

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

MEDITSIINITEADUSTE VALDKOND  
BIO- JA SIIRDEMEDITSIINI INSTITUUT  
RNA BIOLOOGIA UURIMISGRUPP

**Tsütokiini TGF- $\beta$ 1 poolt vahendatud muutused laminiinide ekspressioonis ODM-2**

**rakuliinis**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Liis Hirvesoo

Juhendajad PhD Martin Pook

PhD Indrek Teino

TARTU 2023

## **Tsütokiini TGF-β1 poolt vahendatud muutused laminiinide ekspressioonis ODM-2 rakuliinis**

Eksfoliatsiooni sündroom (XFS) on kompleksne eest sõltuv haigus, mida iseloomustab fibrillaarse rakuvälise materjali tootmine ja kuhjumine silma erinevates kudedes. Tsütokiini transformeeriv kasvufaktor β1 (TGF-β1) hulk on XFS-i patsientide silma vesivedelikus suurenenud ning on pakutud välja kui ühte võimalikku eksfoliatiivse materjali (XFM) liigse tootmise ja ladestumise indutseerijat. XFM-i ladestuste seast on tuvastatud laminiine, kuid seni pole uuritud, kuidas on nende esinemine seotud XFS-ga ning pole määratud mis isovormidega on tegemist. Antud bakalaureusetöö eesmärk oli kaardistada, kuidas TGF-β1 mõjutab laminiinide alfa-ahelate (1-5) ekspressiooni ODM-2 rakuliinis. Bakalaureusetöö tulemusena selgus, et TGF-β1 stimuleerib *LAMA1*, kuid vähendab *LAMA3* ja *LAMA4* ekspressiooni. Edasine nende ahelatega seotud laminiinide funktsioonide uurimine XFS-i kontekstis aitaks paremini kirjeldada XFS-iga kaasnevaid muutusi silmas ja osutada uutele ravi võimalustele.

**Märksõnad:** eksfoliatsiooni sündroom, eksfoliatiivne materjal, laminiinid, ekstratsellulaarne maatriks, TGF-β1

**CERCS:** B620 Oftalmologia

## **Cytokine TGF-β1-mediated changes in the expression of laminins in the ODM-2 cell line**

Exfoliation syndrome (XFS) is a complex age-related disease, characterized by the production and accumulation of fibrillar extracellular material in various tissues of the eye. The cytokine transforming growth factor β1 (TGF-β1) is present in the aqueous humor of XFS patients at elevated levels and has been proposed as the main contributor in the production and deposition of exfoliative material (XFM). Laminins have been identified among XFM deposits, but their importance in relation to XFS has not been investigated. The specific isoforms found in XFM have also not been determined. The aim of this bachelor's thesis was to see how TGF-β1 affects the expression of the laminin alpha chains (1-5). This bachelor's thesis showed that TGF-β1 stimulated the expression of *LAMA1*, but decreased the expression of *LAMA3* and *LAMA4*. The outcomes from this thesis encourage further study of the function of the laminin isoforms associated with these alpha chains in the context of XFS, as it could help to better understand the changes occurring in the eye during the disease and may help in finding novel treatment options for XFS.

**Keywords:** exfoliation syndrome, exfoliative material, laminins, extracellular matrix, TGF-β1

**CERCS:** B620 Ophthalmology

# SISUKORD

SISUKORD .....	3
KASUTATUD LÜHENDID .....	4
SISSEJUHATUS .....	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE .....	7
1.1. Silma ehitus ja vesivedelik .....	7
1.1.1. Tsiliaarne epiteel .....	9
1.1.2. Trabekulaarne võrgustik .....	9
1.2. Eksfoliatsiooni sündroom .....	10
1.2.1. Eksfoliatsiooni sündroomiga seotud markerid .....	11
1.2.2. Eksfoliatsiooni sündroom ja ekstratsellulaarne maatriks .....	15
2. EKSPERIMENTAALOSA .....	21
2.1. Töö eesmärgid .....	21
2.2. Materjal ja meetodika .....	21
2.2.1. ODM-2 rakuliini kasvatamine .....	21
2.2.2. ODM-2 rakkude mõjutamine TGF- $\beta$ 1 tsütokiiniga .....	22
2.2.3. RNA eraldamine .....	22
2.2.4. RT-qPCR sihtmärkgeenide mRNA ekspresiooni tuvastamiseks .....	22
2.2.5. Immunofluorestsentsmikroskoopia .....	23
2.2.6. Statistiline analüüs .....	24
2.3. Tulemused .....	25
2.4. Arutelu .....	31
KOKKUVÕTE .....	34
TÄNUSÕNAD .....	37
KASUTATUD KIRJANDUS .....	38
KASUTATUD VEEBIAADRESSID .....	52
LISAD .....	53
LIHTLITSENTS .....	55

