

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

**Regulatoorsete valkude olfaktomeediin-4 ja trombospondiin-4 mõju naha
fibroblastide ja keratinotsüütide proliferatsioonile ning migratsioonile**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Elizabeth Heinmäe

Juhendajad
PhD Mariliis Klaas
MD, PhD Viljar Jaks

TARTU 2021

„Regulaatorsete valkude olfaktomediin-4 ja trombospondiin-4 mõju naha fibroblastide ja keratinotsüütide proliferatsioonile ning migratsioonile“

Nahahaavade paranemine põhineb rakuvälise maatriksi ja eri rakutüüpide vahelistel interaktsioonidel. Trombospondiin-4 (THBS4) soodustavat mõju nahahaavade paranemisele on varasemalt näidatud, kuid olfaktomediin-4 (OLFM4) olulisust protsessis siiani uuritud ei ole. Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli uurida, kuidas OLFM4 ja THBS4 mõjutavad naha fibroblastide ja keratinotsüütide proliferatsiooni ja migratsiooni.

Eksperimentide tulemusena selgus, et OLFM4 kiirendab fibroblastide migratsiooni, mis võib soodustada nende liikumist haava paranemisel tekkivasse fibrinivõrgustikku. Lisaks leiti, et OLFM4 kiirendab keratinotsüütide proliferatsiooni ja diferentseerumist. Nii võib OLFM4 soodustada ka epiteeli taastamist peale vigastust. Katsete tulemustest ilmnes ka THBS4 soodustav mõju fibroblastide migratsioonile ning lisaks tuvastati valgu kõrge tase psoriaasi patsientidel, kellel on kirjeldatud kiiremat haavade paranemist. Töö tulemustest selgub, et mõlemaid valke võiks potentsiaalselt kasutada haavade paranemist soodustavates vahendites.

Märksõnad: rakuväline maatriks, THBS4, OLFM4, keratinotsüüdid, fibroblastid

CERCS: B210 Histoloogia, tsütokeemia, histokeemia, koekultuurid

„The role of Olfactomedin-4 and Thrombospondin-4 in skin fibroblast and keratinocyte proliferation and migration“

Wound healing relies on interactions between the extracellular matrix and different cell types. A possible role for thrombospondin-4 (THBS4) in wound healing has been described previously but the importance of olfactomedin-4 (OLFM4) has not been investigated. The aim of this study was to examine the effect of THBS4 and OLFM4 in skin fibroblast and keratinocyte proliferation and migration.

The results showed that OLFM4 promotes fibroblast migration and therefore the protein could enhance fibroblast migration into the fibrin network. In addition, OLFM4 could promote epithelia regeneration after wounding as the protein promotes keratinocyte proliferation and differentiation. THBS4 was found to promote fibroblast migration and the results show increased expression of THBS4 in psoriasis patients, who's wounds have been described to heal faster. The results of current thesis show that OLFM4 and THBS4 could be potentially used to promote wound healing.

Keywords: extracellular matrix, THBS4, OLFM4, keratinocytes, fibroblasts

CERCS: B210 Histology, cytochemistry, histochemistry, tissue culture

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1.1. Naha üldiseloomustus	7
1.1.1. Naha histoloogiline ehitus	7
1.1.2. Psoriaas.....	9
1.2. Naha homöostaatiline uuenemine	9
1.2.1. Haava paranemine	11
1.3. Rakuväline maatriks	13
1.3.1. Rakuvälise maatriksi peamised tüübid	13
1.3.2. Rakuvälise maatriksi peamised komponendid	14
1.3.3. Olfaktomediin-4 struktuur	16
1.3.4. Olfaktomediin-4 roll organismis	17
1.3.5. Trombospondiin-4 struktuur	18
1.3.6. Trombospondiin-4 roll organismis.....	19
2. EKSPERIMENTAALOSA.....	21
2.1. Töö eesmärgid	21
2.2. Materjal ja meetodika.....	21
2.2.1. Rakkude kasvatamine koekultuuris.....	21
2.2.2. Keratinotsüütide kultiveerimine	21
2.2.3. Fibroblastide kultiveerimine	22
2.2.4. Plasmiidi bakteriaalne transformatsioon ja puhastamine	23
2.2.5. Rakkude transfektsioon	23
2.2.6. Söötme ettevalmistus valguekspressiooni kontrolliks.....	24
2.2.7. Rakkude ettevalmistus valguekspressiooni kontrolliks.....	24
2.2.8. Western Blot.....	24
2.2.9. Immunofluorestsentsanalüüs	25
2.2.10. Rakkude proliferatsiooniprotsendi määramine	27
2.2.11. Rakkude elumuse määramine.....	27
2.2.12. <i>In vitro</i> kraape-meetodil haava paranemise katse	28
2.2.13. Rakkude migratsiooni ja invasiivsuse hindamine	28
2.2.14. Andmete statistiline analüüs.....	29
2.3. Tulemused	29

2.3.1. THBS4 ja OLFM4 ekspressioon psoriaasi patsientide koelõikudes	29
2.3.2. Tranfektsiooni edukuse kontroll.....	32
2.3.3. THBS4 mõju naharakkude proliferatsioonile	33
2.3.4. OLFM4 mõju naharakkude proliferatsioonile.....	35
2.3.5. THBS4 mõju naharakkude migratsioonivõimele.....	36
2.3.6. OLFM4 mõju naharakkude migratsioonivõimele.....	38
2.3.7. THBS4 ja OLFM4 mõju CD71, CD90, ITGB4 ja vimentiini ekspressioonile keratinotsüütides.....	40
2.4. Arutelu.....	43
KOKKUVÕTE	46
SUMMARY.....	47
KIRJANDUSE LOETELU.....	48
KASUTATUD VEEBIAADRESSID	55
LIHTLITSENTS	56

KASUTATUD LÜHENDID

AP	aluseline fosfataas (ingl <i>alkaline phosphatase</i>)
BSA	veise seerumi albumiin (ingl <i>bovine serum albumin</i>)
CD	diferentseerumise klaster (ingl <i>cluster of differentiation</i>)
DAPI	4',6-diamidino-2-fenüülindool (ingl <i>4',6-diamino-2-phenylindole</i>)
DMEM	Dulbecco modifitseeritud Eagle'i sööde (ingl <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)
EGF	epidermaalne kasvufaktor
EMT	epiteliaalne-mesenhümaalne üleminek
FBS	veise loote seerum (ingl <i>fetal bovine serum</i>)
GAG	glükoosaminoglükaan
GPP	generaliseerunud pustulaarne psoriaas
HKGS	lisand inimese keratinotsüütide kasvuks (ingl <i>human keratinocyte growth supplement</i>)
IGF-1	insuliinisarnane kasvufaktor 1 (ingl <i>insulin-like growth factor 1</i>)
IL	interleukiin
ITGB	integriin
ITS	insuliini, transferiini ja seleeni lahus
K	keratiin
MAPK	mitogeen-aktiveeritud proteiinkinaas (ingl <i>mitogen-activated protein kinase</i>)
NF-κB	tuumafaktor kappa B (ingl <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>)
NP-40	nonüülfenoksupolüetoksüetanool
OLFM4	olfaktomeediin-4 (ingl <i>olfactomedin-4</i>)
PBS	fosfaatpuhverdatud soolalahus (ingl <i>phosphate buffered saline</i>)
PVDF	polüvinülideenfluoriid (ingl <i>polyvinylidene difluoride</i>)
RLU	ingl <i>relative light unit</i>
RVM	rakuväline maatriks
SDS	naatriumdodetsüülsulfaat (ingl <i>sodium dodecylsulphate</i>)
TGF	transformeeriv kasvufaktor (ingl <i>transforming growth factor</i>)
THBS4	trombospondiin-4 (ingl <i>thrombospondin-4</i>)
αSMA	alfa silelihase aktiin (ingl <i>alpha smooth muscle actin</i>)

SISSEJUHATUS

Nahahaavade kiire paranemine on oluline organismi homöostaasi tagamiseks ning naha kui kaitsva barjääri taastamiseks. Tegu on organismi ühe keerukaima protsessiga, mis põhineb rakuvälise maatriksi ja eri rakutüüpide vahelistel interaktsioonidel.

Meie uurimisgrupis on varasemalt näidatud OLFM4 suurenenud ekspressiooni maksakahjustuste korral (Klaas jt., 2016). OLFM4 on rakuvälise maatriksi valk, mille ekspressiooni suurenemist on varasemalt kirjeldatud ka põletike korral (Gersemann jt., 2012; Shao jt., 2019). Lisaks on valgul iseloomustatud antiapoptootilisi omadusi (Dassen jt., 2010) ning mõju rakkude liikuvusele (Gersemann jt., 2012; Liu jt., 2006). Siiani ei ole aga keegi uurinud OLFM4 mõju naharakkudele. Lisaks leiti meie uurimisgrupis maksakahjustuse piirkonnas kudede regeneratsiooni toetava valguga, THBS4 suurenenud ekspressioon (Klaas jt., 2016). THBS4 võimalikku positiivset mõju nahahaavade paranemisele on ka varasemalt demonstreeritud. Tegu on angiogeneesi soodustava valguga (Muppala jt., 2017) ning lisaks on THBS4 *knockout* hiirtel näidatud aeglasemat haavade paranemist (Muppala jt., 2015).

Käesoleva töö eesmärgiks oli analüüsida OLFM4 ja THBS4 mõju inimese naha fibroblastide ja keratinotsüütide proliferatsioonile ja migratsioonile ning selgitada, kas antud valke võiks tulevikus kasutada ka haavaravi soodustamisel. Lisaks uuriti OLFM4 ja THBS4 ekspresseerumist inimese nahas ning võimalikke muutusi antud valkude ekspressioonis psoriaasi patsientidel.

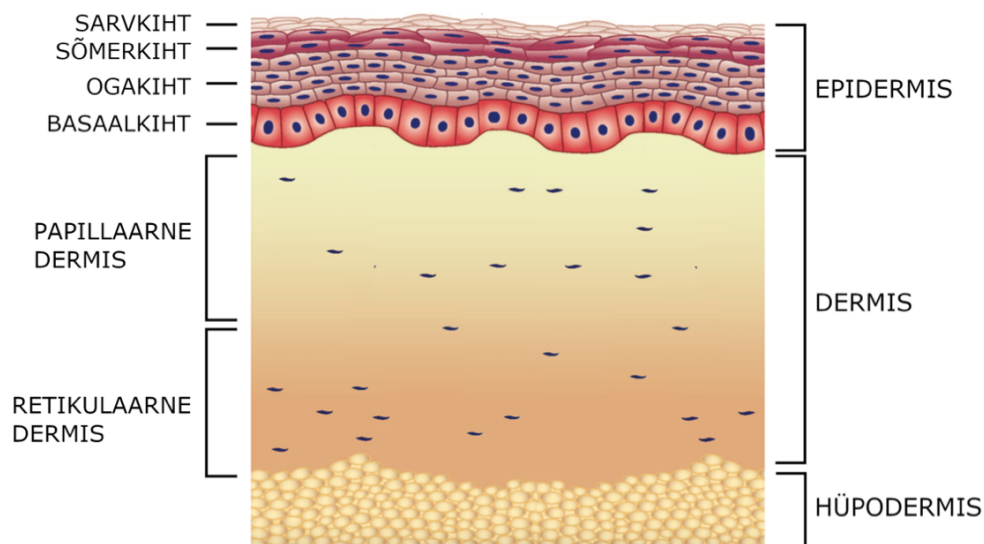
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Naha üldisloomustus

Nahk on selgroogsete loomade välimine kate, millel on organismi terviklikkuse tagamisel ja korrektsel funktsioneerimisel oluline roll. Esiteks kaitseb nahk organismi patogeenide, kemikaalide ning mehhaaniliste vigastuste eest (Yousef jt., 2020). Higinäärmed eritavad mikromolekulaarsed rasvhappeid, mis pidurdavad bakterite ja seente kasvu (Nienstedt jt., 1999). Teiseks reguleerib nahk organismi temperatuuri ja veekadu, omades olulist rolli organismi homöostaasi hoidmises (Yousef jt., 2020). Lisaks asub nahas rohkelt sensoorseid närvilõpmeid, mis võtavad keskkonnast vastu ärritusi ning seetõttu on tegu olulise organiga keskkonna tunnetamises (Roosalu, 2010). Peale selle on nahal ka endokriinne funktsioon, keratinotsüütides toimub päikesevalguse toimel D-vitamiini produktsioon (Nienstedt jt., 1999).

1.1.1. Naha histoloogiline ehitus

Nahk koosneb kolmest, nii anotoomiliselt kui funktsionaalselt selgelt eristatavast kihist: epidermis, dermis ja hüpodermis (joonis 1). **Epidermis** on naha pealmine kiht, mille arvukaim rakutüüp on keratinotsüüdid. Epidermis on pidevas uuenemises, kus proliferatiivsest basaalkihist liiguvad keratinotsüüdid diferentseerumise käigus naha pinna poole ja irduvad sealt. (Yousef jt., 2020)



Joonis 1. Naha histoloogiline ehitus. Nahal on kolm selgelt eristatavat kihti: epidermis, dermis ehk pärisnahk ja hüpodermis ehk nahaaluskude. Epidermis koosneb proliferatiivsest basaalkihist, ogakihist, sõmerkihist ning sarvkihist. Lisaks asub osades keha piirkondades, kus nahk on paksem, sarvkihi ja sõmerkihi vahel läikekiht. Dermis jaguneb papillaarseks ja retikulaarseks dermiseks. Joonis on kohandatud Wong ja Chang (2008) järgi.

Epidermise sügavaimaks kihiks on **basaalkiht** (lad *Stratum basale*). Basaalkihis asuvad mitootiliselt aktiivsed tüvirakud, mis diferentseeruvad edasi keratinotsüütideks, säilitades samal ajal tüvirakkude populatsiooni (Nienstedt jt., 1999). **Melanotsüüdid** asuvad tüvirakkude vahel ja toodavad melaniini, mis neelab valgust ning kaitseb DNA-d UV-kiirguse eest (Zocco ja Blanpain, 2017). Vahetult basaalmembraanil asuvad ka **merkeki rakud**. Tegu on mehhanoretseptoritega, mille membraanid on seotud vabade närvilõpetega. (Yousef jt., 2020).

Basaalkihist naha pinna poole asub **ogakiht** (lad *Stratum spinosum*), mis on 8–10 rakukihi paksune. Selles epidermise kihis asuvad **langerhansi rakud**, mis on osa adaptiivsest immuunsüsteemist ja tagavad naha esmase kaitse (Yousef jt., 2020). Ogakihile järgneb **sõmerkiht** (lad *Stratum granulosum*), mille rakkudes asuvad keratohüaliini sõmerad, mis sisaldavad sarvkihi rakkudes toimuvaks keratiinifilamentide agregatsiooniks vajalikke tsüsteiini- ja histidiinirikkaid valke (Arend ja Aunapuu, 2012). Naha pealne kiht on **sarvkiht** (lad *Stratum corneum*). Sarvkiht on 20–30 rakukihi paksune ja selle laius varieerub piirkonniti enim (Yousef jt., 2020). Diferentseerumise käigus koguneb rakkudesse üha rohkem keratiini (Nienstedt jt., 1999) ning sarvkihi keratinotsüüdid on diferentseerumise lõpuks tuumata, lamendunud ja sarvestunud (Roosalu, 2010). Jalataldadel ja peopesades on nahk paksem ja tugevam epidermises asuva **läikekihi** (lad *Stratum lucidum*) tõttu. Tegu on õhukese rakkude kihiga mis asetseb sarvkihi ja sõmerkihi vahel. (Yousef jt., 2020) Epidermist ja dermist eraldab ekstratsellulaarse matriksi õhuke kiht - basaalmembraan (Mikesh jt., 2013).

Dermis ehk pärisnahk paikneb epidermise all. Arvukaim rakutüüp dermises on fibroblastid, mis toodavad rakuväliseid struktuurivalke ning kollageeni- ja elastiinikiudusid. Just viimased võimaldavad dermisel tagada naha mehhaanilise tugevuse ning absorbeerida nahale rakendatavat mehaanilist jõudu, hoides ära rebenemise. (Abdo jt., 2020) Organismi termoregulatsioonis on olulised pärisnahas asuvad veresooned, mis vastavalt väliskeskkonna temperatuurimuutuse kohaselt laienevad ja kitsenevad (Roosalu, 2010). Dermis koosneb kahest sidekoelisest kihist: papillaarsest ja retikulaarsest dermisest (ingl *papillary dermis* ja *reticular dermis*). Selge piir kahe piirkonna vahel puudub. (Yousef jt., 2020)

Papillaarne dermis asub peal pool, on õhuke ja koosneb tihedalt üksteise vahel olevatest kollageeni ja elastiini fiibritest (Mikesh jt., 2013; Wong jt., 2016). Sisaldades rohkelt vere- ja lümfisooni tagab papillaarne dermis ka epidermise ainevahetuse, kus veresooned puuduvad (Yousef jt., 2020). Selles kihis asuvad ka närvilõpmed (Roosalu, 2010). Retikulaarne dermis asub sügavamal, on paksem ja sisaldab vähem rakke (Yousef jt., 2020). Kollageeni fiibrid on paksemad ja tihkemad ning ei ole nii tihedalt pakitud kui papillaarses dermis (Mikesh jt.,

2013; Wong jt., 2016). Lisaks asuvad retikulaarses dermises rasu- ja higinäärmed ning karvanääpsud (Roosalu, 2010). Kollageenifibreid moodustavad dermises enamasti tüüp I ning tüüp III kollageenid, kuid tüüp III kollageenide osahulk on väiksem, asetsedes põhiliselt papillaarses dermises (Mikesh jt., 2013).

Hüpodermis ehk nahaaluskude on naha sügavaim kiht. See koosneb kohevast sidekoest ning sisaldab palju proteoglükaane ja glükoosaminoglükaane, mis imavad koesse vedelikku (Roosalu, 2010; Wong jt., 2016). Nahaaluskude moodustab organitele termilise ja mehhaanilise kaitsekihi (Roosalu, 2010).

1.1.2. Psoriaas

Psoriaas on levinud nahahaigus, mida esineb üle maailma keskmiselt 1,5–5 % elanikkonnast (World Health Organisation, 2016). Haiguse vorme on erinevaid, millest levinuim on naastuline psoriaas (*psoriasis vulgaris*) (Parisi jt., 2020) ja on tõendeid, et psoriaasi esinemissagedus on kasvamas (Danielsen jt., 2013). Tegu on kroonilise, immuunvahendatud haigusega, mille täpne tekkemehhanism on siiani teadmata, kuid selles on olulised nii geneetilised kui ka keskkonnafaktorid (Naldi ja Mercuri, 2010). Haiguse tekke keskseks rajaks on üleliigne IL-23 (interleukiin-23) vahendatud T-helper rakkude aktivatsioon ning sellest tulenev tsütokiinide tootmine (Lowes jt., 2014). Tulemuseks on muuhulgas keratinotsüütide liiga kiire proliferatsioon ja diferentseerumine (Krueger ja Bowcock, 2005).

Psoriaasi patsientidel täheldatud kiiremat haavade paranemist kui normaalse nahaga patsientidel (Morhenn jt., 2013). Kuigi kliinilised katsed on andnud ka vastandlikke tulemusi, on psoriaasi patsientidel tuvastatud osade antimikroobsete peptiidide kõrgem tase (Frohm jt., 1997) ning haava paranemises oluliste kasvufaktorite, IGF-1 (insuliinisarnane kasvufaktor 1) ja TGF- α (transformeeriv kasvufaktor alfa) suurem hulk (Sørensen jt., 2003). Lisaks võib haava paranemist soodustada suurenenud keratiniseerumise kiirus (Young jt., 2017).

1.2. Naha homöostaatiline uuenemine

Tüvirakud vajavad multipotentsuse säilitamiseks ning proliferatsiooni reguleerimiseks spetsiifilist mikrokeskkonda, mida nimetatakse tüviraku niššiks (Lodish jt., 2016). See kaitseb rakke ning reguleerib nende jagunemist epidermise homöostaasi säilitamiseks (Chermnykh jt., 2018). Rakuvälise maatriksi (RVM) ja rakkude ning rakk-rakk vastastikmõjud hoiavad

tüvirakke mittediferentseerununa ning ka vastupidi, vajadusel soodustavad diferentseerumist. Nahas on tuvastatud kolm epidermaalset tüviraku nišši: epidermise basaalkiht, karvafolliikuli *bulge* piirkond ning rasunääre. (Fuchs ja Horsley, 2008)

Epidermise basaalkihis asuvad tüvirakud tihedas kontaktis RVM valke ja kasvufaktoreid sisaldava basaalmembraaniga (Chermnykh jt., 2018). Proliferatiivsest basaalkihist migreeruvad keratinotsüüdid diferentseerumise käigus naha pinna poole ja irduvad sealt (Yousef jt., 2020). Haavade tekkimisel migreeruvad basaalsed keratinotsüüdid basaalmembraanilt haava pinnale ning osalevad epiteeli taastamises (Houschyar jt., 2020).

