARF-GDP-Sec7 domain protein complex: involvement of specific residues of the Sec7 domain. *Mol. Cell* 3: 275–285.
- Piccin, A., Murphy, W. G. ja Smith, O. P. (2007). Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood Rev.* 21: 157–171.
- Pierce, R. A., Griffin, G. L., Mudd, M. S., Moxley, M. A., Longmore, W. J., Sanes, J. R., Miner, J. H. ja Senior, R. M. (1998). Expression of laminin  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ , and  $\alpha 5$  chains by alveolar epithelial cells and fibroblasts. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 19: 237-244.
- Pijnenborg, R., Vercruyssen, L. ja Hanssens, M. (2006). The uterine spiral arteries in human pregnancy: facts and controversies. *Placenta* 27: 939–958.
- Pilzer, D., Gasser, O., Moskovich, O., Schifferli, J. A. ja Fishelson, Z. (2005). Emission of membrane vesicles: roles in complement resistance, immunity and cancer. Springer. *Semin. Immunopathol.* 27: 375–387.
- Plopper, G., Falk-Marzillier, J., Glaser, S., Fitchmun, M., Giannelli, G., Romano, T., Jones, J. C. R. ja Quaranta, V. (1996). Changes in expression of monoclonal antibody epitopes on laminin-5r induced by cell contact. *J. Cell Sci.* 109: 1965-1973.
- Pluskota, E., Woody, N. M., Szpak, D., Ballantyne, C. M., Soloviev, D. A., Simon, D. I. ja Plow, E. F. (2008). Expression, activation, and function of integrin  $\alpha_M\beta_2$  (Mac-1) on neutrophil-derived microparticles. *Blood* 112: 2327–2335.

- Polishchuk, R. S., Polishchuk, E. V., Marra, P., Alberti, S., Buccione, R., Luini, A. ja Mironov, A. A. (2000). Correlative light-electron microscopy reveals the tubular-saccular ultrastructure of carriers operating between Golgi apparatus and plasma membrane. *J. Cell Biol.* 148: 45–58.
- Polishchuk, E. V., Pentima, A. Di, Luini, A. ja Polishchuk, R. S. (2003). Mechanism of constitutive export from the Golgi: bulk flow via the formation, protrusion, and en bloc cleavage of large trans-Golgi network tubular domains. *Mol. Biol. Cell.* 14: 4470–4485.
- Pudas, R., Kiema, T.-R., Butler, P. J. G., Stewart, M. ja Ylänne, J. (2005). Structural basis for vertebrate filamin dimerization. *Structure* 13: 111–119.
- Red, H., Cells, B., Connor, J., Paks, C. H., Zwaalt, R. F. A. ja Schroitst, A. J. (1992). Bidirectional transbilayer movement of phospholipid analogs in human red blood cells. *J. Biol. Chem.* 267: 19412–19417.
- Sahu, S. K., Gummadi, S. N., Manoj, N. ja Aradhyam, G. K. (2007). Phospholipid scramblases: an overview. *Arch. Biochem. Biophys.* 462: 103–114.
- Schéele, S., Nyström, A., Durbeej, M., Talts, J. F., Ekblom, M. ja Ekblom, P. (2007). Laminin isoforms in development and disease. *J. Mol. Med.* 85: 825–836.
- Schmid, S. L. (1997). Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process. *Annu. Rev. Biochem.* 66: 511–548.
- Schneider-Poetsch, T., Ju, J., Eyler, D. E., Dang, Y., Bhat, S., Merrick, W. C., Green, R., Shen, B. ja Liu, J. O. (2010). Inhibition of eukaryotic translation elongation by cycloheximide and lactimidomycin. *Nat. Chem. Biol.* 6: 209–217.
- Seigneuret, M. ja Devauxt, P. F. (1984). ATP-dependent asymmetric distribution of spin-labeled phospholipids in the erythrocyte membrane: relation to shape changes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 81: 3751–3755.
- Simons, M. ja Raposo, G. (2009). Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication. *Curr. Opin. Cell Biol.* 21: 575–581.
- Skog, J., Würdinger, T., van Rijn, S., Meijer, D. H., Gainche, L., Sena-Esteves, M., Curry Jr., W. T., Carter, R. S., Krichevsky, A. M. ja Breakefield, X. O. (2008). Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat. Cell Biol.* 10: 1470–1476.
- Southcombe, J., Tannetta, D., Redman, C. ja Sargent, I. (2011). The Immunomodulatory role of syncytiotrophoblast microvesicles. *PloS ONE* 6: e20245.
- Stetler-Stevenson, W. G. (1999). Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention. *J. Clin. Invest.* 103: 1237–1241.
- Zeldovich, V.B., Robbins, J. R., Kapidzic, M., Lauer, P. ja Bakardjiev, A. I. (2011). Invasive extravillous trophoblasts restrict intracellular growth and spread of *Listeria monocytogenes*. *PLoS Pathog.* 7: e1002005.