## KASUTATUD LÜHENDID

cDNA	komplementaarne DNA (inglise keeles <i>complementary DNA</i> )
Ct	lävitsükkel (inglise keeles <i>threshold cycle</i> )
ECM	ekstratsellulaarne maatriks (inglise keeles <i>the extracellular matrix</i> )
<i>FBNI</i>	fibriliin-1 (inglise keeles <i>fibrillin-1</i> )
GWAS	geneetiline assotsiatsiooniuuring (inglise keeles <i>genome-wide association study</i> )
IL	interleukiin (inglise keeles <i>interleukin</i> )
<i>LAMA</i>	aminiini subühik alfa (inglise keeles <i>laminin subunit alpha</i> )
LM	laminiin (inglise keeles <i>laminin</i> )
<i>LOXL</i>	lüsüüloksüdaasisarnase valgu (inglise keeles <i>lysyl oxidase-like protein</i> )
LTBP	latentset TGF- $\beta$ siduv valk (inglise keeles <i>latent TGF beta binding protein</i> )
NGS	preimmuunse kitse seerum (inglise keeles <i>Normal Goat Serum</i> )
PBS	fosfaat puhverdatud soolalahus (inglise keeles <i>phosphate buffered saline</i> )
Pen-Strep	penitsilliini-streptomütsiini segu (inglise keeles <i>Penicillin-Streptomycin Mixture</i> )
RT-qPCR	pöördtranskriptsiooni kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon (inglise keeles <i>reverse transcription quantitative polymerase chain reaction</i> )
T $\beta$ R	transformeeriv kasvufaktor beeta retseptor (inglise keeles <i>transforming growth factor beta receptor</i> )
<i>TGFBI</i>	transformeeriv kasvufaktor beeta indutseeritud (inglise keeles <i>transforming growth factor beta induced</i> )
TGF $\beta$	transformeeriv kasvufaktor beeta (inglise keeles <i>transforming growth factor beta</i> )
XFM	ekstratsellulaarse fibrillaarse materjali (inglise keeles <i>extracellular fibrillar material</i> )
XFS	eksfoliatsiooni sündroom (inglise keeles <i>exfoliation syndrome</i> )

# SISSEJUHATUS

Eksfoliatsiooni sündroom (XFS, inglise keeles *exfoliation syndrome*), tuntud ka kui pseudoeksfoliatsioon (Dvorak-Theobald, 1954), on kompleksne ja süsteemne east sõltuv haigus, mida iseloomustab fibrillaarse rakuvälise materjali tootmine ja kuhjumine silma erinevates kudedes (Ritch ja Schlötzer-Schrehardt, 2001). XFS-i tekkepõhjused ei ole täpselt teada, kuid hiljuti publitseeritud töodes on leitud, et XFS võib olla seotud erinevate põletikuliste protsessidega (Küchle *et al.*, 1995; Schlötzer-Schrehardt ja Naumann, 2006; Zenkel *et al.*, 2005). XFS tuvastatakse tavaliselt ebanormaalse fibrillaarse materjali kuhjumise tõttu silma eesmisel segmendil ning selle haigusega kaasneb suurenenud glaukoomi haigestumise risk (Schlötzer-Schrehardt *et al.*, 1992).