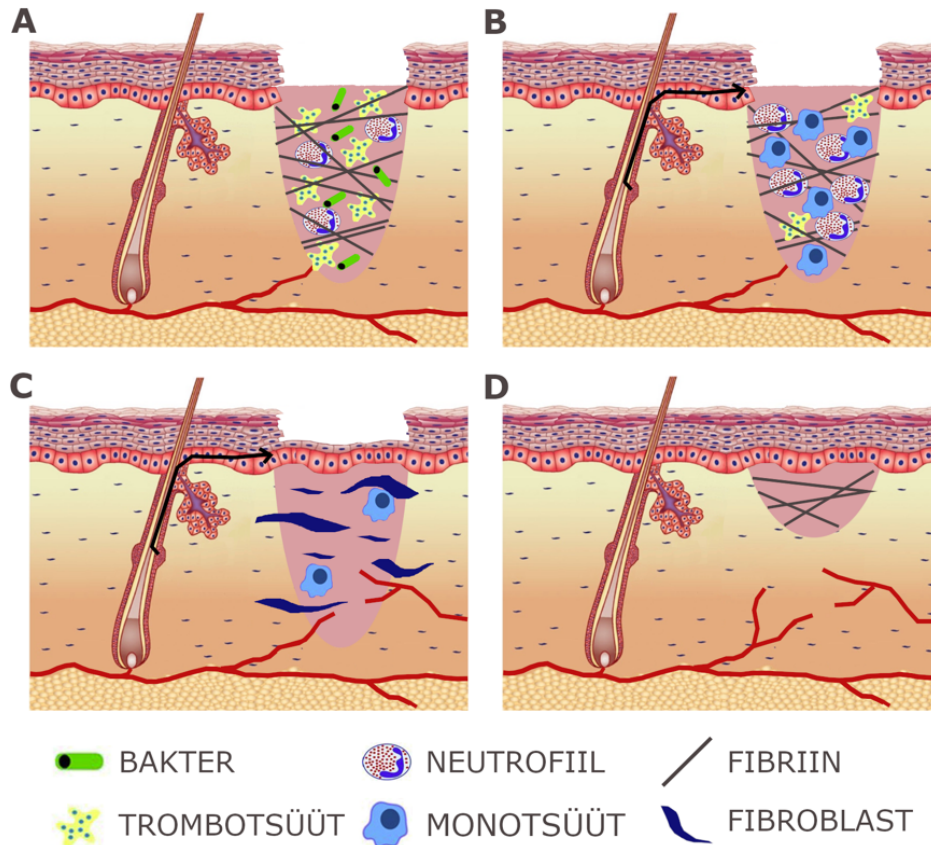
Rasunäärme tüvirakupopulatsiooni säilitamise mehhanism ei ole veel täpselt teada (Chermnykh jt., 2018). On näidatud, et karvanääpsu *bulge* piirkonna rakud on võimelised diferentseeruma rasunäärme tüvirakkudeks (Taylor jt., 2000), kuid näärmel on olemas ka enda tüvirakupopulatsioon (Niemann 2009). Rasunäärme tüvirakud diferentseeruvad sebotsüütideks, mis edasi diferentseerudes ja lüüsudes vabastavad mööda karvanääpsu naha pinnale liikuvat rasu (Niemann 2009).

Kolmas suur tüvirakupopulatsioon asub **karvanääpsu *bulge*** piirkonnas (Amoh ja Hoffman, 2017). Inimese karvanääps läbib elu jooksul regulaarselt neljast faasist koosnevad tsükli: anageen, katageen, telogeen ja eksogeen (Houschyar jt., 2020). Iga tsükliga moodustatakse uus karv ja vana eemaldub. Kuigi karvanääps on väga tundlik paljudele kasvufaktoritele, tsütokiinidele ja hormoonidele, on karvanääpsu tsükkel autonoomne protsess. Karvanääps jaguneb kaheks piirkonnaks: naha pinna poole jääv püsiv osa, mis karvanääpsu uuenemise käigus ei muutu ning alumine osa, mis iga tsükliga remodelleeritakse. (Schneider jt., 2009) **Anageen** on kasvu faas, kus karvanääpsu tüvirakud diferentseeruvad uue karva moodustamiseks esmalt keratinotsüütideks, mis edasi migreeruvad, lamenduvad ja surevad. (Hoover jt., 2021) Järgnevas **katageeni** faasis karvanääpsu alumine 2/3 degenereerub 2–3 nädala jooksul (Houschyar jt., 2020) ning karvafolliikul kaotab 1/6 oma diameetrist (Hoover jt., 2021). Sellele järgnev **telogeen** on puhkefaas, kus karvanääps on passiivses olekus ja karv ei kasva (Hoover jt., 2021). **Eksogeeni** faasis toimub vana karva eemaldamine eelkõige aktiivsete protsesside läbi, aga ka passiivselt mehhaaniliste jõudude mõjul. (Houschyar jt., 2020).

Tavaliselt osalevad sealsed tüvirakud karvanääpsu moodustumises ning ei täienda epidermise basaalkihti (Chermnykh jt., 2018). Haava tekke korral hakkavad aga *bulge* piirkonna tüvirakud migreerima haava piirkonda (Taylor jt., 2000), kus nad keratinotsüütideks diferentseerudes osalevad naha regeneratsioonis (joonis 2C) (Morgun ja Vorotelyak, 2020).

1.2.1. Haava paranemine

Haava paranemist peetakse organismi üheks kõige keerukamaks protsessiks, mis põhineb eri rakutüüpide ja RVM-i vahelistel interaktsioonidel. See protsess jaguneb kolmeks faasiks: põletikuline faas, proliferatiivne faas ja küpsemise faas (joonis 2) (Eming jt., 2014; Rodrigues jt., 2019).



Joonis 2. Haava paranemine. Haava paranemine jaguneb kolmeks faasiks: põletikuline faas, proliferatiivne faas ja küpsemise faas. **Põletikulises faasis (A–B)** aktiveeritakse vahetult peale haava tekkimist trombotsüüdid ja tekib fibriinivõrgustik. Immuunsüsteemi rakkudest migreeruvad esimesena haava piirkonda neutrofiilid. Põletikulise faasi lõpu poole on haava paranemises oluline roll ka langerhansi rakkudel. **Proliferatiivses faasis (C)** toimub angiogenees, keratinotsüütide proliferatsioon ja migratsioon ning fibroblastide proliferatsioon. Moodustub ajutine RVM. *Bulge* piirkonna tüvirakud migreeruvad haava piirkonda ja diferentseeruvad keratinotsüütideks. **Küpsemise faasis (D)** toimub ajutise RVM-i ümberkujundamine, taastatakse naha barjääri omadused ning formuleerub armkude. Joonis on koostatud Wong ja Chang (2008) ning Jeckson jt. (2021) järgi.

Põletikuline faas hõlmab põletikuliste protsesside eest vastutavate rakkude aktiveerimist (joonis 2A–B). Vahetult peale haava tekkimist aktiveeritakse **trombotsüüdid**, et haava kohale tekiks fibriinivõrgustik. Nii tagatakse hemostaas ning lisaks on fibriin raamistikuks haava piirkonda migreeruvatele rakkudele. (Rodrigues jt., 2019) Trombotsüütide degranulatsioon põhjustab ka paljude tsütokiinide vabastamise, mis on kemoatraktantideks neutrofiilidele, makrofaagidele, fibroblastidele ning epiteeli-, endodeeli- ja nuumrakkudele (Gauglitz jt.,

2011). **Neutrofiilid** on esimesed rakud, mis kahjustuse piirkonda migreeruvad. Tegu on organismi esmase kaitsega bakterite vastu. Neutrofiilid sisaldavad erinevate antimikroobsete mediaatoritega graanuleid ja fagotsüteerivad patogeene. (Rodrigues jt., 2019) Ka **makrofaagidel** on suur roll põletikuvastuse kujunemisel. Nad fagotsüteerivad patogeene (Rodrigues jt., 2019) ning sekreteerivad kasvufaktoreid, mis atrakteerivad keratinotsüüte, fibroblaste ning moodustavaid veresooni, soodustades seeläbi epiteeli taastamist ja vaskularisatsiooni (Hosoya jt., 2008). Nahas asuvaid makrofaage nimetatakse langerhansi rakkudeks (Tarnowski ja Hashimoto, 1967). 8–72 tunni jooksul liigub protsess edasi proliferatiivsesse faasi (Gauglitz jt., 2011).

Proliferatiivses faasis toimub angiogenees, keratinotsüütide proliferatsioon ja migratsioon ning fibroblastide proliferatsioon (joonis 2C) (Eming jt., 2014). Kui põletikuvastus on aktiveeritud, algab angiogenees, kus endoteelirakud proliferatsioon ja migreeruvad uute veresoonte moodustumiseks. Lisaks toetavad uute veresoonte moodustumist haava paranemise ajal ka luüdist pärit eellasrakud. Vaskularisatsioon on oluline rakkude proliferatsiooniks vajalike toitainete ning hapniku transpordiks haava piirkonda. Samaaegselt uute veresoonte moodustumisega, proliferatsioon ja migreeruvad fibriini võrgustikku fibroblastid, et moodustada seal ajutine rakuväline maatriks (Rodrigues jt., 2019). See loob võrgustiku vaskularisatsiooniks ja raami haava kinni kasvamiseks (Gauglitz jt., 2011). Osad fibroblastid diferentseeruvad müofibroblastideks mis sisaldavad aktiinifilamente (Gauglitz jt., 2011) ja tõmbavad haava kokku poole (Rodrigues jt., 2019).

Paljunevad fibroblastid viivad RVM-i tootes haava mikrokeskkonna põletikuvastuselt üle kasvu staadiumisse. Paralleelselt toimub ka epiteeli taastamine. Selleks diferentseeruvad tüvirakud basaalmembraanilt, aga toimub ka lõplikult diferentseerunud rakkude dediferentseerumine. Epidermise rekonstrueerimise hulka kuulub ka naha lisandite taastamine. (Rodrigues jt., 2019) Proliferatiivne faas võib kesta 3–6 nädalat. Kui haav on kinni kasvanud, järgneb lõplik küpsemise faas. (Gauglitz jt., 2011)

Küpsemise faasis toimub RVM-i ümberkujundamine, taastatakse naha barjääri omadused ning formuleerub armkude (joonis 2D) (Eming jt., 2014). Toimub küpse RVM-i loomine, kus tüüp III kollageeni sisaldav granulaarkude lüüsitakse ja järk järgult sünteesitakse selle asemele peamiselt tüüp I kollageeni sisaldav küps RVM. Makrofaagid omandavad fibrolüütilise fenotüübi, lagundavad liigse rakuvälise maatriksi ja fagotsüteerivad apoptootilised rakud koos rakuvälise maatriksi jääkidega. Angiogeneesi käigus loodud uued veresooned ei ole tugevad, omades vähe rakk-rakk kontakte. Remodellerimise käigus modifitseeritakse see stabiilseks

homöostaasi hoidvaks vaskulatuuriks. (Rodrigues jt., 2019) Kogu faas võib kesta mõned kuud (Gauglitz jt., 2011).

1.3. Rakuväline maatriks

Rakuväline maatriks moodustub rakkude poolt sekreteeritud valkudest ja polüsahhariididest (Ingerpuu, 2018). RVM kontrollib epidermise tüvirakkude saatust (Chen jt., 2015) ning osaleb rakkude proliferatsiooni, adhesiooni, migratsiooni ja apoptoosi regulatsioonis (Lu jt., 2011). RVM reguleerib rakkude tsütoskeleti organisatsiooni ja enamuse rakke vajavad RVM-i, et kasvada ja prolifereeruda (Alberts jt., 2002). RVM on väga dünaamiline struktuur ning see on oluline nii organismi arenguks kui kudede homöostaasiks. Tegu on laenguga valkude võrgustikuga, millega seonduvad paljud kasvufaktorid ja nii moodustab RVM kasvufaktorite reservuaari. See on eriti oluline morfogeenide puhul, mis määravad rakkude saatuse vastavalt kontsentratsioonile. (Lu jt., 2011) Kasvufaktorid koos proteaasidega võimaldavad rakkude liikumiseks vajaliku RVM-i remodelleerimise: kasvufaktorid initsieerivad RVM komponentide sünteesi, proteaasid aga võimaldavad nende lagundamist (Chermnykh jt., 2018).

1.3.1. Rakuvälise maatriksi peamised tüübid

RVM jaguneb kaheks biokeemiliselt ja morfoloogiliselt erinevaks üksuseks: õhukeseks basaalmembraaniks ja sidekoemaatriksiks, rakkude ekstratsellulaarseks mikrokeskkonnaks (Laurila ja Leivo, 1993). Sidekoe rakkudevaheline maatriks moodustab fibrillaarse võrgustiku, mis ühendab fibroblastide ning teisi RVM-i tootvaid rakke. Moodustunud võrgustik on poorne, mis laseb rakkudel koes liikuda, kuid see on oluline ka koe toetamises. (Schwarzbauer, 1999)

Basaalmembraan eraldab epiteliaalset ja mesenhümaalset kudesid. Moodustub selektiivne barjäär, mida läbivad makrofaagid, lümfotsüüdid ja närvilõpmed (Alberts jt., 2002) ning lisaks on tegu olulise tõkkega kartsinoomirakkude invasioonile (Yamada jt., 2019). Basaalmembraan on keratinotsüütidele substraadiks ja oluline nende organisatsiooniks (Yamada jt., 2019). See struktuur mõjutab rakkude metabolismi, soodustab rakkude proliferatsiooni, diferentseerumist, migratsiooni (Alberts jt., 2002) ja ka polaarsust (Marthiens jt., 2010). Basaalmembraanil on oluline roll ka koe regeneratsioonis, moodustades rakkude migreerumiseks vajaliku võrgustiku (Alberts jt., 2002) ning põletikuvastuse käigus toimub ka ulatuslik basaalmembraani remodelleerimine (Menter ja Dubois, 2012). Lisaks mõjutab basaalmembraan läbi otseste kontaktide tüvirakkudega nende diferentseerumist (Chermnykh jt., 2018). Basaalmembraani

eristatakse ülejäänud RVM-ist vastavalt tema ainuomasele molekulaarsele koostisele ning struktuurile (Ingerpuu, 2018).

Epidermaalse basaalmembraani peamisteks komponentideks on fibroossed valgud (tüüp IV ja tüüp VII kollageen), glükoproteiinid (lamiin) ja proteoglükaanid (hepariinsulfaat). Basaalmembraani ülesehitus on asümmeetriline ning see koosneb kahest kihist: *basal lamina* ning *reticular lamina*. (Menter ja Dubois, 2012) Epiteeli rakud sünteesivad *basal lamina*, kuhu ankurdues saavutavad nad polaarsuse (Abedin ja King, 2010). Moodustuv kiht on lamiini rohkuse tõttu selgelt eristatav (Halfter jt., 2013). Tegu on ka kollageenirikka struktuuriga, kus kollageen IV, mille omapäraks on glütsiin-X-Y korduste ebatäielikkus, vähendab basaalmembraani jäikust (Yamada jt., 2019). *Reticular lamina* sünteesivad fibroblastid ja teised sidekoe rakud (Menter ja Dubois, 2012). Lisaks ehitusele, erinevad ka basaalmembraani kihtide biomehhaanilised omadused. *Basal lamina* on jäigem ning selle põhjuseks pakutakse kihtide erinevat valgulist koostist ja valkude pakkimise astet. (Halfter jt., 2013)

Keratinotsüüdid on basaalmembraanile seondunud läbi hemidesmosoomide. Hemidesmosoomi peamiseks struktuuriks on integriin $\alpha 6\beta 4$ /lamiin-5 kompleks, kus rakud on seondunud basaalmembraani komponendi, lamiin-5-ga läbi integriin $\alpha 6\beta 4$ heterodimeeri. (Jones jt., 1998; Mitsuhashi ja Hashimoto, 2003) Sidekoe on basaalmembraan nahas seotud läbi tüüp VII kollageenist moodustunud spetsiaalsete ankurdavate fibrillide. Nende olulisust demonstreerib hästi nahahaigus *epidermolysis bullosa dystrophica*, kus villide tekkimise põhjuseks on just selliste ühenduste puudmine või hävimine. (Alberts jt., 2002)

1.3.2. Rakuvälise maatriksi peamised komponendid

Kollageenid on fibroosete valkude perekond (Alberts jt., 2002), mida on rakuvälises maatriksis kõige rohkem (Ricard-Blum, 2011). Kollageeni tüüpe on erinevaid, ning nahas asuvad fibrille moodustavatest kollageenidest kollageenid tüüp I, II, III, V ja XI (Alberts jt., 2002). Kollageenifibriid aitavad RVM-i organiseerida (Alberts jt., 2002), annavad maatriksile vastupidavuse tõmbejõule ning lisaks reguleerivad rakkude adhesiooni, migratsiooni ning suunavad koe arengut (Frantz jt., 2010). Tüüp IV kollageen on oluline basaalmembraani komponent ning uuringud on näidanud kollageen IV olulisust epidermaalse tüvirakupopulatsiooni säilitamisel (Chermnykh jt., 2018). Tüüp VI kollageeni on palju karvafolliikulites ning see on sealse tüviraku nišši oluline rakuvälise komponent, mille ekspressiooni suurenemine on leitud haava paranemise korral (Chen jt., 2015). Kollageeni

molekul on struktuurilt pikk kolmikheeliks, mis moodustub ümber üksteise põimunud α -ahelatest. α -ahel koosneb omakorda glütsiin-X-Y tripletitest, kus X on kõige sagedaimini proliin ning Y hüdroksüproliin. (Alberts jt., 2002) Kolmikheeliksi tekke võimaldab α -ahelas iga kolmanda aminohappena asetsev glütsiin, mis oma väiksuse tõttu mahub kolmikheeliksi sisemusse (Ernst jt., 1995). α -ahelad võivad moodustada kas homo- või heterotrimeeri (Ricard-Blum, 2011).

Elastiinifibriid võimaldavad koel peale venitust algstruktuur taastada. Kollageenifibriid seonduvad elastini fiibritega ning limiteerides nende venivust hoidavad ära koe rebenemise. Elastiinifibriite põhikomponendiks on elastiin. Tegu on kergelt hüdrofoobse, fibroosse valguga, mis sisaldab sarnaselt kollageenile palju proliini ning glütsiini, kuid ei ole glükosüleeritud. Elastiin koosneb kahte tüüpi lühikestest segmentidest, mis vahelduvad: hüdrofoobsed segmendid (vastutavad elastsete omaduste eest) ningalaniini/lüsiini rikkad α -heeliks segmendid (moodustavad ristsidemeid lähedal asuvate molekulide vahel). (Alberts jt., 2002)

Fibronektiin on suur fibroosne glükoproteiin, mis osaleb rakkude adhesioonis, kasvus, migratsioonis ja diferentseerumises (Chermnykh jt., 2018). Ta on paljude RVM komponentide seondumiskohaks (Alberts jt., 2002) ning seeläbi oluline otseste kontaktide loomises rakkude ning RVM vahel (Alberts jt., 2002; Schwarzbauer, 1999). Lisaks soodustab fibronektiin haava paranemise korral rakkude migratsiooni (Alberts jt., 2002) ning nahas inhibeerib fibronektiin keratinotsüütide terminaalset diferentseerumist (Chermnykh jt., 2018). Struktuurilt on tegu dimeeriga, mis koosneb kahest, C-terminuse lähedalt disulfiidsildadega seotud suurest subühikust. Iga subühik koosneb funktsionaalselt erinevatest domäänidest ning neid eraldavad painduvad polüpeptiidahelad. (Alberts jt., 2002)

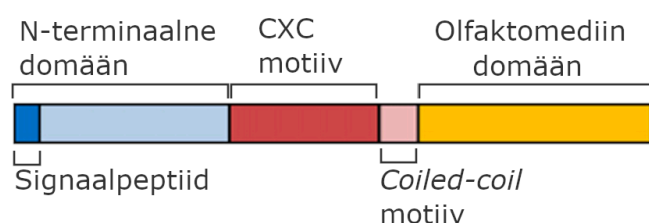
Lamiinid on samuti fibroossed valgud, mis on peamiselt lokaliseerunud basaalmembraanile (Mouw jt., 2014) ning tegu tundub olevat ainsa basaalmembraani komponendiga, mille olemasolu on basaalmembraani formeerumiseks hädavajalik (Jourquin jt., 2010). Struktuurilt on tegu paindliku valguga, mis koosneb disulfiididega seotud, asümmeetriliseks ristiks seotud kolmest pikast α -, β - ja γ -polüpeptiidahelast (Alberts jt., 2002). Mutatsioonid basaalmembraanis olulise lamiin-5 geenides on üheks *epidermolysis bullosa* peamiseks tekkepõhjuseks (Mitsuhashi ja Hashimoto, 2003).

Proteoglükaanid on väga hüdrofiilsed polüsahhariidid, mis moodustavad fibroossete valkude ümber geeli laadse substantsi (Alberts jt., 2002). Struktuurilt koosnevad proteoglükaanid tuumvalgust ja glükoosaminoglükani (GAG) ahelatest (Alberts jt., 2002), mida on sõltuvalt

proteoglükaanist 3–5 (Sarrazin jt., 2011). Tegu on mittehargnevate polüsahhariidahelatega, mis koosnevad korduvatest disahhariidi ühikutest, uroonhapest ning aminosuhkrust (glükoosamiin, galaktoosamiin) (Ernst jt., 1995), kus uroonhappe karboksüülrühmad ning sulfaatrühmad annavad proteoglükaanidele iseloomuliku negatiivse laengu (Prydz, 2015). Negatiivne laeng tõmbab ligi osmootselt aktiivseid katioone (näiteks Na^{2+} -ioone), mille tõttu liigub RVM-i suures koguses vett. Tekkiv turgorrõhk annab RVM-ile vastupidavuse survejõule ning geeljas struktuur võimaldab toitainete, metaboliitide ning hormoonide difusiooni vere ja rakkude vahel. (Alberts jt., 2002) Hüaluroonhape on GAG, mida on rohkelt dermises, kuid seda leidub palju ka epidermise prolifereravas basaalkihis. Terminaalselt diferentseerunud sarvkesta rakkudel on hüaluroonhapet vähe ning sellel on potentsiaalselt oluline roll keratinotsüütide proliferatsioonis. Epidermises on täheldatud peale koe kahjustumist hüaluroonhappe hulga kiiret kasvu. (Tammi jt., 2005)

1.3.3. Olfaktomeediin-4 struktuur

Olfaktomeediini perekond koosneb seitsmest evolutsiooniliselt ja funktsionaalselt erinevast alamperekonnast (Zeng jt., 2005). Kuigi alamperekondade aminohappeline järjestus on väga erinev, on neil kõigil C-terminuses asuvas olfaktomeediin domäänis olemas sarnased β -leht motiivid (Zeng jt., 2005), mida seostatakse olfaktomeediin-4 (OLFM4) sekretsiooni ning rakuväliste signaalide ülekandmisega rakku (Zhang jt., 2004). N-terminuses asub olfaktomeediini perekonna valkudel tavaliselt sekretsioonisignaal (Zeng jt., 2005), millele järgneb CXC motiiv (joonis 3) (Liu jt., 2006). N-terminuses asuvad OLFM4-l α -heeliks motiivid (Zeng jt., 2005) ning seal asub ka *coiled-coil* motiiv (Liu jt., 2006). Lisaks on OLFM4-l kokku seitse tsüsteiini jääki (Yokoe ja Anholt, 1993), mis asuvad CXC motiivis ja C-terminaalses regioonis (Liu jt., 2006). Läbi nende moodustuvad polümeeride loomiseks intra- ja intermolekulaarsed disulfiidsidemed ning nad on olulised ka sekretsiooniks (Liu jt., 2006).