- Zhang, Y., Liu, D., Chen, X., Li, J., Li, L., Bian, Z., Sun, F., Lu, J., Yin, Y., Cai, X., Sun, Q., Wang, K., Ba, Y., Wang, Q., Wang, D., Yang, J., Liu, P., Xu, T., Yan, Q., Zhang, J., Zen, K. ja Zhang, C.-Y. (2010). Secreted monocytic miR-150 enhances targeted endothelial cell migration. *Mol. Cell* 39: 133–144.
- Zwaal, R. F. ja Schroit, A. J. (1997). Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood* 89: 1121–1132.
- Taraboletti, G., D'Ascenzo, S., Borsotti, P., Giavazzi, R., Pavan, A. ja Dolo, V. (2002). Shedding of the matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP as membrane vesicle-associated components by endothelial cells. *Am. J. Pathol.* 160: 673–680.
- Taraboletti, G., D'Ascenzo, S., Giusti, I., Marchetti, D., Borsotti, P., Millimaggi, D., Giavazzi, R., Pavan, A. ja Dolo, V. (2006). Bioavailability of VEGF in tumor-shed vesicles depends on vesicle burst induced by acidic pH. *Neoplasia* 8: 96–103.
- Taylor, R. C., Cullen, S. P. ja Martin, S. J. (2008). Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 9: 231–241.
- Tetta, C., Bruno, S., Fonsato, V., Deregibus, M. C. ja Camussi, G. (2011). The role of microvesicles in tissue repair. *Organogenesis* 7: 105–115.
- Théry, C., Duban, L., Segura, E., Véron, P., Lantz, O. ja Amigorena, S. (2002). Indirect activation of naïve CD4<sup>+</sup> T cells by dendritic cell-derived exosomes. *Nature Immunol.* 3: 1156–1162.
- Tiger, C.-F., Champlaud, M.-F., Pedrosa-Domellof, F., Thornell, L.-E., Ekblom, P. ja Gullberg, D. (1997). Presence of laminin  $\alpha 5$  chain and lack of laminin  $\alpha 1$  chain during human muscle development and in muscular dystrophies. *J. Biol. Chem.* 272: 28590–28595.
- Tooze, J. ja Burke, B. (1987). Accumulation of adrenocorticotropin secretory granules in the midbody of telophase AtT20 cells: evidence that secretory granules move anterogradely along microtubules. *J. Cell Biol.* 104: 1047–1057.
- Trowsdale, J. ja Moffett, A. (2008). NK receptor interactions with MHC class I molecules in pregnancy. *Semin. Immunol.* 20: 317–320.
- Tsiper, M. V. ja Yurchenco, P. D. (2002). Laminin assembles into separate basement membrane and fibrillar matrices in Schwann cells. *J. Cell Sci.* 115: 1005–1015.
- Turturici, G., Tinnirello, R., Sconzo, G. ja Geraci, F. (2014). Extracellular membrane vesicles as mechanism of cell-to-cell communication: advantages and disadvantages. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 306: 621–633.
- Tzu, J. ja Marinkovich, M. P. (2008). Bridging structure with function: structural, regulatory, and developmental role of laminins. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40: 199–214.
- Urbé, S., Tooze, S. A. ja Barr, F. A. (1997). Formation of secretory vesicles in the biosynthetic pathway. *Biochim. Biophys. Acta.* 1358: 6–22.