Peamisteks ekstratsellulaarseteks valkudeks, mis ladestuvad eksfoliatiivses materjalis (XFM, inglise keeles *extracellular fibrillar material*) on kirjeldatud, on laminiin, fibronektiin, vitronektiin, entaktiin/nidogein, elastiin, fibrilliin-1 ja fibuliin-2 (Sharma *et al.*, 2018). XFS-i käigus toimuv valgumaterjali ladestumine põhjustab häireid silma vesivedeliku voolus, mis on peamine silma normaalse siserõhu tagaja (Aboobakar *et al.*, 2017). Silmasisesel vesivedeliku juurde- ja äravool on vastavalt reguleeritud kahe peamise kompartimenti, tsiliaarkeha (vesivedeliku tootmise koht) ja trabekulaarse võrgustiku (vesivedeliku väljavoolu peamine koht) poolt (Goel *et al.*, 2010).

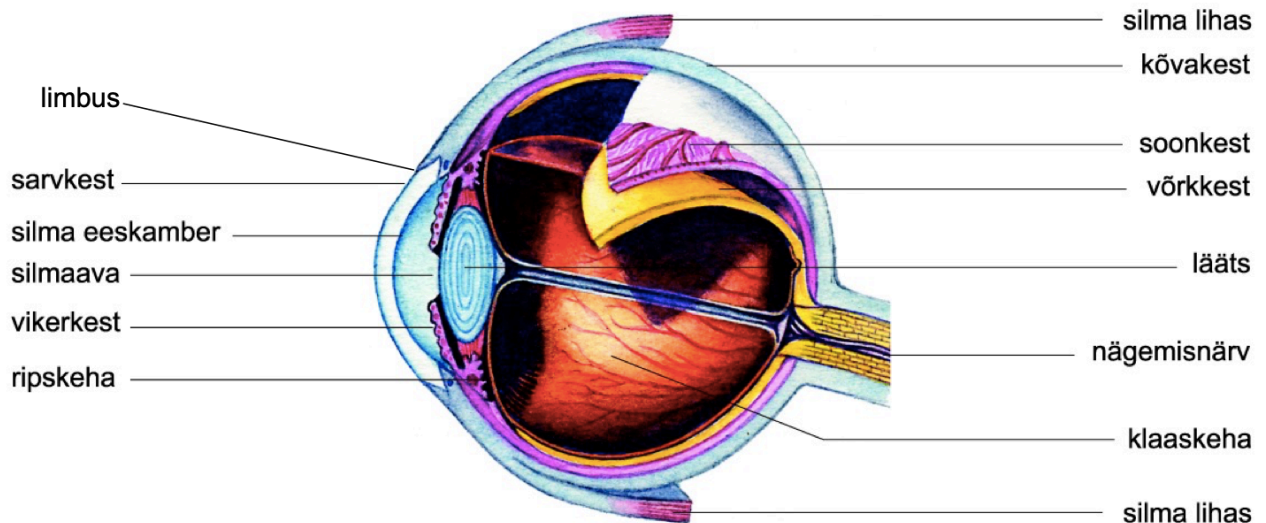
Laminiinid on heterotrimeersed glükoproteiinid, mis koosnevad kolmest disulfiid sidemetega seotud polüpeptiidi  $\alpha$ -,  $\beta$ - ja  $\gamma$ -ahelast (Aumailley, 2013). Laminiinid on olulised basaalmembraanide komponendid, olles raku adhesiooni, migratsiooni, diferentseerumise ja proliferatsiooni peamised rakuvälise maatriksi regulaatorid. Mehhanismidest, mille abil laminiinid sadestuvad ja organiseeritakse ekstratsellulaarses maatriksis (ECM, inglise keeles *the extracellular matrix*) ning nende rolli XFS-i osas teatakse vähe. Senised uuringud on vaid spekulatsioonid laminiinide ladestumise mehhanismide üle, eelkõige rakupinna retseptorite ja laminiini siduvate valkude rolli selle protsessi reguleerimisel (Hamill *et al.*, 2009).

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli kaardistada laminiinide  $\alpha$ -ahelate (*LAMA1*, *LAMA2*, *LAMA3*, *LAMA4* ja *LAMA5*) geeni ekspressiooni muutused tsütokiini TGF- $\beta$ 1-ga stimuleeritud immortaliseeritud inimese silma mittepigmenteerunud tsiliaarse epiteeli ODM-2 rakuliinis.