Joonis 3. OLFM4 domäänide aresetus. C-terminuses asub olfaktomeediin domään, mis osaleb OLFM4 sekretsioonis ja rakuväliste signaalide ülekandmisel rakku. Sellele järgneb *coiled-coil* ning CXC motiiv. OLFM4-l on CXC motiivis ning C-terminaalses osas seitse tsüsteiini jääki, läbi mille moodustuvad intra- ja intermolekulaarsed disulfiidsidemed. N-terminaalses domäänis asub signaalpeptiid. Joonis on koostatud Liu jt. (2006) ning Zeng jt. (2005) järgi.

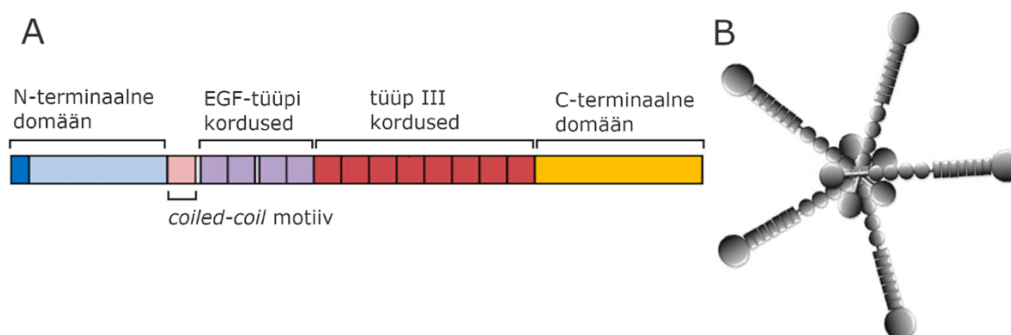
1.3.4. Olfaktomeediin-4 roll organismis

Olfaktomeediin-4 ekspressioon on koespetsiifiline (Zhang jt., 2002) ning seda seostatakse kudede, millel on kõrge regeneratiivne võimekus (Zhang jt., 2004). OLFM4 ekspresseerub peamiselt luuüdis, seedesüsteemis (Zhang jt., 2004) ja jämesoole limaskesta krüptides, kus valgu ekspressioon epiteelialsetes rakkudes väheneb luumeni pinna poole (Liu jt., 2008). OLFM4 on rakkudes lokaliseerunud perinukleaarsesse tsütoplasmasse ja rakumembraani (Liu jt., 2006; Zhang jt., 2004). Tegu on glükoproteiiniga, mis kuulub ka rakuvälise maatriksi koosseisu (Liu jt., 2006). On näidatud, et näiteks neutrofiilid sekreteerivad OLFM4 läbi eksosoomide (Shao jt., 2019). OLFM4 on tuvastatud rakuväliselt endomeetriumis (Dassen jt., 2010) ning maovähi (Oue jt., 2009) ja jämesoolevähi (Seko jt., 2010) kudedes. Kasvajates oli valgu ekspressiooni suurenemine korrelatsioonis kasvaja invasiivsusega (Seko jt., 2010).

On leitud, et OLFM4-l on oluline roll põletike korral. OLFM4 ekspressioon tõuseb märkimisväärselt *Crohn*'i tõvega patsientidel, kellel hakkavad OLFM4 sekreteerivad rakud kiirelt luumeni pinna poole liikuma, eritades valku soole pinnale (Gersemann jt., 2012). Lisaks tuvastati suurenenud OLFM4 tase generaliseerunud pustulaarse psoriaasi (GPP) patsientidel, kelle neutrofiilide sekreteeritud eksosoomides oli OLFM4 hulk kõrgem. OLFM4 soodustas ka keratinotsüütides kemokiinide ekspressiooni ja sekretsiooni, mis on nahakahjustustes kriitiliselt olulised neutrofiilide ja teiste immuunrakkude migratsiooniks ja agregatsiooniks. (Shao jt., 2019) OLFM4 osaleb ka kaasasündinud immuunsüsteemi regulatsioonis bakteriaalsete infektsioonide vastu. Katsed OLFM4 *knockout* hiirtega on demonstreerinud, et *Helicobacter pylori* koloniseerib OLFM4 puudumisel mao limaskesta oluliselt vähemal määral (Liu jt., 2010). Kui nakkus jõuab kroonilisse faasi, on OLFM4 tootmine kõrgem (Liu jt., 2010) ja on tuvastatud, et *H.pylori* infektsioon suurendab OLFM4 ekspressiooni läbi tuumafaktor kapp B (NF- κ B). NF- κ B on vajalik OLFM4 baasekspressiooniks ning NF- κ B ekspressiooni võimendamine suurendab ka OLFM4 promootori aktiivsust. (Kim jt., 2010) OLFM4 promootori regioonil on NF- κ B seundumissait, mille eemaldamisel OLFM4 baasekspressioon väheneb (Chin jt., 2008; Gersemann jt., 2012). OLFM4 ekspressiooni indutseerib ka proinflammatoorne tsütokiin IL-8 (Chen jt., 2011).

Lisaks on OLFM4-l demonstreeritud antiapoptootilised omadused (Dassen jt., 2010). NF- κ B poolt indutseeritud OLFM4 ekspressioon vähendab rakkude apoptoosi ning OLFM4 geeni puudumine muudab rakke tundlikumaks stressifaktoritele nagu vesinikperoksiid (Kim jt., 2010). GRIM-19 on tugev rakkude apoptoosi indutseerija (Kobayashi jt., 2007) ning OLFM4 vähendab märkimisväärselt GRIM-19 võimet vahendada rakulist apoptoosi ja reguleeritud

kasvufaktori (EGF) tüüpi järjestust, kaltsiumi-siduv domään ning globulaarne C-terminaalne domään (Narouz-Ott jt., 2000; Zhang jt., 2002). Trombospondiin-4 (THBS4) C-terminusele järgnevad tüüp III kaltsiumi siduvad kordused ning moodustuv piirkond on kõrgelt konserveerunud (Zhang jt., 2002) (joonis 4). Sellele järgneb neli tüüp II, EGF-tüüpi kordust (Zhang jt., 2002) ning *coiled-coil* motiiv, mis sisaldab pentameeri moodustumiseks vajalikke konserveerunud tsüsteiini jääke (Adams ja Lawler, 1993; Narouz-Ott jt., 2000). Eelistatult moodustab THBS4 homopentameere, kuid *in vivo* on näidatud ka heteropentameeride formuleerumist (Södersten jt., 2006). N-terminuses asub THBS4-l hepariini siduv domään (Narouz-Ott jt., 2000).



Joonis 4. THBS4 domäänide asetus (A) ning moodustuv pentameer (B). C-terminusele järgnevad tüüp III kaltsiumi siduvad kordused. Edasi asetsevad neli tüüp II, EGF-tüüpi kordust ning *coiled-coil* motiiv, mis sisaldab pentameriseerumiseks vajalikke tsüsteiini jääke. N-terminuses asub hepariini siduv domään. Joonis on koostatud Stenina-Adognravi ja Plow (2019) ning Brody jt. (2016) põhjal.

1.3.6. Trombospondiin-4 roll organismis

On näidatud, et TGF- β 1 suurendab trombospondiin-4 ekspressiooni endoteliaalsetes rakkudes ja normaalse naha ning hüpertroofilise armi fibroblastides (Qian jt., 2018). TGF- β 1 mõju THBS4-le vahendavad Smad3 (Muppala jt., 2017; Qian jt., 2018) ning p38-MAPK (p38 mitogeen-aktiveeritud proteiinkinaas) (Qian jt., 2018) ja THBS4 võimendab enda ekspressiooni positiivse tagasiside kaudu, suurendades Smad3 ning p38-MAPK aktivatsiooni (Qian jt., 2018). On demonstreeritud, et THBS4 kõrgema ekspressiooni korral suurenes ning madalama korral langes TGF- β 1 tase nii normaalse naha kui hüpertroofilise armi fibroblastides. Seega võib THBS4 soodustada ka TGF- β 1 tootmist. (Qian jt., 2019)

THBS4 on leitud kõikjal hüpertroofiliste armide RVM-is ning sealsed fibroblastid ekspresseerivad THBS4 oluliselt rohkem kui terve naha fibroblastid (Qian jt., 2019). THBS4 vahendab TGF- β 1 indutseeritud hüpertroofilise armi moodustumist nii *in vitro* kui *in vivo*. On näidatud, et THBS4 madal ekspressioonitase vähendab TGF- β 1 indutseeritud hüpertroofilise

armi teket ning armi fibroblastide proliferatsiooni, invasiooni, migratsiooni. Lisaks põhjustab THBS4 vähesus hüpertroofilise armi fibroblastide elumuses 30% languse ja nende invasioonis ning migratsioonis umbes 50% languse. THBS4 madal ekspressioonitase vähendab vastusena TGF- β 1 töötlusele ka fibroosi markerimolekulide (fibronektiin, alfa-silelihase aktiin (α -SMA) ja kollageen I) taset. (Qian jt., 2018).

THBS4 on oluline rakuvälise maatriksi valk haava paranemisel. THBS4-1 on proangiogeensed omadused (Muppala jt., 2017) ning angiogeneesi võimendamine kiirendab haava paranemist (Muppala jt., 2015). Vastusena TGF- β 1-le kiirendab THBS4 angiogeneesi (Muppala jt., 2017), endoteliaalsete rakkude proliferatsiooni (Muppala jt., 2015) ja aktivatsiooni, ning soodustab makrofaagide adhesiooni ja migratsiooni (Frolova jt., 2010). Lisaks on oletatud, et THBS4 ekspressiooni suurenemine võib aktiveerida fibroblastide proliferatsiooni ja inhibeerida apoptoosi (Qian jt., 2019). Katsed THBS4 *knockout* hiirtega on näidanud aeglasemat haava paranemist (Muppala jt., 2015). THBS4 mõjutab ka proinflammatooset signaliseeringut. THBS4 *knockout* hiirtel tuvastati atelasklerootilistes kahjustustes vähenenud p38-MAPK aktivatsioon ning vaskulaatorne põletik. THBS4 seondumisega makrofaagidele toimub p38-MAPK fosforüleerimine, mis on oluline intratsellulaarsete tsütokiinide produktsiooni ja põletikuvastuse vahendajate regulaator. THBS4 *knockout* hiirtel oli atelasklerootilise kahjustuse piirkonnas makrofaagide arv vähenenud ning THBS4 soodustas makrofaagide adhesiooni ja migratsiooni sõltuvalt kogusest. (Frolova jt., 2010)

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärkideks oli:

1. Analüüsida, kuidas OLFM4 ja THBS4 mõjutavad inimese primaarsete keratinotsüütide, HaCaT rakuliini rakkude ning naha fibroblastide proliferatsiooni ja migratsiooni;
2. Uurida, milline on OLFM4 ja THBS4 ekspressioon inimese nahas ja kas antud valkude ekspressioon erineb psoriaasi patsientide ning terve nahaga patsientide naha koelõikudes;

2.2. Materjal ja meetodika

2.2.1. Rakkude kasvatamine koekultuuris

Kõik töös kasutatud rakuliinid ja -kultuurid on välja toodud tabelis 1. Rakke kasvatati inkubaatoris 37 °C ning 5 % CO₂ juures. Rakud passeeriti 0,05 % trüpsiini (Gibco, Thermo Fisher) abil umbes 80 % konfluentsuse saavutamisel.

Inimese naha fibroblaste, HaCaT rakuliini, HEK 293 rakuliini ning NIH/3T3 rakuliini rakke kasvatati järgmisel kasvusöötmel: 98 % DMEM (ingl *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) (Gibco, Thermo Fisher Scientific), 10 % veise loote seerum (FBS) (Gibco, Thermo Fisher Scientific), 1 % 50-kordne penitsilliini/streptomütsiini lahus (lõppkontsentratsioonid: 100 U/ml penitsilliin, 0,1 mg/ml streptomütsiin) (Gibco, Thermo Fisher Scientific). Inimese primaarseid keratinotsüüte kasvatati järgmisel kasvusöötmel: 98 % EpiLife® (Gibco, Thermo Fisher Scientific), 1% HKGS (ingl *human keratinocyte growth supplement*) (Gibco, Thermo Fisher Scientific), 1 % 50-kordne penitsilliini/streptomütsiini lahus (lõppkontsentratsioonid: 100 U/ml penitsilliin, 0,1 mg/ml streptomütsiin) (Gibco, Thermo Fisher Scientific).

2.2.2. Keratinotsüütide kultiveerimine

Inimese primaarsed keratinotsüüdid eraldati juhendaja Mariliis Klaasi poolt. Selleks koguti Tartu Ülikooli Kliinikumis rinna reduktsiooniplastika operatsioonidelt eemaldatud naharibad (Tartu Ülikooli Eetikakomitee kooskõlastus nr 292/T-4) ning lõigati 0,5x2 cm tükkideks. Saadud naharibasid inkubeeriti üleöö 4 °C juures 2,4 U/ml dispaasi (Gibco, Thermo Fisher Scientific) lahuses. Seejärel eraldati pintsette kasutades naharibadelt epidermis. Keratinotsüütide eraldamiseks inkubeeriti epidermise tükke umbes 10 min 0,05 % trüpsiini

lahuses (Gibco, Thermo Fisher Scientific) ning pipeteeriti, et rakud suspensiooni eraldada. Eraldatud rakud filtreeriti läbi 70 µm diameetriga nailonvõrgustikust rakuõela (BD Biosciences).

Keratinotsüüte kasvatati NIH/3T3 rakuliinil, mis eelnevalt kiiritati (Rheinwald ja Green, 1975). Kiiritamise tulemusena lähevad NIH/3T3 rakuliini rakud kasvuaresti, kuid toetavad *in vitro* keratinotsüütide kasvamist ja proliferatsiooni. Nad sünteesivad kasvufaktoreid, tsütokiine ning ka keratinotsüütidele substraadiks olevaid rakuvälise maatriksi valke (Llames jt., 2015). NIH/3T3 rakuliini rakud pandi päev enne kiiritamist kasvama 75 cm² koekultuuri madratsile (Corning, Falcon). Vahetult enne töötlust läbi viimist lisati rakkudele söödet nii, et see kattis rakke 1 cm kihina. Kiiritamiseks kasutati Faxitron RX-650 röntgenseadet. Alustuseks toimus masina eelsoojendus 3x5 min vastavalt 30 V, 60 V ja 90 V juures. Sellele järgnes rakkude kiiritamine 30 min 110 V juures, mis vastab 70 Gy kiirgusdoosile.

2.2.3. Fibroblastide kultiveerimine

Kasutatud naharibad koguti tervetelt patsientidelt Tartu Ülikooli Kliinikumis plaaniliste rinnaplastika operatsioonide käigus üle jäävast koematerjalist (Tartu Ülikooli inimuuringute eetika komitee kooskõlastus nr 292/T-4). Nahast lõigati 2–3 mm tükid, mis asetati epidermis peal pool kuivale, 10 cm diameetriga koekultuuri tassile (Falcon, Corning Incorporated). Tükid kinnitusid 5–7 min ja seejärel lisati neile 8 ml fibroblastide kasvusöödet, mis sisaldas 0,25 µg amfoteristiini B (PAA Laboratories, Thermo Fisher Scientific). Rakke kasvatati 37 °C ja 5 % CO₂ juures nädal aega. Seejärel toimus rakkude ümberkõlv ja söötme vahetus.

Tabel 1. Töös kasutatud rakuliinid ja -kultuurid.

Rakuliin või -kultuur	Iseloomustus	Päritolu
Inimese dermaalsed fibroblastid	Primaarsed rakud	vt fibroblastide kultiveerimine.
Inimese keratinotsüüdid	Primaarsed rakud	vt keratinotsüütide kultiveerimine.
HaCaT rakuliin	Spontaanselt immortaliseerunud inimese keratinotsüüdid (Boukamp jt., 1988).	Saadud kingituseks professor Reet Kure laborist (Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituut).
HEK293 rakuliin	Inimese geneetiliselt muundatud embrüonaalsed neerurakud (Graham ja Smiley, 1977).	Soetatud American Type Culture Collection-ist.
NIH/3T3 rakuliin	Hiire embrüonaalsed fibroblastid (Jainchill jt., 1969).	Soetatud American Type Culture Collection-ist.

2.2.4. Plasmiidi bakteriaalne transformatsioon ja puhastamine

Töös kasutatud plasmiidid valmistas Kristina Mäemets-Allas. Selleks kloonitati vastavalt THBS4 või OLFM4 valku kodeeriv järjestus bakteriaalsesse ekspressioonivektorisse pcDNA 3.1 (Thermo Fisher Scientific, katalooginumber V79020). Plasmiidide paljundamiseks toimus nende transformatsioon DH5 α kompetentsetesse rakkudesse. Selleks sulatati rakke 20–30 min jään ning pärast seda lisati neile 100 ng paljundatavat plasmiidi. Rakke hoiti jään veel 15 min, seejärel inkubeeriti neid 2 minutit temperatuuril 42 °C ning pandi uuesti tagasi jään. Kuumutades tekivad külmas jäigaks muutunud rakumembraanidesse mikropoorid, läbi mille pääseb plasmiid rakkudesse. Tagasi jään asetades membraanide kahjustumine peatub. Järgnevalt lisati rakkudele 800 μ l LB söödet ning resistentsusgeeni avaldumiseks kasvatati neid tund aega 37 °C ja 600 rpm (ingl *rotations per minute*) juures segajal. Edasi tsentrifugeeriti rakke 1 min jooksul 3427 rcf (ingl *relative centrifugal force*) ning suurem osa söötimest eemaldati. Rakkudele jäeti sellest umbes 50 μ l, milles nad suspendeeriti ning külvati edasi ampitsilliini sisaldavale agarosöötmele. Rakke kasvatati 12–16 tundi temperatuuril 37 °C. Seejärel valiti plaadilt 1 koloonia, mis tõsteti ümber ampitsilliini sisaldavasse (100 μ g/ml) LB söötmesse (50 ml). Rakke kasvatati 12–16 tundi temperatuuril 37 °C juures segajal (180 rpm). Seejärel puhastati plasmiid NucleoBond Xtra Midi EF kit'i kasutades (Macherey-Nagel, katalooginumber 740420.50), järgides tootja poolt pakutud protokollit.

2.2.5. Rakkude transfektsioon

Transfektsiooni läbi viimiseks pandi 10 cm diameetriga koekultuuri tassile kasvama 2 000 000, 24-kannulisel plaadil kattedklaasidele 50 000 HEK293 rakuliini raku. 24 tunni pärast viidi läbi transfektsioon. Transfektsioonisegu maht moodustas kogu söötimest 1:10. Selle valmistamiseks lisati 1 ml seerumita DMEM söötmele (Gibco, Thermo Fisher Scientific) 10 μ g plasmiidi DNA lahust ja 16,6 μ l TurboFect'i (Thermo Fisher Scientific, katalooginumber R0532). Transfektsioonisegu inkubeeriti 15 min toatemperatuuril. Rakkudele lisati uus sööde: DMEM, 1:100 insuliini, transferiini ja seleeni lahus (ITS) (Gibco, Thermo Fisher Scientific), 1:100 50-kordne penitsilliini ja streptomütsiini lahus (Gibco, Thermo Fisher Scientific). Inkubatsiooni lõppedes lisati transfektsioonisegu rakkudele söötmesse. 24 tunni möödudes pandi rakkudele söötmesse veel täiendav kogus, 1:100 ITS-i. 48 tunni pärast toimus valguekspressiooni analüüsiks proovide kogumine ja immunofluorestsentsmikroskoopiaks rakkude fikseerimine.

2.2.6. Söötme ettevalmistus valguekspressiooni kontrolliks

Transfekteeritud rakkudelt koguti sööde ning sellele lisati ühekordses koguses proteaasi inhibiitorite segu (Thermo Fisher Scientific, katalooginumber 78430) ja naatriumasiidi, lõppkontsentratsiooniga 0,04 %. Proove säilitati järgmise etapini 4 °C juures. Sekreteeritud valkude hulk on söötmes madal ja seetõttu on selles sisalduvate valkude tuvastamiseks vajalik söötme kontsentreerimine. Selleks kasutati Spectra/Por dialüüsikotte (läbilaskevõimega 12–14 kDa) (Spectrum Medical Industries, katalooginumber 132706) polüetüleenglükoolil (M = 40 000 g/mol) ning söötme ruumalal lasti väheneda umbes 25 korda. Valkude sadestamiseks lisati kontsentreeritud söötmele viie kordne kogus eelnevalt -20 °C juures hoitud atsetooni ning tsentrifuugiti 21 420 rcf ja 4 °C juures 15 min. Supernatant eemaldati ja valgu sade lahustati 70 µl 4xLaemmli puhvril (0.250 M TrisHCl (pH 6.8), 8 % SDS, 40 % glütserool, 20 % 2-merkaptotetanool, 0.2 % broomfenoolsinine, 24 % vesi). Proove säilitati analüüsiks -20 °C juures.

2.2.7. Rakkude ettevalmistus valguekspressiooni kontrolliks

Rakke tsentrifuugiti 5 min toatemperatuuril 300 rcf ja võeti üles 1 ml fosfaatpuhverdatud soolalahuses (PBS). Järgmisena tsentrifuugiti rakke 10 min 2380 rcf, 4 °C juures. Edasi toimus rakkude lüüsimine, milleks rakud suspendeeriti 120 µl ühe kordses koguses proteaasi inhibiitoritega lüüsipuhvril (1 % NP-40, 150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 8,0) ja hoiti lüüsumiseks tund aeg jääl. Seejärel lüsaat tsentrifuugiti 4 °C juures 15 min 13 700 rcf ning valke sisaldav supernatant eraldati sademest. Proove säilitati analüüsiks -20 °C juures. Valgu kontsentratsiooni mõõtmiseks Bradfordin meetodil kasutati ThermoFisher Scientific *Pierce™ BCA Protein Assay Kit*'i (katalooginumber 23225), järgides tootja poolt pakutud protokollit.

2.2.8. Western Blot

Kõik etapid, kui ei ole märgitud teisiti, toimusid toatemperatuuril. Rakulüsaadi proovidele lisati enne edasist töötlust vähemalt 7,5 µl 4xLaemmli puhvrit nii, et proovide lõplik valgu kontsentratsioon oleks võrdne. Analüüsiks valmistatud proove kuumutati 95 °C juures 5 min ja tsentrifuugiti 5 min 21 420 rcf. Valgud lahutati SDS polüakrüülamiid-geelil elektroforeesi teel (10 % geelil) kaks tundi 100 V juures. Edasi toimus valkude ülekande geelilt polüvinülideenfluoriid (PVDF) 0,2 µm membraanile (Thermo Fisher Scientific,

katalooginumber 88520) ülekandepuhvril (50 mM Tris-HCl (pH 8,3), 40 mM glütsiin, 0,037 % SDS, 20 % metanool) tund aega 100 V juures.