- Utani, A., Nomizu, M., Timpl, R., Roller, P.P. ja Yamada, Y. Laminin chain assembly. Specific sequences at the C terminus of the long arm are required for the formation of specific double- and triple-stranded coiled-coil structures. *J. Bio. Chem.* 269:19167–19175.
- Vailly, J., Verrando, P., Champliaud, M.-F., Gerecke, D., Wagman, D. W., Baudoin, C., Aberdam, D., Burgeson, R., Bauer, E. ja Ortonne, J.-P. (1994). The 100-kDa chain of nicein/kalinin is a laminin B2 chain variant. *Eur. J. Biochem.* 219: 209-218.
- Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J. J. ja Lötval, J. O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biol.* 9: 654–659.
- Van Niel, G., Malleghol, J., Bevilacqua, C., Candalh, C., Brugière, S., Tomaskovic-Crook, E., Heath, J. K., Cerf-Bensussan, N. ja Heyman, M. (2003). Intestinal epithelial exosomes carry MHC class II/peptides able to inform the immune system in mice. *Gut* 52: 1690–1697.
- Vuolteenaho, R., Nissinen, M., Sainio, K., Byers, M., Eddy, R., Hirvonen, H., Shows, T. B., Sariola, H., Engvall, E. ja Tryggvason, K. (1994). Human laminin M chain (merosin): complete primary structure, chromosomal assignment, and expression of the M and A chain in human fetal tissues. *J. Cell. Biol.* 124: 381-394.
- White, J., Keller, P. ja Stelzer, E. H. (2001). Spatial partitioning of secretory cargo from Golgi resident proteins in live cells. *BMC Cell Biol.* 2: 19.
- Wiley, R. D. ja Gummuluru, S. (2006). Immature dendritic cell-derived exosomes can mediate HIV-1 trans infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 103: 738–743.
- Williamson, P., Kulick, A., Zachowski, A., Schlegel, R. A. ja Devaux, P. F. (1992). Ca<sup>2+</sup> induces transbilayer redistribution of all major phospholipids in human erythrocytes. *Biochemistry* 31: 6355–6360.
- Yamashita, A., Maeda, K. ja Maéda, Y. (2003). Crystal structure of CapZ: structural basis for actin filament barbed end capping. *EMBO J.* 22: 1529–1538.
- Yurchenco, P. D., Quan, Y., Colognato, H., Mathus, T., Harrison, D., Yamada, Y. ja O’Rear, J. J. (1997). The  $\alpha$ -chain of laminin-1 is independently secreted and drives secretion of its  $\beta$ - and  $\gamma$ -chain partners. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 10189-10194.
- Yurchenco, P. D., Cheng, Y.-S., Campbell, K. ja Li, S. (2004). Loss of basement membrane, receptor and cytoskeletal lattices in a laminin-deficient muscular dystrophy. *J. Cell Sci.* 117: 735-742.
- Zwaal, R. F. A., Roelofsen, B., Comfurius, P. ja van Deenen, L. L. M. (1975). Organization of phospholipids in human red cell membranes as detected by the action of various purified phospholipases. *Biochim. Biophys. Acta.* 406: 83-96.
- Burgeson, R. E. 1996. Laminins in epidermal structures, p. 65-96. P. Ebklom, R. Timpl ja C. Goidis (ed.), *The laminins*, vol. 2. OPA, Amsterdam B. V.

## KASUTATUD VEEBIAADDRESSID

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26810/>

<http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/>

<http://www.expertconsultbook.com/expertconsult/ob/book.do?method=display&type=bookPage&decorator=none&eid=4-u1.0-B978-1-4160-3479-7..10011-4--s0100&isbn=978-1-4160-3479-7>

<https://www.inkling.com/read/langmans-medical-embryology-thomas-sadler-12th/chapter-8/structure-of-the-placenta>

## TÄNUSÕNAD

Ma soovin tänada oma juhendajat Sulev Ingerpuud ja Mariann Koeli igakülgse abi ja põhjaliku juhendamise eest.

# LIHTLITSENTS LÕPUTÖÖ REPRODUTSEERIMISEKS JA LÕPUTÖÖ ÜLDSUSELE KÄTTESAADAVAKS TEGEMISEKS

Mina Arina Lavrits

(sünnikuupäev: 22.04.1991)

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

Trofoblasti rakuliini JAR rakkude poolt toodetud laminiinide 111 ja 511 sekretsioon ning rakuvälise maatriksi moodustamine,

mille juhendaja on Sulev Ingerpuu,

1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

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

Tartus, 26.05.2014