Bakalaureusetöö valmis Tartu Ülikooli molekulaar- ja rakubioloogia instituudi geenitehnoloogia õppekava raames. Antud bakalaureusetöö koostati Tartu Ülikooli meditsiiniteaduskonna alla kuulavas bio- ja siirdemeditsiini instituudis, RNA bioloogia uurimisgrupis.

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1. Silma ehitus ja vesivedelik



**Joonis 1. Inimese silm. Modifitseeritud <http://entsyklopeedia.ee/artikkel/silm1>.**

Silmamunas eristatakse kolme kesta: väline ehk kiudkest, keskmine ehk soonkest ja sisemine ehk võrkkest (Mandel *et al.*, 1983). Kiudkest koosneb läbipaistvast sarvkestast ehk kornea (*cornea*), opaaksest ehk läbipaistmatust kõvakestast (*sclera*) ja nende vahelisest piirkonnast - limbus (Joonis 1) (Kels *et al.*, 2015). Kiudkest säilitab silmamuna kuju ning on silmalihaste kinnituskohaks. Sarvkest kaitseb silma infektsioonide ning struktuursete vigastuste eest. Kõvakest moodustab sidekoe katte, mis kaitseb silma struktuuri füüsiliste vigastuste eest ning säilitab selle kuju. Sarvkesta tagumise poolsuse ja iirise vahele jääb ruum, mida kutsutakse silma eeskambriks (Mandel *et al.*, 1983; Willoughby *et al.*, 2010).

Silma soonkest koosneb vikerkestast ehk iirisest (*iris*), ripskehast ehk tsiliaarkehast (*corpus ciliare*) ja pärissoonkestast (*choroidea*) (Joonis 1) (Kels *et al.*, 2015). Vikerkest kontrollib silmaava ehk pupilli suurust ja seega ka võrkkestale jõudva valguse hulka. Tsiliaarkehas paiknevad ripslihased kontrollivad läätsse kuju ning lisaks on ripskeha silma vesivedeliku tootmise koht. Soonkest on veresoonte rikas kiht, mis varustab võrkkesta välimisi kihte hapniku ja toitainetega. Iirise taga paikneb silma tagakamber (Mandel *et al.*, 1983; Willoughby *et al.*, 2010).

Sisekest sisaldab võrkkesta ehk reetinat (Kels *et al.*, 2015). Reetina on kompleksne kihiline neuronite struktuur, mis hõivab ja töötleb valgust. Silmakihtidega ümbritsetud kolme läbipaistvat struktuuri nimetatakse vesivedelikuks, klaaskehaks ja läätsseks (Willoughby *et al.*, 2010).

Sarvkesta ja läätsse vahel paikneb läbipaistev vesivedelik, mis on oluline silma siserõhu tagamises ning täidab ja aitab moodustada silma eesmist ja tagumist kambrit. Vesivedelikku toodab aktiivselt silma tagumises kambri tsiliaarkeha tsiliaarne epiteel (Dismuke *et al.*, 2015). Tsiliaarne epiteel eritab vesivedelikku pidevalt, mis voolab läbi silmaava eesmise kambri suunas (Costagliola *et al.*, 2020). Vesivedeliku pidev tootmine ja väljavool silmas reguleerib ja säilitab silmarõhku, mis tagab silma optilisi omadusi. Ringlev vool vastutab hapniku ja toitainete transportimise eest silma väimise piirkonda ning eemaldab eesmisest kambri metaboolsedid jääainedid (Zhu *et al.*, 2012; Drewry *et al.*, 2018). Kui vesivedelik on silma tagumise kambri täitnud, liigub vesivedelik edasi üle läätsse ja ümber vikerkesta, seejärel läbib silmaava ning satub eeskambrisse (Abu-Hassan *et al.*, 2014). Vesivedelik võimaldab põletikuga seotud rakkudel vastavatel tsütokiinidel patoloogilise seisundi korral silmas levida (Goel *et al.*, 2010).