Järgmisena toimus membraani blokeerimine antigeenide ebaspetsiifilise seondumise vältimiseks, tund aega loksutil. Blokeerimislahus sisaldas 3 % veiseseerum albumiini (BSA) ja 3 % lõssipulbri lahust, lahjendatuna PBS-is. Membraani inkubeeriti peale blokeerimist üleöö 4 °C juures primaarsete antikehadega, lahustatuna blokeerimislahuses. Kõik kasutatud antikehad on välja toodud tabelis 2. Peale seda pesti membraani 3x5 min PBS+Tween (0,1 %) lahusega ning inkubeeriti tund aega biotinüleeritud sekundaarsete antikehadega, lahustatuna blokeerimislahuses. Järgnes 2x10 min pesu PBS+Tween (0,1 %) lahusega ja membraane inkubeeriti tund aega 1:3000 blokeerimislahuses lahustatud Streptavidin-AP (aluselise fosfataasi) (Dako, katalooginumber D0396) lahusega. Membraanid pesti edasi PBS-iga ning valkude visualiseerimiseks lisati membraanile 5–15 minutiks aluselise fosfataasi (Thermo Fisher Scientific, katalooginumber 34042) lahust.

Tabel 2. Tabelis on välja toodud Western Blotis kasutatud antikehad. Sekundaarsed antikehad on biotinüleeritud.

Primaarsed antikehad			
Sihtmärk	Peremeesorganism	Kasutatud lahjendus	Tootja; katalooginumber
Inimese THBS4	Kits	1:1000	R&D Systems; AF2390
Inimese OLFM4	Küülik	1:1000	Novusbio; NBP2-24535
Sekundaarsed antikehad			
Sihtmärk	Peremeesorganism	Kasutatud lahjendus	Tootja; katalooginumber
Kitse IgG (biotiin)	Küülik	1:3000	Dako; E0466
Küüliku IgG (biotiin)	Eesel	1:3000	Dako; E0432

2.2.9. Immunofluorestsentsanalüüs

Immunofluorestsentsmikroskoopias kasutatud nahapreparaatidega külmlõigud saadi Tartu Ülikooli Kliinikumi Nahahaiguste kliinikust, professor Külli Kingo uurimisgrupi käest. Uurimistöösse kaasatud naastulise psoriaasi diagnoosiga patsientidelt koguti 3 mm diameetriga koebiopsia (Tartu Ülikooli Eetikakomitee kooskõlastus nr 245/M-18). Koeproovid sisestati külmutuslahusesse ja külmutati vedelal lämmastikul. Saadud koeproovidest lõigati 10 µm paksusega lõigud alusklaasidele, mida kasutati töö autori poolt immunofluorestsentsanalüüsis.

Kõik järgnevad etapid viidi läbi toatemperatuuril kui pole märgitud teisiti. Koelõikude ning rakkude värvimise etapid olid samad. Külmast võetud koelõike soojendati enne fikseerimist 10 min toatemperatuuril. Proovid fikseeriti 10 min 4 % paraformaldehüüdi lahusega ja pesti 3x3 min PBS-is. Rakke säilitati järgmise etapini 4 °C juures PBS-is. Seejärel permeabiliseeriti rakke/koelõike 15 min 0,2 % Triton X-100 PBS lahuses, millele järgnes 3x3 min pesu PBS-iga. Proove blokeeriti antikehade mittespetsiifilise seondumise vältimiseks tund aega niisutusega kambris blokeerimislahusega, milleks oli 5 % eesli seerum (Merck, katalooginumber S30-100ML) lahustatuna PBS-is. Seejärel lisati proovidele blokeerimislahuses lahjendatud primaarsed antikehad (välja toodud tabelis 3) ja inkubeeriti üleöö 4 °C juures, niisutusega kambris. Rakud/koelõigud pesti järgneval päeval 3x5 min PBS-iga ja neile lisati tunniks ajaks sekundaarsed antikehad (välja toodud tabelis 4), lahjendatuna blokeerimislahuses. Edasi inkubeeriti rakke/koelõike kahe minuti jooksul tuumade visualiseerimiseks 1:1000 PBS-is lahjendatud DAPI-ga (Thermo Fisher Scientific, katalooginumber D1306). Lõpetuseks pesti rakke 3x5 min PBS-iga ja sulundati kasutades Dako fluoretsentssulundusvedelikku (katalooginumber S3023).

Preparaate säilitati analüüsiks 4 °C juures. Proove vaadeldi Olympus IX81 CellR fluoretsentmikroskoobiga ja piltide tegemiseks kasutati Hamamatsu Orca ER (Hamamatsu Phototonics) kaamerat. Pilte töödeldi Hokawo (versioon 2.1) pilditöötlusprogrammiga.

Tabel 3. Tabelis on välja toodud rakkude ning koelõikude immunofluoretsentsanalüüsis kasutatud primaarsed antikehad.

Sihtmärk	Peremees-organism	Kasutatud lahjendus	Tootja; katalooginumber
Keratiin5	Küülik	1:500	Abcam; ab53121
Inimese THBS4	Kits	1:100	R&D Systems; AF2390
Integriin β4 (Alexa Flour 647)	Hiir	1:200	R&D Systems, US; FAB4060R-100UG
Vimentiin	Küülik	1:250	Abcam, GB; EPR3776
Inimese OLFM4	Küülik	1:100	Novusbio; NBP2-24535
Keratiin15	Hiir	1:100	Abcam, GB; ab80522
CD71	Küülik	1:100	Bioss Antibodies; bs-0988R
CD90	Hiir	1:50	BD Pharmingen; 550543
Ki67	Rott	1:200	eBioscience, US; 14-5698

Tabel 4. Tabelis on välja toodud rakkude ning koelõikude immunofluorestsentsanalüüsis kasutatud sekundaarsed antikehad.

Sihtmärk	Peremees-organism	Kasutatud lahjendus	Tootja; katalooginumber
Kitse IgG (Alexa Flour 488)	Eesel	1:1000	Invitrogen (Thermo Fisher); A-11055
Hiire IgG (Alexa Flour 647)	Eesel	1:1000	Invitrogen (Thermo Fisher); A-31571
Küüliku IgG (Alexa Flour 568)	Eesel	1:1000	Invitrogen (Thermo Fisher); SA5-10042
Küüliku IgG (Alexa Flour 488)	Eesel	1:1000	Life technologies (Thermo Fisher); A-21206
Hiire IgG (Alexa Flour 488)	Eesel	1:1000	Invitrogen (Thermo Fisher); A-21202
Roti IgG (Alexa Flour 594)	Eesel	1:1000	Invitrogen (Thermo Fisher); A-21209

2.2.10. Rakkude proliferatsiooniprotsendi määramine

24 tundi enne fikseerimist mõjutati rakke 25 % uuritavat valku sisaldava konditsioneeritud söötmega. Kontrolliks töödeldi rakke 25 % tühja vektoriga tranfekteeeritud rakkudel kogutud konditsioneeritud söötmega. Prolifereeruvate rakkude leidmiseks visualiseeriti proliferatiivsusmarker Ki67-antigeen anti-Ki67-antikehaga. Edasi arvutati rakkude proliferatsiooniprotsent Ki67 positiivsete rakkude osana kõigi rakkude hulgast, mis määrati DAPI-ga värvunud tuumade arvust. Ki67-positiivsete fibroblastide suhtarvu määramine toimus 18 korduses, kus kokku loeti umbes 2500 ühe valguga/kontrollsöötmega mõjutatud raku. Keratinotsüütide proliferatsiooniprotsent määrati kolmes korduses, kus kokku loeti umbes 1800 ühe valguga/kontrollsöötmega töödeldud raku. Rakkude lugemiseks kasutati ImageJ (versioon 1.52) pilditöötlusprogrammi.

2.2.11. Rakkude elumuse määramine

Rakkude elumust määrati *CellTiter-Glo* reagenti (Promega, katalooginumber G7570) abil. Reagent lüüsib rakud ja annab ATP-ga reageerides rakkude arvuga proportsionaalse luminesentsi signaali (RLU, ingl *relative light unit*). 24-kannulisele plaadile pandi kasvama 7000 HaCaT rakuliini raku ning 15 000 fibroblasti kannu kohta, 25 % uuritavat valku sisaldavas konditsioneeritud söötmes. Kontrollsöötmena kasutati 25 % tühja vektoriga tranfekteeeritud rakkudel kogutud konditsioneeritud söödet. Rakkude suhteline hulk määrati 24 tunniste intervallidena, fibroblastide puhul 72 ning HaCaT rakuliini rakkude puhul 96 tunni jooksul. Selleks eemaldati rakkudel sööde ja neid inkubeeriti 10 min 200 µl *CellTiter-Glo*

reagendiga. Saadud lüsaadist võeti analüüsiks 100 µl ja luminesentsi mõõdeti Tecan Infinite® 200 PRO abil. Katse viidi läbi mõlema rakutüübiga kolmes korduses.

2.2.12. *In vitro* kraape-meetodil haava paranemise katse

Katse viidi läbi kui rakud olid 24-kannulisel plaadil konfluentsed. 24 tundi enne eksperimendi alustamist mõjutati rakke 25 % uuritavat valku sisaldava konditsioneeritud söötmega. Kontrolliks töödeldi rakke tühja vektoriga transfekteeritud rakkudelt kogutud 25 % konditsioneeritud söötmega. Umbes 300–400 µm laiuse rakuvaba ala, nn „haava“ tekitamiseks kasutati steriilset, 1 ml pipeti otsikut. Koheselt peale haava tekitamist pildistati kannusid Nikon Eclipse TS100 mikroskoobiga (0h). Edasi jäädvustati rakuvaba ala laius fibroblastidel kolme tunniste intervallidega, 12 tunni jooksul ning HaCaT rakkudel kuue tunniste intervallidega, 30 tunni jooksul. Haava laiuse mõõtmiseks kasutati ImageJ (versioon 1.52) pilditöötlusprogrammi. Tulemusi väljendati haava avatuse protsendina, kus haava algseks laiuseks loeti 100 %. Haava paranemise kiirus leiti kontrolli ning valguga töödeldud protsentuaalse rakuvaba ala vahena katse lõpuks. Katse viidi läbi fibroblastide puhul neljas ja HaCaT rakuliini rakkudega kolmes korduses.

2.2.13. Rakkude migratsiooni ja invasiivsuse hindamine

Rakkude migratsioonivõimet ning invasiivsust hinnati 8 µm poori suurusega *Boyden*’i kambriga (Corning, katalooginumber 3422). Rakke mõjutati 24 tundi enne katset 25 % THBS4 sisaldava konditsioneeritud söötmega, või 1 µg/ml puhastatud inimese rekombinantse OLFM4-ga (R&D Systems, katalooginumber 10261-OL-050). Kontrolliks lisati vastavalt tühja vektoriga transfekteeritud rakkudelt kogutud 25 % konditsioneeritud söödet või 10 µl PBS-i. Kambrisse lisati 15 000 rakku 200 µl seerumita kasvusöötmes, mis sisaldas 50 % THBS4 sisaldavat konditsioneeritud söödet või kuhu lisati 1 µg/ml puhastatud OLFM4. Kontrollrakkudele lisati 50 % tühja vektoriga transfekteeritud rakkudelt kogutud konditsioneeritud söödet või 10 µl PBS-i. Kambrile alla lisati 400 µl seerumiga söödet ning 24 tunni pärast toimus rakkude fikseerimine metanooliga, 3 min jooksul. Rakkude visualiseerimiseks värviti need 0,5 % *Comassie Brilliant Blue* lahusega (0,5 % *Comassie Blue* G250 (Fluka), 50 % metanool, 10 % äädikhape, 40 % MQ vesi) 20 min toatemperatuuril ja pesti MQ veega. Membraanist mitte läbi liikunud rakud eemaldati kambrist ettevaatlikult niisutatud vatitikuga.

Kambrite katmiseks Matrigeliga segati kokku 1/4 Matrigeli (Corning, katalooginumber 354248) ja 3/4 DMEM söödet, ning saadud lahust kanti membraanile 50 µl. Matrigeli enneaegse tahenemise vältimiseks töötati eelnevalt 4 °C juures hoitud töövahenditega ning Matrigeli tahenemiseks inkubeeriti plaati tund aega toatemperatuuril. Edasi viidi läbi rakkude invasiivsuse hindamine eelnevalt kirjeldatud meetodil. Rakke vaadeldi ning jäädvustati Nikon Eclipse TS100 mikroskoobi abil ja rakkude lugemiseks kasutati ImageJ (versioon 1.52) pilditöötlusprogrammi. Rakkude migratsioonivõimet ja invasiivsust hinnati kolmes korduses.

2.2.14. Andmete statistiline analüüs

Käesolevas bakalaureusetöös on kõik katsed läbi viidud vähemalt kolmes korduses. Tulemusi iseloomustavatel tulpdiaagrammidel on kujutatud korduste keskvaärtust ning keskvaärtusi iseloomustavad 95 % usalduspiirid. Statistilise olulisuse määramiseks kasutati MS Exceli (versioon 16.47.1) kahepoolset sõltumatut Studenti t-testi. Statistilise olulisuse nivooks loeti $\alpha = 0,05$.

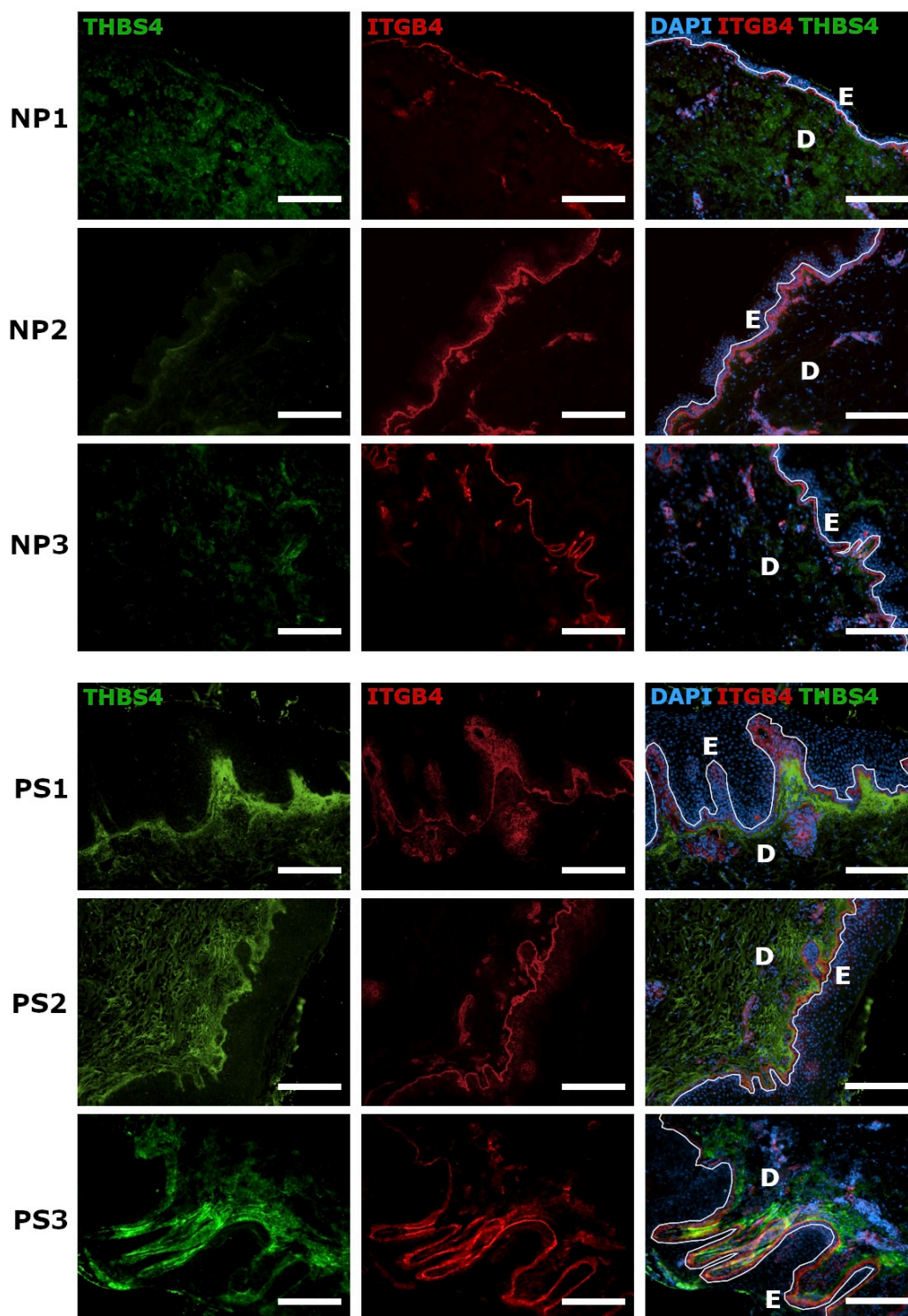
2.3. Tulemused

2.3.1. THBS4 ja OLFM4 ekspressioon psoriaasi patsientide koelõikudes

THBS4 ning OLFM4 ekspressiooni inimese nahas on siiani vähe uuritud. THBS4 nõrk ekspressioon on leitud naha fibroblastides (Proteinatlas a), kuid OLFM4 ekspressiooni inimese nahas siiani näidatud ei ole (Proteinatlas b). Käesoleva töö esimeseks eesmärgiks oli uurida, milline on THBS4 ja OLFM4 ekspressioon inimese nahas. Lisaks taheti teada, kas uuritavate valkude ekspressioonitase on psoriaasi patsientidel muutunud. Varasemalt on kirjeldatud nii THBS4 kui OLFM4 ekspressiooni suurenemist kudede kahjustuste korral, kuid psoriaasi patsientidel antud valkude ekspressiooni varem uuritud ei ole. Selleks visualiseeriti koelõikudes THBS4 ning OLFM4 vastavate antikehadega. Analüüsiks kasutati kolme psoriaasi patsiendi ja kolme terve nahaga patsiendi proove. Lisaks visualiseeriti koelõikudes integriin $\beta 4$ (ITGB4), mis on oluline subühik hemidesmosoomides (Russell jt., 2003) ning tähistab koelõikudes basaalmembraani asukohta. Edasi võrreldi THBS4 ning OLFM4 ekspressiooni psoriaasi patsientide ning tervete patsientide koelõikudes.

Analüüs näitas, et THBS4 on lokaliseerunud dermisesse, epidermises ekspressioon puudub (joonis 5). Tervete patsientide koelõikudes oli THBS4 ekspressioon madal (joonis 5 NP1–3),

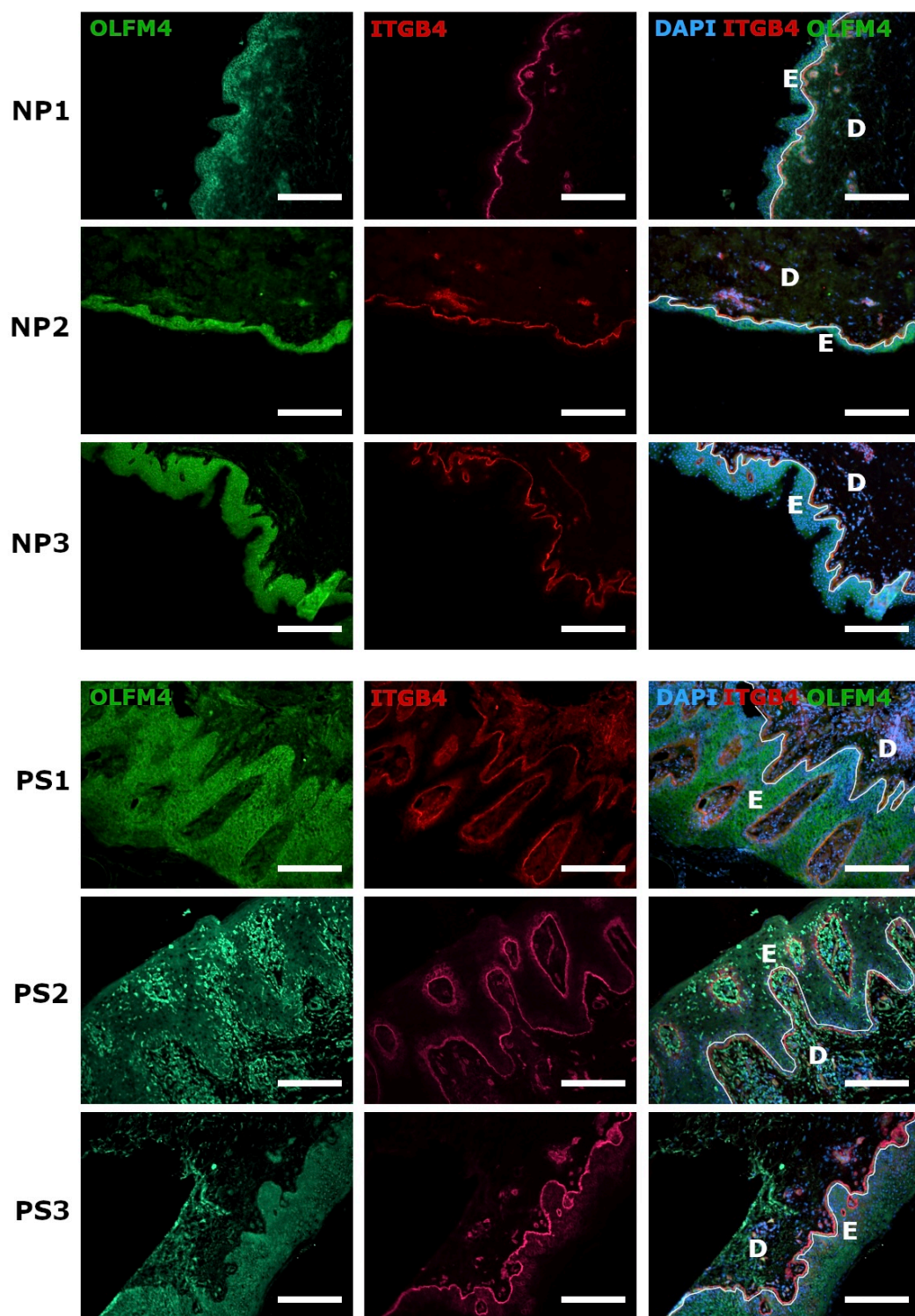
kuid psoriaasi patsientidel oli THBS4 ekspressioon märkimisväärselt suurenenud (joonis 5 PS1–3).



Joonis 5. THBS4 ekspressiooni võrdlus tervete patsientide (N1–3) ning psoriaasi patsientide (PS1–3) koelõikudes. Joonistel on tähistatud epidermis (E), dermis (D) ning basaalmembraan (ITGB4). THBS4 ekspressioon on lokaliseerunud dermisesse ja psoriaasi patsientidel on THBS4 ekspressioon märkimisväärselt kõrgem. Rakutuumad on tähistatud DAPI-ga. Mõõtkava vastab 200 µm-le.

OLFM4 ekspressioon tuvastati peamiselt epidermises ning seal ekspressioonis muutusi psoriaasi korral ei leitud (joonis 6). Tervete patsientide koelõikudes oli OLFM4 ekspressioon

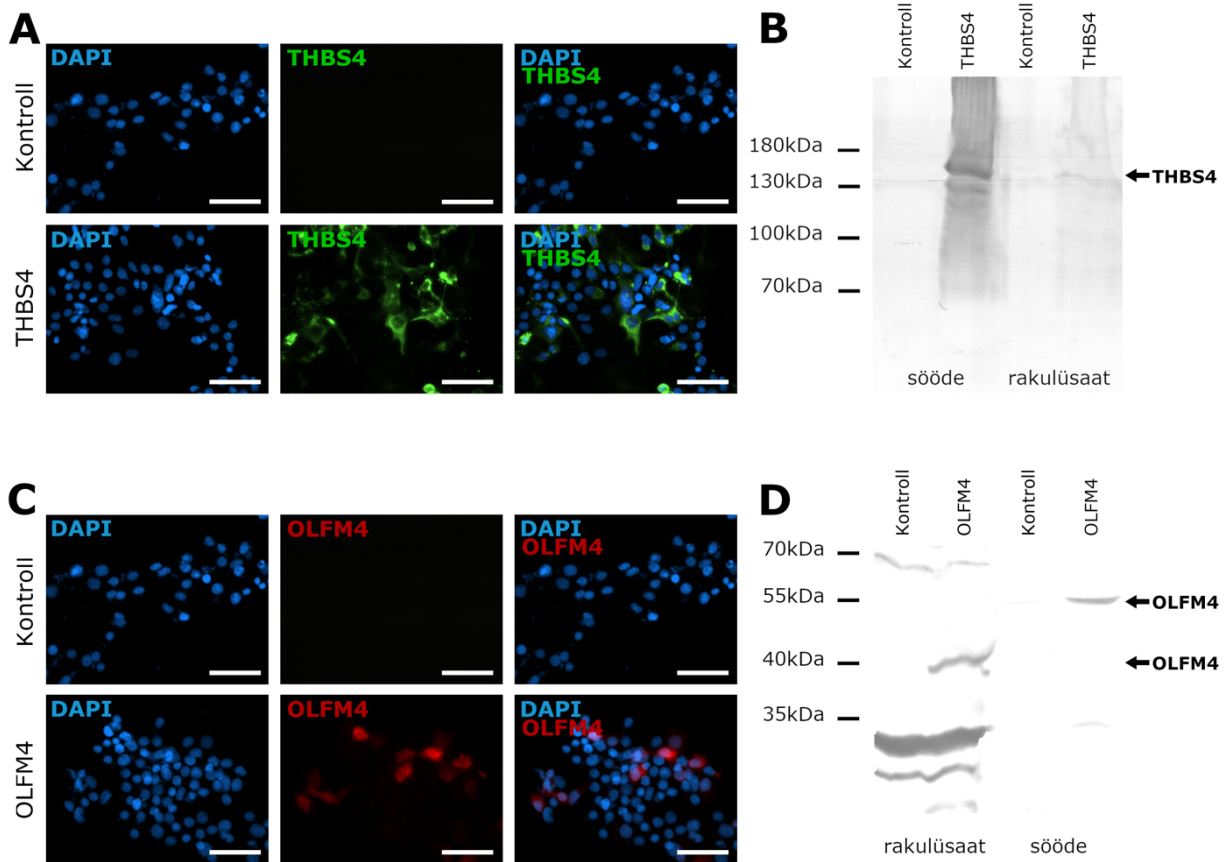
dermises madal (joonis 6 NP1–3), kuid psoriaasi korral oli valgu hulk dermises oluliselt suurenenud (joonis 6 PS1–3).



Joonis 6. OLFM4 ekspressiooni võrdlus tervete patsientide (N1–3) ning psoriaasi patsientide (PS1–3) koelõikudes. Joonistel on tähistatud epidermis (E), dermis (D) ning basaalmembraan (ITGB4). OLFM4 on peamiselt lokaliseerunud epidermisesse. Tervetel patsientidel on antud valgu ekspressioon dermises nõrk, kuid psoriaasi korral on OLFM4 ekspressioon dermises oluliselt suurenenud. Rakutuomad on tähistatud DAPI-ga. Mõõtkava vastab 200 μm -le.

2.3.2. Tranfektsiooni edukuse kontroll

THBS4 ning OLFM4 on rakuvälise maatriksi valgud ning nende mõju uurimiseks mõjutati uuritavaid rakke vastavalt kas rekombinantset THBS4 või OLFM4 sisaldava konditsioneeritud söötmega. Konditsioneeritud söötmete valmistamiseks toimus THBS4 või OLFM4 valku kodeerivat järjestust sisaldavate plasmiidide transfektsioon HEK293 rakuliini rakkudesse. Transfektsiooni edukust kontrolliti Western Bloti meetodil ning lisaks viidi läbi immunofluorestsentsanalüüs vastavalt kas THBS4 või OLFM4 antikehaga. THBS4 geeni transfektsiooni edukus oli umbes 51,4 % ning tühja ekspresioonivektoriga transfekteeeritud rakkudes (kontroll) THBS4 ekspresiooni ei esinenud (joonis 7A). THBS4 suuruseks oli ~150kDa ning Western Bloti meetodi abil näidati, et rakud sekreteerisid THBS4 suurel hulgal söötmesse, rakulüsaadis oli sellega võrreldes valku väga vähe (joonis 7B). OLFM4 geeni puhul oli transfektsiooni edukus madalam, 29 %. OLFM4 ekspresiooni tühja ekspresioonivektoriga transfekteeeritud rakkudes ei esinenud (joonis 7C). OLFM4 suuruseks söötmes oli ~55kDa, rakkudes ~40kDa ja Western Bloti abil leiti, et OLFM4 hulk oli söötmes ja rakulüsaadis umbkaudu sama (joonis 7D).



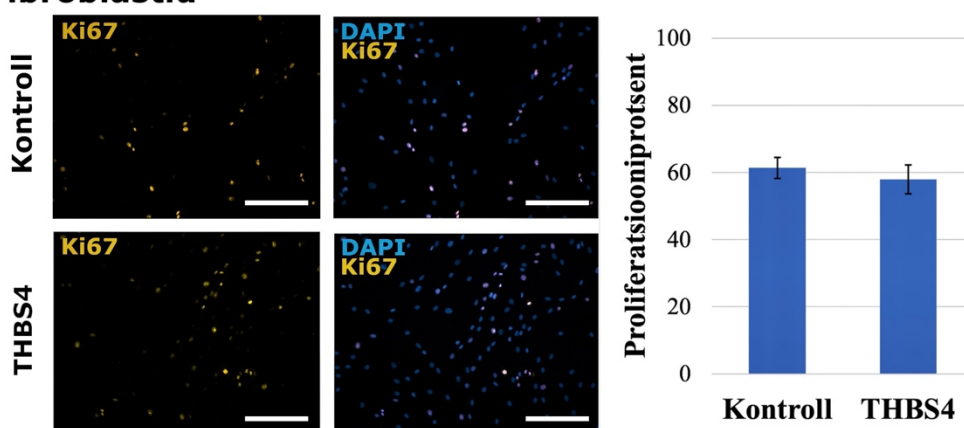
Joonis 7. HEK293 rakuliini transfektsiooni edukuse kontroll. THBS4 (A, B) ja OLFM4 (C, D) ekspresioon tühja ekspresioonivektoriga (kontroll) ning vastavalt THBS4/ OLFM4 geeni sisaldava ekspresioonivektoriga transfekteeeritud HEK293 rakuliini rakkudes. Rakutuomad on tähistatud DAPI-ga. Mõõtkava vastab 50µm-le.

2.3.3. THBS4 mõju naharakkude proliferatsioonile

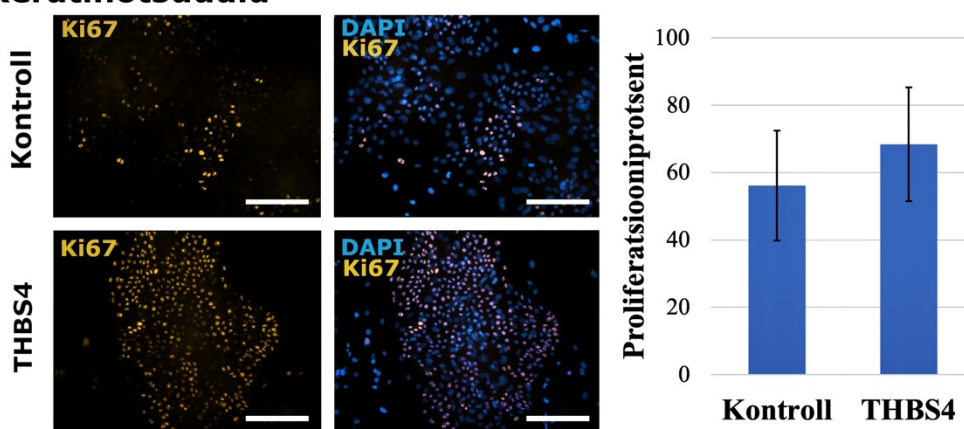
Käesolevas töös uuriti, kas THBS4 ja OLFM4 lisamine rakkude kasvukeskkonda mõjutab inimese naha primaarsete fibroblastide ja keratinotsüütide proliferatsiooni. Mõju rakkude proliferatsioonile iseloomustati esiteks Ki67-positiivsete rakkude protsendi muutuse kaudu, mida visualiseeriti immunofluorestsentsmikroskoopia abil. Rakke mõjutati 24 tundi enne fikseerimist uuritavat valku sisaldava konditsioneeritud söötmega või kontrollsöötmelega. Prolifereeruvad rakud tuvastati proliferatiivsusmarkeri, Ki-67 antigeeni (Gerdes jt., 1984) kaudu. Proliferatsiooniprotsent määrati Ki67 positiivsete rakkude hulganähtuna kõigist rakkudest, mis leiti DAPI-ga värvunud tuumade arvust.

Kõigepealt uuriti THBS4 mõju inimese naha primaarsete fibroblastide ja keratinotsüütide proliferatsioonile. Leiti, et valgu juuresolekul proliferereerivate fibroblastide suhtarv ei suurenenud (joonis 8). THBS4 mõjus keratinotsüütide proliferatsioonile soodustavalt, kuid valgu mõju rakkude proliferereerumisele ei olnud statistiliselt oluline (joonis 8).

Fibroblastid



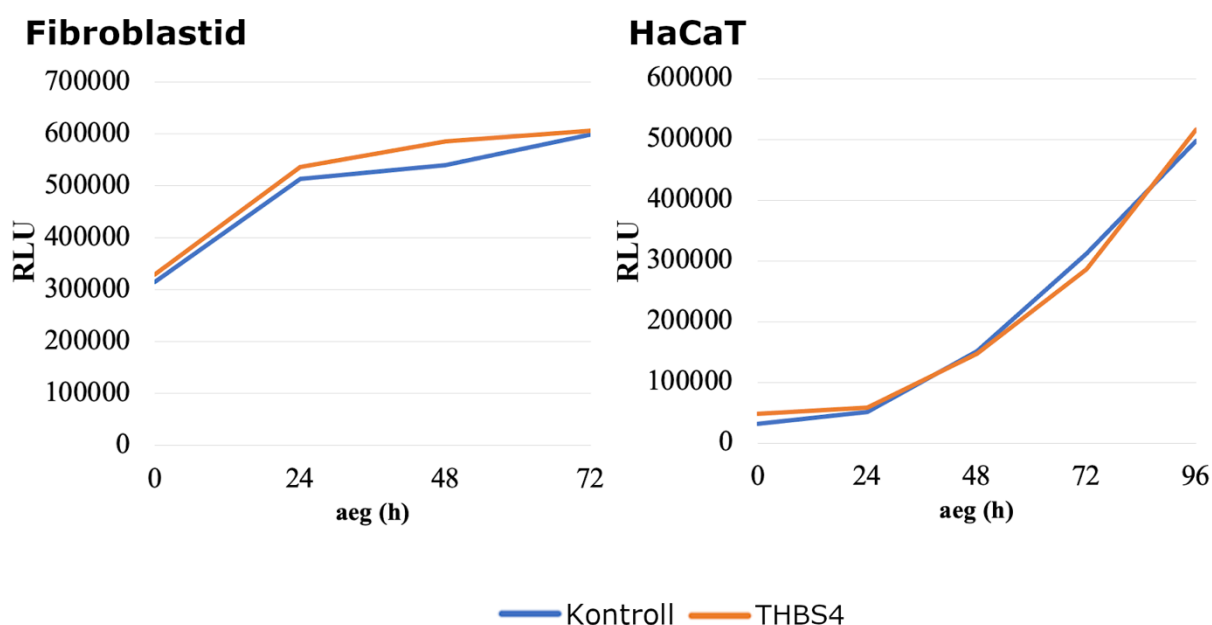
Keratinotsüüdid



Joonis 8. THBS4 mõju inimese naha primaarsete fibroblastide ning keratinotsüütide proliferatsioonile. Rakke mõjutati 24 tundi enne fikseerimist THBS4 sisaldava söötmega või kontrollsöötmelega. Prolifereeruvad rakud tuvastati Ki-67 proliferatiivsusmarkeri abil ning proliferatsiooni aktiivsus määrati Ki67 positiivsete rakkude hulganähtuna kõigist rakkudest, mis leiti DAPI-ga värvunud tuumade arvust. Mõõtkava vastab 200 µm-le.

Edasi uuriti valkude mõju fibroblastide ning HaCaT rakuliini rakkude proliferatsioonile *CellTiter-Glo* reagenti abil. THBS4 mõju uurimiseks keratinotsüütidele kasutati HaCaT rakuliini rakke, sest ilmnedid probleemid primaarsete keratinotsüütide kasvatamisel. HaCaT rakud on spontaanselt immortaliseerunud inimese keratinotsüütide rakuliini rakud. Erinevate katsetega on tõestatud, et HaCaT rakuliin on kindlas keskkonnas usaldusväärne mudel nahahaiguste uurimiseks (Colombo jt., 2017). Rakke mõjutati 24 tundi enne analüüsi uuritavat valku sisaldava konditsioneeritud söötmega või kontrollsöötmelega ning rakkude elumuse määramiseks inkubeeriti neid 10 minutit *CellTiter-Glo* reagentiga. Reagent lüüsis rakud ning andis ATP-ga reageerides rakkude arvuga proportsionaalse luminesentsi signaali (RLU, ingl *relative light unit*). Mõõtmised teostati iga 24 tunni tagant, fibroblastide puhul 72 ning HaCaT rakuliini rakkude puhul 96 tunni jooksul.

Analüüs kinnitas eelnevalt saadud tulemusi THBS4 mõju kohta fibroblastide proliferatsioonile. 72 tunni möödudes ei erinenud THBS4-ga mõjutatud rakkude arv kontrollist. Väike erinevus fibroblastide hulgas oli näha 48. tunnil, kuid see ei olnud statistiliselt oluline (joonis 9). Lisaks ei leitud ka HaCaT rakuliini keratinotsüütide proliferatsioonis 96 tunni jooksul THBS4 mõjul statistiliselt olulisi erinevusi (joonis 9).

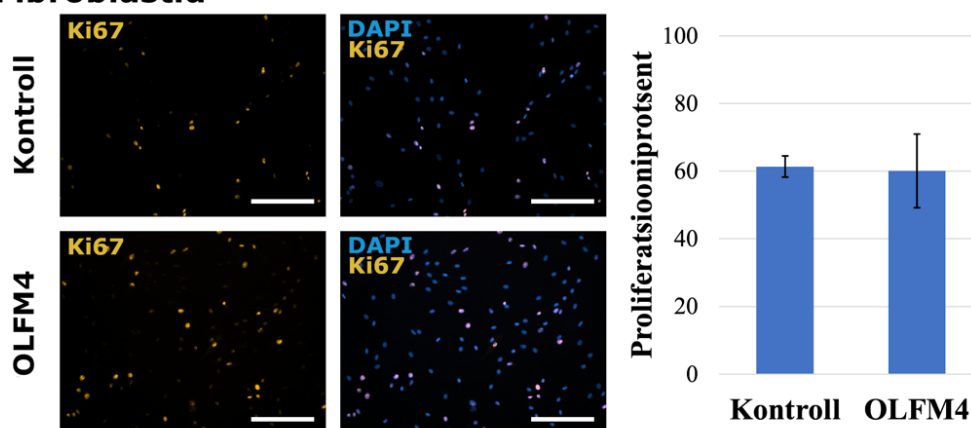


Joonis 9. THBS4 mõju inimese naha primaarsete fibroblastide ja HaCaT rakuliini rakkude elumusele. THBS4 sisaldava või kontrollsöötmelega mõjutatud rakkude arv määrati *CellTiter-Glo* reagenti abil, mis andis ATP-ga reageerides rakkude arvuga proportsionaalse luminesentsi signaali (RLU, ingl *relative light unit*).

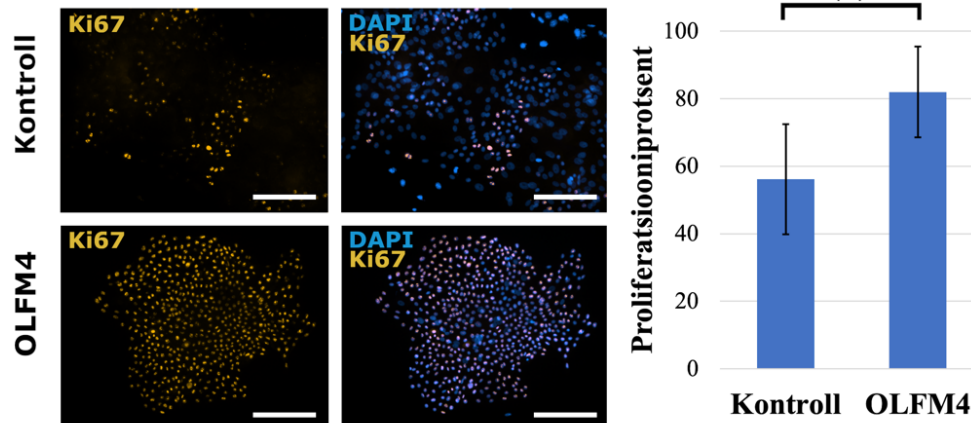
2.3.4. OLFM4 mõju naharakkude proliferatsioonile

Edasi uuriti OLFM4 mõju naharakkude proliferatsioonile. Kõigepealt uuriti eespool kirjeldatud meetodil immunofluorestsentsmikroskoopia abil antud valgus mõju naharakkude proliferatsiooniprotsendile. Analüüsi tulemisena leiti, et Ki-67 positiivsete fibroblastide arv OLFM4 juuresolekul võrreldes kontrolliga ei erinenud (joonis 10). OLFM4 mõjul suurenes aga inimese naha primaarsete keratinotsüütide proliferatiivsus 25,8 % võrra ning leitud erinevus oli statistiliselt väga oluline ($P = 0,009$) (joonis 10).

Fibroblastid

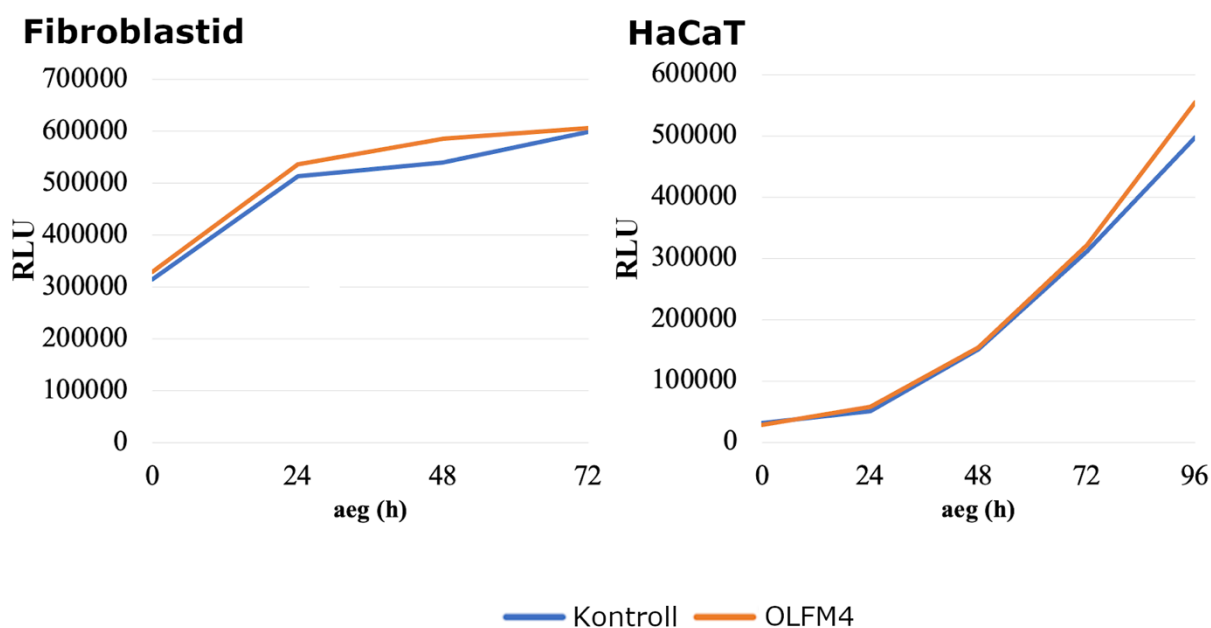


Keratinotsüüdid



Joonis 10. OLFM4 mõju inimese naha primaarsete fibroblastide ning keratinotsüütide proliferatsiooniprotsendile. Rakke mõjutati 24 tundi enne fikseerimist OLFM4 sisaldava söötmega või kontrollisöötmega. Prolifereeruvad rakud tuvastati Ki-67 proliferatiivsusmarkeri abil ning proliferatsiooni aktiivsus määrati Ki67 positiivsete rakkude hulgana kõigist rakkudest, mis leiti DAPI-ga värvunud tuumade arvust (** $p < 0,01$). Mõõtkava vastab 200 μm -le.

Edasi uuriti OLFM4 mõju fibroblastide ning HaCaT rakuliini keratinotsüütide proliferatsioonile *CellTiter-Glo* reagenti abil. Analüüs kinnitas eelnevalt saadud tulemusi, et OLFM4 ei mõjuta fibroblastide proliferatsiooni. Taaskord on näha 48. tunnil väike erinevus fibroblastide hulgas võrreldes kontrolliga, kuid tegu ei ole statistiliselt olulise vahega (joonis 11). Lisaks uuriti OLFM4 mõju HaCaT rakuliini rakkudele, kus statistiliselt oluline erinevus rakkude arvus 96 tunni jooksul võrreldes kontrolliga puudus (joonis 11).



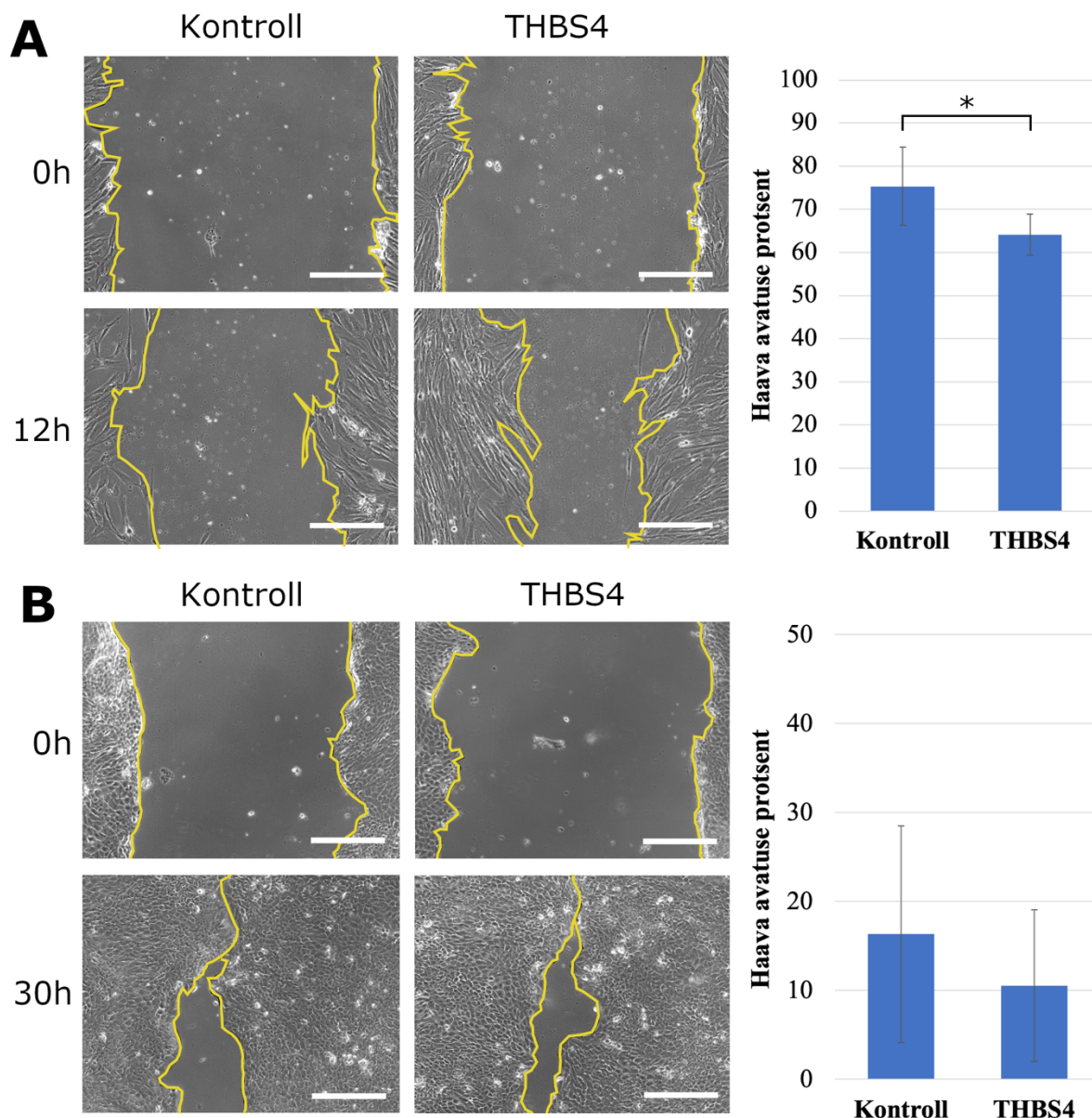
Joonis 11. OLFM4 mõju inimese naha primaarsete fibroblastide ja HaCaT rakuliini rakkude elumusele. THBS4 sisaldava või kontrollsöötmega mõjutatud rakkude arv määrati *CellTiter-Glo* reagenti abil, mis andis ATP-ga reageerides rakkude arvuga proportsionaalse luminesentsi signaali (RLU, ingl *relative light unit*).

2.3.5. THBS4 mõju naharakkude migratsioonivõimele

Järgmisena uuriti, kas THBS4 ja OLFM4 mõjutavad naharakkude migratsioonivõimet ja invasiivsust. Analüüsiti valkude mõju inimese naha primaarsetele fibroblastidele ning HaCaT rakuliini rakkudele.

Esiteks uuriti THBS4 ja OLFM4 mõju *in vitro* kraape-meetodil haava paranemise katsega. Rakke mõjutati enne katset 24 tundi uuritavat valku sisaldava söötmega või kontrollsöötmega ning katse alguses rakkudel söödet ei vahetatud. Steriilse pipetiotsikuga tõmmati konfluentsetesse rakkudesse rakuvaba ala, nn „haav“, mille paranemine jäädvustati fibroblastide puhul kolme tunniste, HaCaT rakuliini rakkude puhul kuue tunniste intervallidega. Tulemusi väljendati haava avatuse protsendina, kus haava algne laius oli 100 %. Haava paranemise kiirus leiti kontrolli ning valguga töödeldud protsentuaalse rakuvaba ala vahena katse lõpuks.

Eksperimendi tulemusena leiti THBS4 positiivne mõju fibroblastide migreerumisvõimele. THBS4 suurendas fibroblastidega kaetud pinnal avause kokku kasvamise kiirust 11,2 % võrra ning leitud mõju rakkude migreerumisvõimele oli statistiliselt oluline ($P = 0,019$) (joonis 12A). Statistiliselt olulist erinevust HaCaT rakuliini rakkude haava paranemise kiiruses THBS4 mõjul ei täheldatud (joonis 12B).

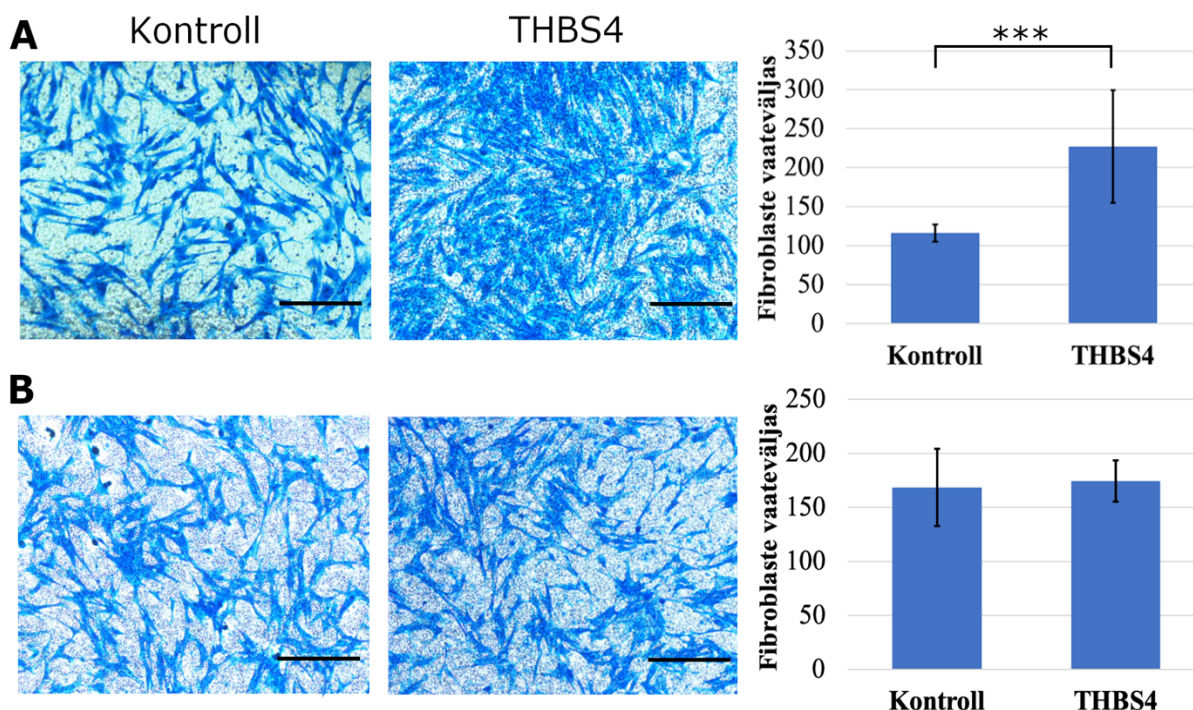


Joonis 12. THBS4 mõju fibroblastidesse (A) ning HaCaT rakuliini rakkudesse (B) tõmmatud haava paranemisele. THBS4-ga või kontrollisöötmega mõjutatud rakkude migreerumist jäädvustati fibroblastide (A) puhul 12 tunni ning HaCaT rakuliini rakkude (B) puhul 30 tunni jooksul. Tulpdiagrammil on kujutatud haava avatuse protsent katse lõpus (* $p < 0,05$). Mõõtkava vastab 200 μm -le.

Edasi uuriti valkude mõju fibroblastide migreerumisvõimele 8 μm poori suurusega *Boyden*'i kambriga. Lisaks migreerumisvõimele läbi kambri membraani analüüsiti ka rakkude invasiivsust ning selleks kaeti kambri membraan kommertsiaalse rakuvälise maatriksi valguseguga Matrigel. Matrigel võimaldab hinnata rakkude invasiivsust *in vitro*, jälgendades kambris basaalmembraani. Matrigeliga kaetud kambrites liiguvad läbi membraani vaid invasiivsed rakud, mis sekreteerivad Matrigeli degradeeruvaid proteaase.

Rakkude migreerumisvõime ning invasiivsuse hindamiseks lisati rakud kambrisse THBS4 sisaldavas söötmes või kontrollisöötmega. Tulemuseks saadi, et THBS4 soodustab oluliselt

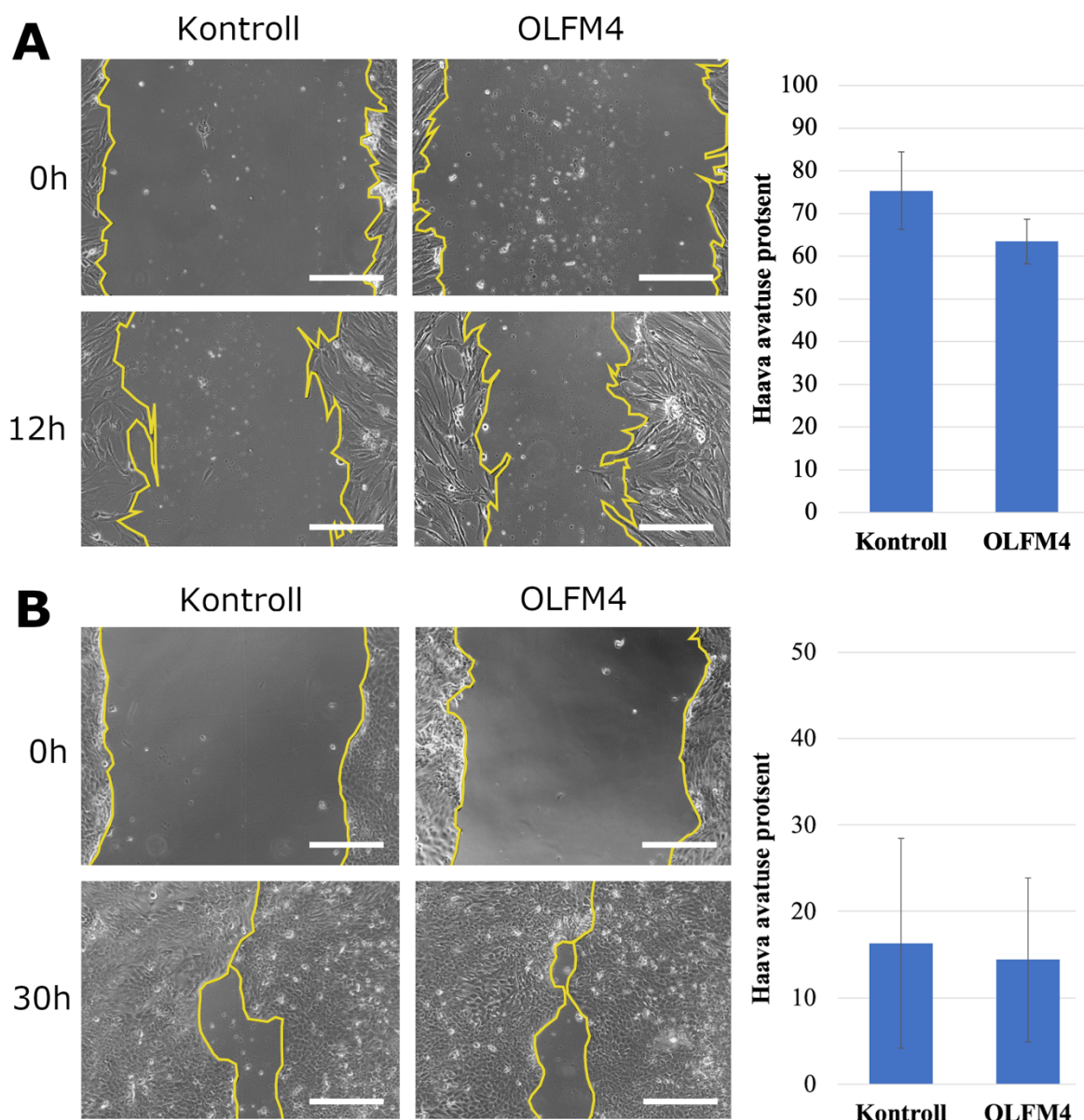
fibroblastide migratsiooni. THBS4 suurendas rakkude migratsioonivõimet 1,9 korda ning leitud erinevus oli statistiliselt väga oluline ($P = 1,3E -09$) (joonis 13A). Käesolevas töös ei täheldatud THBS4 mõju fibroblastide invasiivsusele (joonis 13B).



Joonis 13. THBS4 mõju inimese naha primaarsete fibroblastide migratsioonile (A) ja invasioonile (B). Katsed viidi läbi Matrigeliga katmata (A) ning kaetud (B) 8 µm poori suurusega *Boyden*'i kambritega. Rakke mõjutati THBS4-ga või kontrollsöötmega ning läbi membraani migreerunud rakud värviti, jäädvustati ning loeti kokku vähemalt kuues vaateväljas. Mõõtkava vastab 200 µm-le (***) $p < 0,001$).

2.3.6. OLFM4 mõju naharakkude migratsioonivõimele

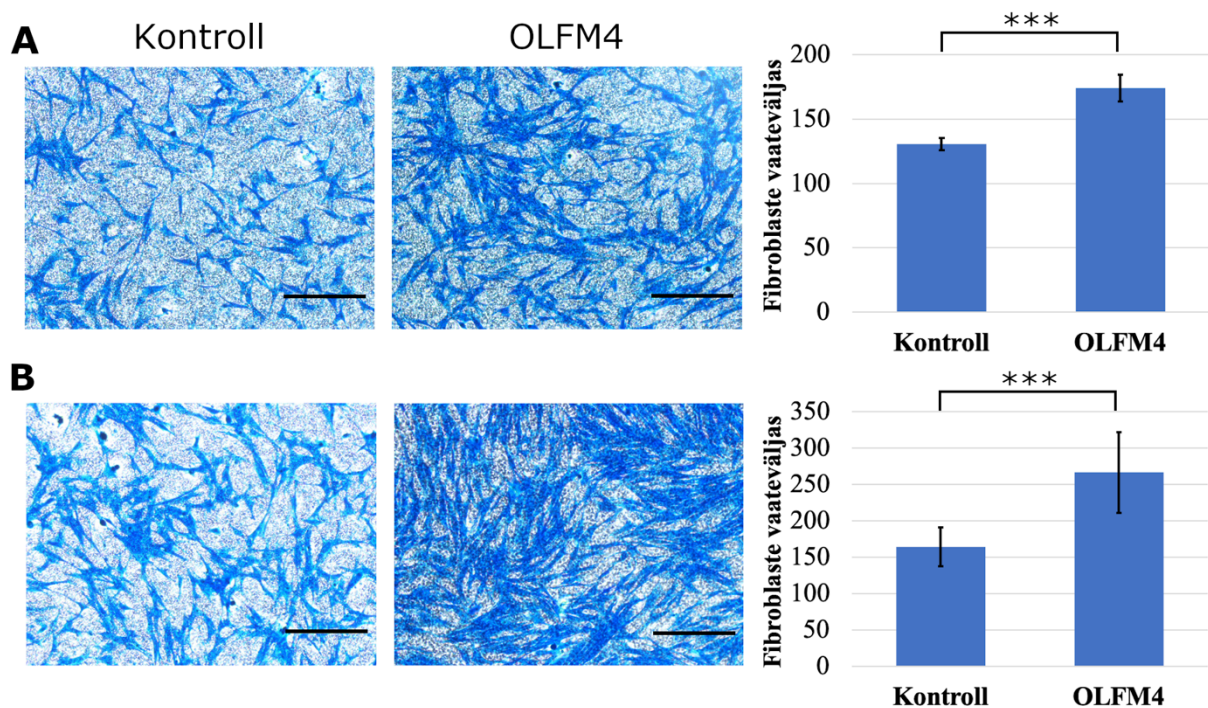
Järgmisena uuriti eespool kirjeldatud *in vitro* kraape-meetodil haava paranemise katsega ka OLFM4 mõju rakkude migratsioonivõimele. Tulemuseks saadi, et valk soodustas fibroblastidesse tõmmatud haava kinni kasvamist 11,8 % võrra ning leitud erinevus oli statistiliselt oluline ($P = 0,01$) (joonis 14A). HaCaT rakuliini rakkudesse tõmmatud haava paranemist OLFM4 sisaldav konditsioneeritud sööde ei mõjutanud (joonis 14B).



Joonis 14. OLFM4 mõju fibroblastidesse (A) ning HaCaT rakuliini rakkudesse (B) tõmmatud haava paranemisele. OLFM4-ga või kontrollisöötmega mõjutatud rakkude migreerumist jäädvustati fibroblastide (A) puhul 12 tunni ning HaCaT rakuliini rakkude (B) puhul 30 tunni jooksul. Tulpdiagrammil on kujutatud haava avatuse protsent katse lõpus (* $p < 0,05$). Mõõtkava vastab 200 μm -le.

Lisaks hinnati OLFM4 mõju fibroblastide migreerumisvõimele ja invasiivsusele *Boyden*'i kambri abil. Fibroblastidele lisati katse läbi viimiseks kasvukeskkonda kas puhastatud inimese rekombinantset OLFM4 või kontrolliks PBS-i. Rakud fikseeriti ja loendati vähemalt kuues vaateväljas 24 tunni pärast.

Tulemuseks saadi, et OLFM4 suurendas oluliselt nii fibroblastide migratsioonivõimet kui ka invasiivsust. OLFM4 mõjul kasvas fibroblastide migratsioonivõime 1,3 korda ning leitud erinevus oli statistiliselt väga oluline ($P = 2,2E -06$) (joonis 15A). Lisaks suurendas OLFM4 1,6 korda fibroblastide invasiivsust ning taaskord oli leitud kasv statistiliselt väga oluline ($P = 2,2E -09$) (joonis 15B).

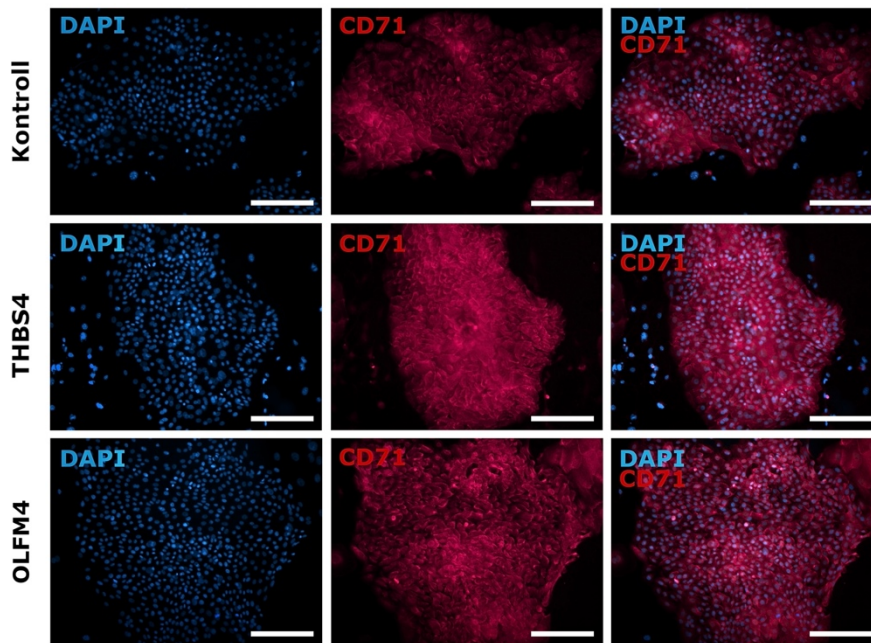


Joonis 15. OLFM4 mõju fibroblastide migratsioonile (A) ja invasioonile (B). Katsed viidi läbi Matrigeliga katmata (A) ning kaetud (B) 8 μm poori suurusega *Boyden*'i kambritega. Rakke mõjutati OLFM4-ga või PBS-iga (kontroll) ning läbi membraani migreerunud rakud värviti, jäädvustati ning loeti kokku vähemalt kuues vaateväljas. Mõõtkava vastab 200 μm -le (***) $p < 0,001$).

2.3.7. THBS4 ja OLFM4 mõju CD71, CD90, ITGB4 ja vimentini ekspressioonile keratinotsüütides

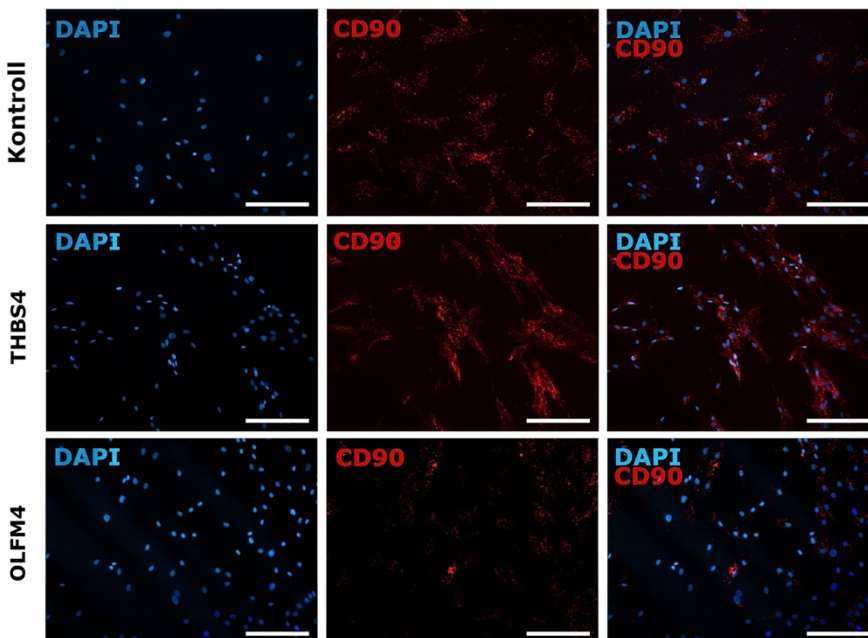
Edasi uuriti, kuidas THBS4 ja OLFM4 mõjutavad inimese primaarsete keratinotsüütide olulisemate markerite ekspressiooni. Rakke mõjutati selleks 24 tundi enne katset uuritavat valku sisaldava või tühja vektoriga transfekteeritud rakkudel kogutud (kontroll) konditsioneeritud söötmega.

Esimesena uuriti mesenhümaalsete tüvirakumarkerite (CD71, CD90) ekspressiooni muutumist THBS4 ja OLFM4 mõjul. Li jt. (1998) näitasid, et keratinotsüütide hulgast saab tüvirakke kindlaks teha CD71 madala ekspressioonitaseme järgi. Uurides peale THBS4 ja OLFM4 sisaldava konditsioneeritud söötmega mõjutatud keratinotsüütides CD71 antigeeni esinemist, mingeid erinevusi ei leitud. CD71 ekspressioonitase oli kõrge (joonis 16).



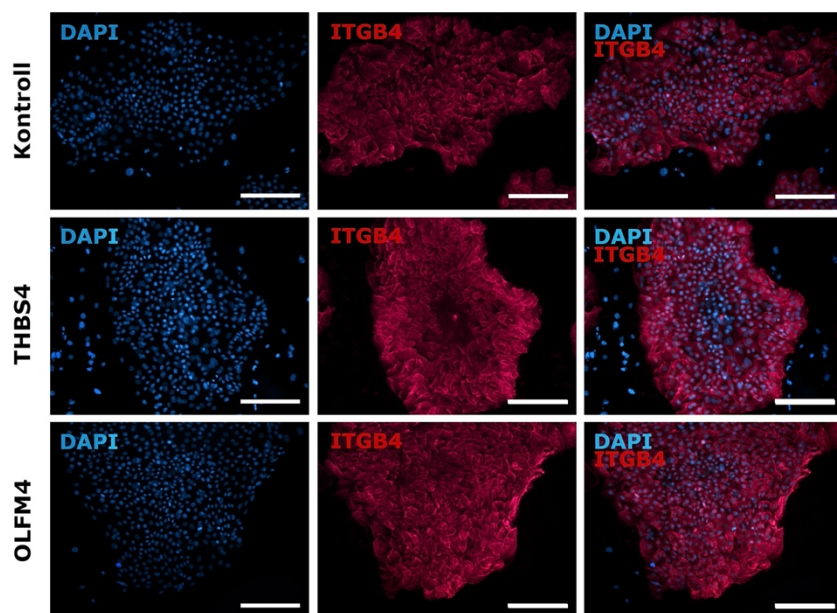
Joonis 16. CD71 ekspressioon inimese primaarsetes keratinotsüütides. CD71 ekspressioonitase on kõrge ning THBS4 ja OLFM4 CD71 ekspressiooni ei mõjuta. DAPI-ga on tähistatud tuumad. Mõõtkava vastab 200 μm -le.

CD71 ekspressioon võib aga keratinotsüütide kultiveerimisel muutuda ja olla seetõttu ebatäpne. On kirjeldatud, et CD90 on usaldusväärne keratinotsüütide tüvirakumarker nii *in vitro* kui ka *in vivo*. (Nakamura jt., 2006) Seetõttu uuriti ka CD90 ekspressiooni muutust OLFM4 ning THBS4 juuresolekul. Tulemuseks saadi, et THBS4 ei mõjuta CD90 ekspressiooni, kuid OLFM4 mõjul oli CD90 ekspressioon langenud (joonis 17).



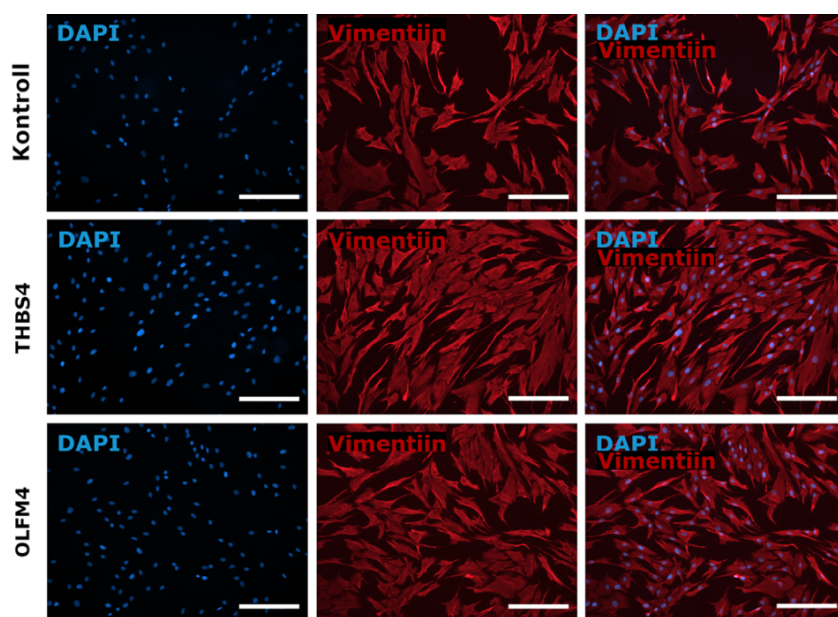
Joonis 17. CD90 ekspressioon inimese primaarsetes keratinotsüütides. OLFM4 vähendab märkimisväärselt CD90 ekspressioonitaset, THBS4 CD90 ekspressiooni ei mõjuta. DAPI-ga on tähistatud tuumad. Mõõtkava vastab 200 μm -le.

Järgmisena uuriti THBS4 ja OLFM4 mõju integriin $\beta 4$ (ITGB4) ekspressioonile. ITGB4 on oluline subühik hemidesmosoomides ning on demonstreeritud, et tal on oluline roll keratinotsüütide migratsioonivõime regulatsioonis (Russell jt., 2003). Antud töös THBS4 ja OLFM4 sisaldavate konditsioneeritud söötmete juuresolekul ITGB4 ekspressioonis muutusi ei leitud (joonis 18).



Joonis 18. ITGB4 ekspressioon inimese primaarsetes keratinotsüütides. OLFM4 ja THBS4 ITGB4 ekspressi ei mõjuta. DAPI-ga on tähistatud tuumad. Mõõtkava vastab 200 μm -le.

Keratinotsüütide migratsioonis on olulised vimentiini ja keratiini intermediaalsete filamentide vahelised interaktsioonid. On näidatud, et vimentiini *knockout* keratinotsüütide migratsioonivõime langes 21 % (Velez-delValle jt., 2016). Suuri erinevusi vimentiini ekspressioonitasemes valkude mõjul käesolevas töös ei tuvastatud (joonis 19).



Joonis 19. Vimentiini ekspressioon inimese primaarsetes keratinotsüütides. OLFM4 ja THBS4 vimentiini ekspressioonitaset ei mõjuta. DAPI-ga on tähistatud tuumad. Mõõtkava vastab 200 μm -le.

2.4. Arutelu

Käesolevas bakalaureusetöös uuriti kahe reguleeriva rakuvälise maatriksi valgu, THBS4 ning OLFM4 mõju naha fibroblastide ning keratinotsüütide proliferatsioonile ja migratsioonile. Need kaks protsessi on olulised nahahaavade paranemisel. Haavade paranemine on organismi üks keerukamaid protsesse, mis põhineb RVM-i ja eri rakutüüpide vahelistel interaktsioonidel. Nahahaavade kiire ja efektiivne paranemine on vajalik organismi homöostaasi hoidmiseks ning naha kui kaitsva barjääri taastamiseks.

Varasemalt on kirjeldatud OLFM4 ekspressiooni suurenemist kudede kahjustuste (Klaas jt., 2016) ning ka põletike korral (Gersemann jt., 2012; Shao jt., 2019). Lisaks on näidatud valgu antiapoptoetilisi omadusi (Dassen jt., 2010; Zhang jt., 2004) ja mõju rakkude liikuvusele (Gersemann jt., 2012; Liu jt., 2006) kuid siiani ei ole keegi uurinud OLFM4 rolli nahahaavade paranemises. Käesolevas bakalaureusetöös leiti, et OLFM4 suurendab oluliselt inimese naha primaarsete keratinotsüütide proliferatsiooni. Katsetes HaCaT rakuliini keratinotsüütidega rakkude arvu suurenemist aga OLFM4 mõjul ei täheldatud. Antud erinevus võib tuleneda asjaolust, et HaCaT on spontaanselt immortaliseerunud inimese keratinotsüütide rakuliin, mis prolifereruvad inimese primaarsete keratinotsüütidega võrreldes kiiremini (Wiegand ja Hipler, 2008). Kuigi HaCaT rakuliin on kindlas keskkonnas usaldusväärne mudel nahahaiguste uurimiseks (Colombo jt., 2017), on inimese primaarsed keratinotsüüdid keskkonnamuutustele vastuvõtlikumad ning sellest võib ka tuleneda OLFM4 märkimisväärne mõju nende proliferatsioonile. Veel uuriti CD90 ja CD71 ekspresseerumist primaarsetes keratinotsüütides. CD71 ekspressioonis OLFM4 mõjul erinevusi ei tuvastatud, kuid leiti, et OLFM4 vähendab märkimisväärselt CD90 ekspressiooni. Varasemalt on demonstreeritud, et CD90 on usaldusväärne keratinotsüütide tüvirakumarker nii *in vitro* kui ka *in vivo* (Nakamura jt., 2006). CD90 ekspressiooni langus näitab, et OLFM4 võib kiirendada rakkude diferentseerumist. Selleks, et kinnitada OLFM4 positiivset mõju rakkude diferentseerumisele võiks veel uurida, kas OLFM4 juuresolekul on rakkudes vähenenud basaalkihi rakkudele iseloomuliku markeri, Keratiin 14 (Moll jt., 1982) ning suurenenud diferentseerunud keratinotsüütidele iseloomuliku markeri, Keratiin 10 (Moll jt., 1982) ekspressioon. Töös saadud tulemustele tuginedes saab aga väita, et OLFM4 lisamine haavale võib kiirendada haava paranemist läbi keratinotsüütide proliferatsiooni ja diferentseerumise soodustamise. See näitab, et OLFM4-l võib olla oluline roll haava ravil epiteeli taastamises, sest antud protsess tugineb basaalmembraani tüvirakkude kiirel diferentseerumisel (Rodrigues jt., 2019).

Naha basaalsed keratinotsüüdid on basaalmembraanile kinnitunud läbi hemidesmosoomide, mille oluliseks transmembraaneks komponendiks on heterodimeer integriin $\alpha 6\beta 4$ (ITGA6B4) (Walko jt., 2015). Paljud leiud tõestavad, et ITGA6B4 võib otseselt mõjutada keratinotsüütide migratsiooni, mis toimub haavas vastusena makrofaagide poolt toodetud tsütokiinidele (Russell jt., 2003). Lisaks on kirjeldatud ka vimentiini olulist rolli keratinotsüütide migratsiooni reguleerimises, kus vimentiini *knockout* keratinotsüütide migratsioonivõime langes 21 % (Velez-delValle jt., 2016). Märkimisväärset mõju käesolevas töös immunofluorestsentsmikroopia abil inimese naha primaarsetes keratinotsüütides ITGB4 ega vimentiini ekspressioonile OLFM4 juuresolekul ei tuvastatud. Lisaks uuriti *in vitro* kraape-meetodil tekitatud mudelhaava paranemise katsega OLFM4 mõju HaCaT keratinotsüütide migratsioonivõimele. Tulemuseks saadi, et OLFM4 lisamisel HaCaT rakkude migreerumine ei muutunud. Saadud tulemustest saab järeldada, et kuigi OLFM4 lisamine haavale võib kiirendada haavade epiteeli taastamist, ei suurenda valk tõenäoliselt keratinotsüütide migreerumisvõimet haava piirkonda.

Haava paranemises on oluliseks etapiks ka fibroblastide migratsioon haava piirkonda. Lisaks epiteeli taastamise kiirendamisele leiti käesolevas töös, et OLFM4 soodustab oluliselt fibroblastide migreerumisvõimet ja invasiooni. See tähendab, et OLFM4 lisamine haavale võib soodustada ka fibroblastide invasiivset migreerumist haava paranemisel tekkivasse tihedasse fibrinivõrgustikku, kuhu fibroblastid moodustavad ajutise rakuvälise maatriksi (Rodrigues jt., 2019).

THBS4 on rakuvälise maatriksi valk, mille positiivset mõju haavade paranemisele on ka varasemalt kirjeldatud. Muuhulgas kirjeldasid Muppala jt. (2015) THBS4 *knockout* hiirtel aeglasemat haavade paranemist. Käesolevas töös THBS4 mõju keratinotsüütide proliferatsioonile, diferentseerumisele ning migratsioonivõimele ei leitud. Kuigi varasemalt on oletatud, et THBS4 ekspressiooni suurenemine võiks suurendada fibroblastide proliferatsiooni (Qian jt., 2019), siis käesolevas töös valgu soodustavat mõju fibroblastide proliferatsioonile ei tuvastatud. Küll aga leiti, et THBS4 suurendab märkimisväärselt fibroblastide migratsioonivõimet. Saadud tulemused näitavad, et THBS4 lisamine haavale ei soodusta tõenäoliselt keratinotsüütide proliferatsiooni ja migratsiooni. Selle eest võib valk suurendada fibroblastide migratsiooni haava ja seeläbi kiirendada haava paranemist.

Immunofluorestsentsmikroskoopia abil uuriti ka OLFM4 ja THBS4 ekspresseerumist inimese nahas. OLFM4 sekreteerivad tõenäoliselt keratinotsüüdid, sest valgu kõrge ekspressioonitase tuvastati epidermises. THBS4 lokaliseeriti dermisesse ning selle ekspressiooni eest vastutavad

suure tõenäosusega fibroblastid. Psoriaas on levinud nahahaigus, mille üheks tekkepõhjuseks on keratinotsüütide liiga kiire proliferatsioon ja diferentseerumine (Krueger ja Bowcock, 2005). Nii on psoriaatiline nahk ketendav, kuid lisaks sellele on psoriaasi patsientidel täheldatud ka kiiremat haavade paranemist kui normaalse nahaga patsientidel (Morhenn jt., 2013). Käesolevas töös võrreldi THBS4 ja OLFM4 ekspressiooni kolme psoriaasi patsiendi ja kolme normaalse nahaga patsiendi koelõikudes. Leiti, et OLFM4 ekspressioon suureneb psoriaasi patsientide dermises. Lisaks tuvastati THBS4 märkimisväärselt suurem ekspressioonitase psoriaasi patsientide koelõikudes. Kuigi antud töös THBS4 mõju fibroblastide proliferatsioonile ei täheldatud, näidati, et THBS4 suurendab oluliselt fibroblastide migratsioonivõimet. Nii võib olla seos psoriaasi patsientide suurema THBS4 taseme ning haavade kiirema paranemise vahel.

Meie uurimisgrupis on analüüsitud mõlema valgu mõju ka hiirte nahahaavade paranemisele ning siiani saadud tulemused on näidanud, et antud valkude lisamisel haava paranemine on kiirenenud *in vivo*. Seda ning käesolevas töös saadud tulemusi arvesse võttes saab väita, et nii OLFM4 kui THBS4 võiksid potentsiaalselt tulevikus olla kasutusel uutes haavaravi vahendites.

KOKKUVÕTE

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli uurida, kuidas reguleerivad valgud, OLFM4 ja THBS4, mõjutavad inimese naharakkude proliferatsiooni ja migratsiooni. Lisaks analüüsiti antud valkude ekspressiooni inimese nahas ning uuriti, milline on THBS4 ja OLFM4 ekspressioon levinud nahahaiguse, psoriaasi korral.

Immunofluorestsentsmikroskoopia abil lokaliseeriti OLFM4 ekspressioon inimese naha epidermisesse. Käesoleva töö tulemused näitavad, et OLFM4-l võib olla oluline roll epiteeli taastamises peale vigastust. Töös leiti, et OLFM4 kiirendab oluliselt inimese primaarsete keratinotsüütide proliferatsiooni ja diferentseerumist, mis on mõlemad olulised epiteeli taastamiseks. Mõju keratinotsüütide migratsioonivõimele valgu juuresolekul ei täheldatud. Lisaks leiti eksperimentide tulemusena, et OLFM4 soodustab märkimisväärselt fibroblastide migratsioonivõimet ja invasiivsust. See tähendab, et lisaks epiteeli taastamisele on OLFM4-l oluline roll fibroblastide liikumisel haava paranemisel tekkivasse tihedasse fibriinivõrgustikku. Nii aitab OLFM4 kaasa ajutise rakuvälise maatriksi tekkele, mis tagab raami haava paranemiseks ning revaskularisatsiooniks.

Uurides THBS4 rolli nahahaava paranemises leiti, et valgu lisamine haavale ei soodusta tõenäoliselt inimese naha primaarsete keratinotsüütide proliferatsiooni, diferentseerumist ja migratsiooni. Seega ei osale THBS4 epiteeli taastamises. Katsete tulemused aga näitavad, et antud valk võib suurendada märkimisväärselt fibroblastide migratsiooni haava piirkonda ja võib seeläbi kiirendada haava paranemist. Immunofluorestsentsmikroskoopia abil tuvastati, et THBS4 ekspresseerub inimese naha dermises ning sellest võib tuleneda ka valgu suurem mõju fibroblastidele. Lisaks leiti THBS4 märkimisväärselt suurem ekspressioonitase psoriaasi patsientidel, kellel on kirjeldatud haavade kiiremat paranemist. Need andmed näitavad, et kuigi epiteeli taastamises THBS4 tõenäoliselt ei osale, võib valk nahahaavade paranemist soodustada.

Kokkuvõttes näitavad käesoleva töö tulemused, et nii OLFM4 kui THBS4 võiksid potentsiaalselt tulevikus olla kasutusel uutes haavaravi vahendites.

„Effects of Thrombospondin-4 and Olfactomedin-4 on skin fibroblast and keratinocyte proliferation and migration“

Elizabeth Heinmäe

Summary

Wound healing relies on interactions between the extracellular matrix and different cell types. Olfactomedin-4 (OLFM4) is an extracellular matrix protein that has been associated with tissue regeneration. OLFM4 expression has been shown to be increased in damaged tissues as well as during inflammation and it can affect cell migration. Furthermore, OLFM4 has antiapoptotic qualities but the importance of OLFM4 in wound healing has not been investigated before. However, a possible role for Thrombospondin-4 (THBS4) in wound healing has been described. It is a proangiogenic protein and the experiments with THBS4 knockout mice have shown slower wound healing.

The aim of this study was to investigate the role of THBS4 and OLFM4 in skin fibroblast and keratinocyte proliferation and migration. The expression of said proteins was analysed both in healthy skin and of the skin of psoriasis patients.

Experimental data showed that OLFM4 is most probably secreted by keratinocytes because the expression was located to the epidermis. OLFM4 was found to induce keratinocyte proliferation and differentiation, although the effect to keratinocyte migration was not found. The protein induced the proliferation of primary keratinocytes and reduced stem cell marker, CD90 expression. These results show that OLFM4 could promote epithelia regeneration after injury. Furthermore, OLFM4 was found to significantly promote fibroblast migration and invasion. OLFM4 probably induces fibroblast migration into the thick fibrin matrix that forms during wound healing and where fibroblasts produce extracellular matrix.

The results of this thesis show that THBS4 is probably produced by fibroblasts as its expression was found in the dermis. Experimental data did not reveal any effects of THBS4 on keratinocytes, but the results showed that THBS4 sustained fibroblast migration. Additionally, the increased expression of THBS4 was found in psoriasis patients. The wounds of psoriasis patients have been shown to heal faster, therefore, it can be postulated that THBS4 could have a role in this process.

In summary, the results of this thesis show that OLFM4 and THBS4 could be potentially used to promote wound healing.

KIRJANDUSE LOETELU

Abdo, J. M., Sopko, N. A. and Milner, S. M. (2020). The applied anatomy of human skin: A model for regeneration. *Wound Med.* 28, 100179.

Abedin, M. and King, N. (2010). Diverse evolutionary paths to cell adhesion. *Trends Cell Biol.* 20(12), 734–742.

Adams, J. and Lawler, J. (1993). The thrombospondin family. *Curr Biol.* 3(3).

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. 2002. Cell junctions, Cell Adhesion and the Extracellular Matrix, p. 1108–1116. In *Molecular Biology of the Cell*. 4th ed. Garland Science, New York.

Amoh, Y. and Hoffman, R. M. (2017). Hair follicle-associated-pluripotent (HAP) stem cells. *Cell Cycle.* 16(22), 2169–2175.

Arend, A. ja Aunapuu, M. 2012. E-kursuse Histoloogia materjalid. Tartu Ülikooli kirjastus, Tartu.

Boukamp, P., Petrussevska, R. T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A. and Fusenig, N. E. (1988). Normal Keratinization in a Spontaneously Immortalized Aneuploid Human Keratinocyte Cell Line. *J. Cell Biol.* 106, 761–771.

Brody, M. J., Schips, T. G., Vanhoutte, D., Kanisicak, O., Karch, J., Maliken, B. D., Blair, N. S., Sargent, M. A., Prasad, V. and Molkentin, J. D. (2016). Dissection of Thrombospondin-4 Domains Involved in Intracellular Adaptive Endoplasmic Reticulum Stress-Responsive Signaling. *Mol. Cell Biol.* 36(1), 2–12.

Chen, L., Li, H., Liu, W., Zhu, J., Zhao, X., Wright, E., Cao, L., Ding, I. and Rodgers, G. P. (2011). Olfactomedin 4 suppresses prostate cancer cell growth and metastasis via negative interaction with cathepsin D and SDF-1. *Carcinogenesis.* 32(7), 986–994.

Chen, P., Cescon, M. and Bonaldo, P. (2015). Lack of Collagen VI Promotes Wound-Induced Hair Growth. *J. Invest. Dermatol.* 135(10), 2358–2367.

Chermnykh, E., Kalabusheva, E. and Vorotelyak, E. (2018). Extracellular Matrix as a Regulator of Epidermal Stem Cell Fate. *Int J Mol Sci.* 19(4).

Chin, K. L., Aerbajinai, W., Zhu, J., Drew, L., Chen, L., Liu, W. and Rodgers, G. P. (2008). The regulation of OLFM4 expression in myeloid precursor cells relies on NF-kappaB transcription factor. *Br. J. Haematol.* 143(3), 421–432.

Colombo, I., Sangiovanni, E., Maggio, R., ... Dell'Agli, M. (2017). HaCaT Cells as a Reliable In Vitro Differentiation Model to Dissect the Inflammatory/Repair Response of Human Keratinocytes. *Mediators Inflamm.* 7435621.

Danielsen, K., Olsen, A. O., Wilsgaard, T. and Furberg, A. S. (2013). Is the prevalence of psoriasis increasing? A 30-year follow-up of a population-based cohort. *Brit. J. Dermatol.* 168(6), 1303–1310.

- Dassen, H., Punyadeera, C., Delvoux, B., ... Romano, A. (2010). Olfactomedin-4 regulation by estrogen in the human endometrium requires epidermal growth factor signaling. *Am. J. Pathol.* 177(5), 2495–2508.
- Eming, S., Martin, P. and Tomic-Canic, M. (2014). Wound repair and regeneration: Mechanisms, signaling, and translation. *Sci. Transl. Med.* 6(265), 265sr6
- Ernst, S., Langer, R., Cooney, C. and Sasisekharan, R. (1995). Enzymatic Degradation of Glycosaminoglycans. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 30, 387–444.
- Frantz, C., Stewart, K. M. and Weaver, V. M. (2010). The extracellular matrix at a glance. *J. Cell Sci.* 123, 4195–4200.
- Frohm, M., Agerberth, B., Ahangari, G., Stähle-Bäckdahl, M., Lidén, S., Wigzell, H. and Gudmundsson, G. H. (1997). The Expression of the Gene Coding for the Antibacterial Peptide LL-37 Is Induced in Human Keratinocytes during Inflammatory Disorders. *J. Biol. Chem.* 272(24), 15258–15263.
- Frolova, E. G., Pluskota, E., Krukovets, I., ... Stenina, O. I. (2010). Thrombospondin-4 regulates vascular inflammation and atherogenesis. *Circ. Res.* 107(11), 1313–1325.
- Fuchs, E. and Horsley, V. (2008). More than one way to skin... *Genes Dev.* 22(8), 976–985.
- Gauglitz, G. G., Korting, H. C., Pavicic, T., Ruzicka, T. and Jeschke, M. G. (2011). Hypertrophic Scarring and Keloids: Pathomechanisms and Current and Emerging Treatment Strategies. *Mol. Med.* 17, 113–125.
- Gerdes, J., Lemke, H., Baisch, H., Wacker, H. H., Schwab, U. and Stein, H. (1984). Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J. Immunol.* 133(4), 1710–1715.
- Gersemann, M., Becker, S., Nuding, S., Antoni, L., Ott, G., Fritz, P., Oue, N., Yasui, W., Wehkamp, J. and Stange, E. F. (2012). Olfactomedin-4 is a glycoprotein secreted into mucus in active IBD. *J. Crohns Colitis.* 6(4), 425–434.
- Graham, F. L. and Smiley, J. (1977). Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5. *J. Gen. Virol.* 36, 59–72.
- Halfter, W., Monnier, C., Müller, D., Oertle, P., Uechi, G., Balasubramani, M., Safi, F., Lim, R., Loparic, M. and Henrich, P. B. (2013). The bi-functional organization of human basement membranes. *Plos One*, 8(7), e67660.
- Hoover, E., Alhajj, M. and Flores, J. L. (2020). Physiology, Hair. (Viimati uuendatud 27.07.2020). In *StatPearls*. StatPearls Publishing, Treasure Island.
- Hosoya, A., Lee, J.-M., Cho, S.-W., Kim, J.-Y., Shinozaki, N., Shibahara, T., Shimono, M. and Jung, H.-S. (2008). Morphological evidence of basal keratinocyte migration during the re-epithelialization process. *Histochem. Cell Biol.* 130(6), 1165–1175.
- Houschyar, K. S., Borrelli, M. R., Tapking, C., ... Duscher, D. (2020). Molecular Mechanisms of Hair Growth and Regeneration: Current Understanding and Novel Paradigms. *Dermatology.* 236(4), 271–280.

- Jainchill, J. L., Aaronson, S. A. and Todaro, G. J. (1969). Murine Sarcoma and Leukemia Viruses: Assay Using Clonal Lines of Contact-Inhibited Mouse Cells. *J. Virol.* 4(5), 549–553
- Jeckson, T. A., Neo, Y. P., Sisinthy, S. P. and Gorain, B. (2021). Delivery of Therapeutics from Layer-by-Layer Electrospun Nanofiber Matrix for Wound Healing: An Update. *J. Pharm. Sci.* 110(2), 635–653.
- Jones, J. C. R., Hopkinson, S. B. and Goldfinger, L. E. (1998). Structure and assembly of hemidesmosomes. *BioEssays.* 20(6), 488–494.
- Jourquin, J., Tripathi, M., Guess, C. and Quaranta, V. 2010. Laminins and Cancer Progression. In R. Zent and A. Pozzi (ed.), *Cell-Extracellular Matrix Interactions in Cancer*, 1st ed. Springer-Verlag, New York.
- Kim, K. K., Park, K. S., Song, S. B. and Kim, K. E. (2010). Up regulation of GW112 Gene by NF kappaB promotes an antiapoptotic property in gastric cancer cells. *Mol. Carcinog.* 49(3), 259–270.
- Klaas, M., Kangur, T., Viil, J., Mäemets-Allas, K., Minajeva, A., Vadi, K., Antsov, M., Lapidus, N., Järvekülg, M. and Jaks, V. (2016). The alterations in the extracellular matrix composition guide the repair of damaged liver tissue. *Sci. Rep-UK.* 6, 27398.
- Kobayashi, D., Koshida, S., Moriai, R., Tsuji, N. and Watanabe, N. (2007). Olfactomedin 4 promotes S-phase transition in proliferation of pancreatic cancer cells. *Cancer Sci.* 98(3), 334–340.
- Krueger, J. G. and Bowcock, A. (2005). Psoriasis pathophysiology: Current concepts of pathogenesis. *Ann. Rheum. Dis.* 64, 30–36.
- Laurila, P. and Leivo, I. (1993). Basement membrane and interstitial matrix components form separate matrices in heterokaryons of PYS-2 cells and fibroblasts. *J. Cell. Sci.* 104, 59–68.
- Li, A., Simmons, P. J. and Kaur, P. (1998). Identification and isolation of candidate human keratinocyte stem cells based on cell surface phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95(7), 3902–3907.
- Li, H., Kim, C., Liu, W., Zhu, J., Chin, K., Rodriguez-Canales, J. and Rodgers, G. P. (2020). Olfactomedin 4 downregulation is associated with tumor initiation, growth and progression in human prostate cancer. *Int. J. Cancer.* 146(5), 1346–1358.
- Liu, W., Chen, L., Zhu, J. and Rodgers, G. P. (2006). The glycoprotein hGC-1 binds to cadherin and lectins. *Exp. Cell. Res.* 312(10), 1785–1797.
- Liu, W., Liu, Y., Zhu, J., Wright, E., Ding, I. and Rodgers, G. P. (2008). Reduced hGC-1 protein expression is associated with malignant progression of colon carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 14(4), 1041–1049.
- Liu, W., Yan, M., Liu, Y., Wang, R., Li, C., Deng, C., Singh, A., Coleman, W. G. and Rodgers, G. P. (2010). Olfactomedin 4 down-regulates innate immunity against *Helicobacter pylori* infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107(24), 11056–11061.
- Llames, S., García-Pérez, E., Meana, Á., Larcher, F. and del Río, M. (2015). Feeder Layer Cell Actions and Applications. *Tissue Eng. Part B-Re.* 21(4), 345–353.

- Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C. A., Krieger, M., Bretscher, A., Ploegh, H., Amon, A. and Martin, K. C. 2016. Stem Cells and Niches in Multicellular Organisms, p. 988–989. In *Molecular Cell Biology*. 8th ed. W.H.Freeman and Company, New York.
- Lowes, M. A., Suárez-Fariñas, M. and Krueger, J. G. (2014). Immunology of Psoriasis. *Annu. Rev. Immunol.* 32, 227–255.
- Lu, P., Takai, K., Weaver, V. M. and Werb, Z. (2011). Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. *Csh. Perspect. Biol.* 3(12).
- Ingerpuu, S. 2018. Rakkudevahelised ühendused ja rakuväline maatriks, p. 1077–1079. In T. Maimets and S. Kuuse, *Rakubioloogia*. Tartu Ülikooli Kirjastus, Tartu.
- Marthiens, V., Kazanis, I., Moss, L., Long, K. and Ffrench-Constant, C. (2010). Adhesion molecules in the stem cell niche—More than just staying in shape? *J. Cell. Sci.* 123, 1613–1622.
- Menter, D. G. and Dubois, R. N. (2012). Prostaglandins in cancer cell adhesion, migration, and invasion. *Int. J. Cell Biol.* 723419.
- Mikesh, L. M., Aramadhaka, L. R., Moskaluk, C., Zigrino, P., Mauch, C. and Fox, J. W. (2013). Proteomic anatomy of human skin. *J. Proteomics.* 84, 190–200.
- Mitsuhashi, Y. and Hashimoto, I. (2003). Genetic abnormalities and clinical classification of epidermolysis bullosa. *Arch. Dermatol. Res.* 295, S29–S33.
- Moll, R., Franke, W. W., Schiller, D. L., Geiger, B. and Krepler, R. (1982). The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell.* 31(1), 11–24.
- Morgun, E. I. and Vorotelyak, E. A. (2020). Epidermal Stem Cells in Hair Follicle Cycling and Skin Regeneration: A View From the Perspective of Inflammation. *Front. Cell Dev. Biol.* 8, 581697
- Morhenn, V. B., Nelson, T. E. and Gruol, D. L. (2013). The Rate of Wound Healing is Increased in Psoriasis. *J. Dermatol. Sci.* 72(2), 87–92.
- Mouw, J. K., Ou, G. and Weaver, V. M. (2014). Extracellular matrix assembly: A multiscale deconstruction. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 15(12), 771–785.
- Muppala, S., Xiao, R., Krukovets, I., Verbovetsky, D., Yendamuri, R., Habib, N., Raman, P., Plow, E. and Stenina-Adognravi, O. (2017). Thrombospondin-4 mediates TGF- β -induced angiogenesis. *Oncogene.* 36(36), 5189–5198.
- Muppala, S., Frolova, E., Xiao, R., Krukovets, I., Yoon, S., Hoppe, G., VasANJI, A., Plow, E. and Stenina-Adognravi, O. (2015). Proangiogenic Properties of Thrombospondin-4. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 35(9), 1975–1986.
- Nakamura, Y., Muguruma, Y., Yahata, T., Miyatake, H., Sakai, D., Mochida, J., Hotta, T. and Ando, K. (2006). Expression of CD90 on keratinocyte stem/progenitor cells. *Br. J. Dermatol.* 154(6), 1062–1070.
- Naldi, L. and Mercuri, S. R. (2010). Epidemiology of comorbidities in psoriasis. *Dermatol. Therapy.* 23(2), 114–118.

- Narouz-Ott, L., Maurer, P., Nitsche, D. P., Smyth, N. and Paulsson, M. (2000). Thrombospondin-4 binds specifically to both collagenous and non-collagenous extracellular matrix proteins via its C-terminal domains. *J. Biol. Chem.* 275(47), 37110–37117.
- Niemann, C (2009). Differentiation of the sebaceous gland. *Dermatoendocrinol.* 1(2), 64–67.
- Nienstedt, W., Hänninen, O., Arstila, A. ja Björkqvist, S.-E. 1999. *Inimese füsioloogia ja anatoomia*. 12th ed.
- Oue, N., Sentani, K., Noguchi, T., ... Yasui, W. (2009). Serum olfactomedin 4 (GW112, hGC-1) in combination with Reg IV is a highly sensitive biomarker for gastric cancer patients. *Int. J. Cancer.* 125(10), 2383–2392.
- Parisi, R., Iskandar, I. Y. K., Kontopantelis, E., Augustin, M., Griffiths, C. E. M. and Ashcroft, D. M. (2020). National, regional, and worldwide epidemiology of psoriasis: Systematic analysis and modelling study. *The BMJ.* 369, m1590
- Prydz, K. (2015). Determinants of Glycosaminoglycan (GAG) Structure. *Biomolecules.* 5(3), 2003–2022.
- Qian, W., Li, N., Cao, Q. and Fan, J. (2018). Thrombospondin-4 critically controls transforming growth factor β 1 induced hypertrophic scar formation. *J. Cell Physiol.* 234(1), 731–739.
- Qian, W., Zhu, W.-H., Chen, Y.-J. and Fan, J.-F. (2019). Role of thrombospondin-4 in fibroblasts from normal skin and hypertrophic scars. *Clin. Exp. Med.* 12(1), 1253–1260.
- Rheinwald, J. G. and Green, H. (1975). Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: The formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell.* 6(3), 331–343.
- Ricard-Blum, S. (2011). The Collagen Family. *Csh. Perspect. Biol.* 3(1).
- Rodrigues, M., Kosaric, N., Bonham, C. A. ja Gurtner, G. C. (2019). Wound Healing: A Cellular Perspective. *Physiol. Rev.* 99(1), 665–706.
- Roosalu, M. 2010. *Inimese anatoomia*. 2nd ed.
- Russell, A. J., Fincher, E. F., Millman, L., Smith, R., Vela, V., Waterman, E. A., Dey, C. N., Guide, S., Weaver, V. M. and Marinkovich, M. P. (2003). Alpha 6 beta 4 integrin regulates keratinocyte chemotaxis through differential GTPase activation and antagonism of alpha 3 beta 1 integrin. *J. Cell. Sci.* 116, 3543–3556.
- Sarrazin, S., Lamanna, W. C. and Esko, J. D. (2011). Heparan Sulfate Proteoglycans. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3(7), a004952
- Schneider, M. R., Schmidt-Ullrich, R. and Paus, R. (2009). The Hair Follicle as a Dynamic Miniorgan. *Curr. Biol.* 19(3), R132–R142.
- Schwarzbauer, J. (1999). Basement membrane: Putting up the barriers. *Curr. Biol.* 9(7), R242–R244.
- Seko, N., Oue, N., Noguchi, T., Sentani, K., Sakamoto, N., Hinoi, T., Okajima, M., and Yasui, W. (2010). Olfactomedin 4 (GW112, hGC-1) is an independent prognostic marker for survival in patients with colorectal cancer. *Exp. Ther. Med.* 1(1), 73–78.

- Shao, S., Fang, H., Zhang, J., ... Wang, G. (2019). Neutrophil exosomes enhance the skin autoinflammation in generalized pustular psoriasis via activating keratinocytes. *Faseb. J.* 33(6), 6813–6828.
- Shinozaki, S., Nakamura, T., Iimura, M., Kato, Y., Iizuka, B., Kobayashi, M. and Hayashi, N. (2001). Upregulation of Reg 1alpha and GW112 in the epithelium of inflamed colonic mucosa. *Gut.* 48(5), 623–629.
- Södersten, F., Ekman, S., Schmitz, M., Paulsson, M. and Zaucke, F. (2006). Thrombospondin-4 and cartilage oligomeric matrix protein form heterooligomers in equine tendon. *Connect. Tissue. Res.* 47(2), 85–91.
- Sørensen, O. E., Cowland, J. B., Theilgaard-Mönch, K., Liu, L., Ganz, T. and Borregaard, N. (2003). Wound Healing and Expression of Antimicrobial Peptides/Polypeptides in Human Keratinocytes, a Consequence of Common Growth Factors. *J. Immunol.* 170(11), 5583–5589.
- Stenina-Adognravi, O. and Plow, E. F. (2019). Thrombospondin-4 in tissue remodeling. *Matrix Biol.* 75–76, 300–313.
- Tammi, R., Pasonen-Seppänen, S., Kolehmainen, E. and Tammi, M. (2005). Hyaluronan synthase induction and hyaluronan accumulation in mouse epidermis following skin injury. *J. Invest. Dermatol.* 124(5), 898–905.
- Tarnowski, W. M. and Hashimoto, K. (1967). Langerhan's Cell Granules in Histiocytosis X, The Epidermal Langernahs' Cell as a Macrophage. *Arch. Dermatol. Res.* 96(3), 298–304.
- Taylor, G., Lehner, M. S., Jenden, P. J., Sun, T.-T. and Lavker, R. M. (2000). Involvement of Follicular Stem Cells in Forming Not Only the Follicle but Also the Epidermis. *Cell.* 102(4), 451–461.
- Velez-delValle, C., Marsch-Moreno, M., Castro-Muñozledo, F., Galván-Mendoza, I. J. and Kuri-Harcuch, W. (2016). Epithelial cell migration requires the interaction between the vimentin and keratin intermediate filaments. *Sci. Rep-UK.* 6, 24389.
- Walko, G., Castañón, M. J. and Wiche, G. (2015). Molecular architecture and function of the hemidesmosome. *Cell Tissue Res.* 360(2), 363–378.
- Wiegand, C. and Hipler, U.-C. (2008). Methods for the measurement of cell and tissue compatibility including tissue regeneration process. *GMS Hyg. Infect. Control.* 3(1)
- Wong, D. J. ja Chang, H. Y. (2009). Skin tissue engineering. *StemBook.*
- Wong, R., Geyer, S., Weninger, W., Guimberteau, J.-C. and Wong, J. K. (2016). The dynamic anatomy and patterning of skin. *Exp. Dermatol.* 25(2), 92–98.
- World Health Organization. (2016). Global report on psoriasis. World Health Organization.
- Yamada, K. M., Collins, J. W., Cruz Walma, D. A., ... Wang, S. (2019). Extracellular matrix dynamics in cell migration, invasion and tissue morphogenesis. *Int. J. Exp. Pathol.* 100(3), 144–152.
- Yokoe, H. and Anholt, R. R. (1993). Molecular cloning of olfactomedin, an extracellular matrix protein specific to olfactory neuroepithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90(10), 4655–4659.

Young, P. M., Parsi, K. K., Schupp, C. W. and Armstrong, A. W. (2017). Psoriasis and wound healing outcomes: A retrospective cohort study examining wound complications and antibiotic use. *Dermatol. Online J.* 23(11).

Yousef, H., Alhadj, M. ja Sharma, S. (2020). Anatomy, Skin (Integument), Epidermis. (Viimati uuendatud 27.07.2020). In StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island.

Zeng, L.-C., Han, Z.-G. and Ma, W.-J. (2005). Elucidation of subfamily segregation and intramolecular coevolution of the olfactomedin-like proteins by comprehensive phylogenetic analysis and gene expression pattern assessment. *FEBS Lett.* 579(25), 5443–5453.

Zhang, J., Liu, W. L., Tang, D. C., Chen, L., Wang, M., Pack, S. D., Zhuang, Z. and Rodgers, G. P. (2002). Identification and characterization of a novel member of olfactomedin-related protein family, hGC-1, expressed during myeloid lineage development. *Gene.* 283(1–2), 83–93.

Zhang, X., Huang, Q., Yang, Z., Li, Y. and Li, C.-Y. (2004). GW112, a novel antiapoptotic protein that promotes tumor growth. *Cancer Res.* 64(7), 2474–2481.

Zocco, M. and Blanpain, C. (2017). Identifying the niche controlling melanocyte differentiation. *Genes Dev.* 31(8), 721–723.

KASUTATUD VEEBIAADDRESSID

1. Uniprot – <https://www.uniprot.org/uniprot/P16144> (kasutatud 12.04.2021)
2. Proteinatlas a – <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000113296-THBS4/tissue/skin> (kasutatud 08.05.2021)
3. Proteinatlas b – <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000102837-OLFM4/tissue/skin> (kasutatud 08.05.2021)

LIHTLITSENTS

Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Elizabeth Heinmäe,

annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihlitsentsi) minu loodud teose

“Regulatoorsete valkude OLFM4 ja THBS4 mõju naha fibroblastide ja keratinotsüütide proliferatsioonile ning migratsioonile”,

mille juhendajad on Mariliis Klaas ja Viljar Jaks,

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, alates **21.06.2024** kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

Kinnitan, et lihlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Elizabeth Heinmäe

31.05.2021