Vesivedelik väljub silmast kahe väljavoolutee kaudu - tavapärasel teel ja ebatavalisel teel. Peamised vesivedeliku väljavooluga seotud silma struktuurid on trabekulaarne võrgustik ja Schlemmi kanal (Drewry *et al.*, 2018). Enamik vesivedelikku (75-85%) väljub tavapärase tee kaudu (Abu-Hassan *et al.*, 2014; Goel *et al.*, 2010). Väike osa vesivedelikust väljub mööda ebatavalist teed, kus vesivedelik väljub läbi tsiliaarlihase välimiste koeruumide (Zhu *et al.*, 2012; Bill ja Phillips, 1971; Goel *et al.*, 2013).

Vesivedelik sisaldab elektrolüüte, orgaanilisi lahustunud aineid, kasvufaktoreid ja tsütokiine, mis säilitavad silma eesmise segmendi metaboolset tasakaalu (To *et al.*, 2002; Barsotti *et al.*, 1992; Freddo, 1993; McLaren *et al.*, 1993; Chowdhury *et al.*, 2010). Vesivedeliku homöostaas võib olla häiritud mitme silmahaiguse korral (sh. glaukoomi puhul), mis omakorda põhjustab mitmete kasvufaktorite ja tsütokiinide ekspressiooni suurenemist (Park *et al.*, 2021). Vesivedeliku sekretsioon ja selle väljavoolu reguleerimine on füsioloogiliselt oluline protsess silmasisese rõhu hoidmiseks normaalses vahemikus. Mistõttu on vesivedeliku ringet reguleerivate keeruliste mehhanismide mõistmine vajalik mitmete silmahaiguste raviks (Goel *et al.*, 2010).

### 1.1.1. Tsiliaarne epiteel

Tsiliaarkeha kogu pind on kaetud spetsiaalse epiteeliga – tsiliaarse epiteeliga (Delamere, 2005). Tsiliaarne epiteel koosneb sisemisest mittepigmenteerunud kihist ja välimisest pigmenteerunud kihist (Goel *et al.*, 2010). Kahekihiline tsiliaarne epiteel tagab mitut olulist funktsiooni silmas, sealhulgas vesivedeliku sekreteerimist (Zhu *et al.*, 2012; Goel *et al.*, 2013). Mittepigmenteerunud tsiliaarsest epiteelist toimub vesivedeliku aktiivne eritamine (Dismuke *et al.*, 2015).

### 1.1.2. Trabekulaarne võrgustik

Kontrollitud tasakaal sekreteeritud vesivedeliku hulga ja väljavoolu kiiruse vahel on oluline normaalse silmasisese rõhu hoidmiseks. Trabekulaarne võrgustik on läbilõikel vaadates kolmnurkne struktuur, mis koosneb endoteeliga ümbritsetud sidekoest. Selle struktuuri välimine kiht on kaetud fagotsüütiliste rakkudega, mis toimivad nn eelfiltritena, eemaldades vesivedelikust rakujääd enne, kui vedelik liigub edasi vähem poorsesse struktuuri (Lerner *et al.*, 2017; Goel *et al.*, 2010; Abu-Hassan *et al.*, 2014).

Trabekulaarset võrgustiku võib omakorda jagada kolmeks filtreerivaks komponendiks: uveaaltraktiks ehk uvea'ks, korneoskleraalne- ja jukstakanalikulaarne võrgustik (Stamer ja Clark, 2017). Eeskambrile kõige lähemal asuv uvea'line võrgustik on moodustatud iirise ja tsiliaarkeha stroomade sidekoe pikenditest, mis on täielikult kaetud endoteelirakkudega (Saccà *et al.*, 2016). See kiht ei paku erilist vastupanu vesivedeliku väljavoolule (Llobet *et al.*, 2003).

Järgmine kiht, korneoskleraane võrgustik, on moodustatud basaalmembraanil paiknevate endoteelitaoliste rakkudega kaetud lamellidest. Lamellid koosnevad glükoproteiinidest, kollageenist, hüaluroonhapest ja elastsetest kiududest. Voolutakistuse suurenemises on sarvkesta võrgustikul ning selle kitsamate rakkudevahelistel ruumidel suurem roll, võrreldes uvea võrguga (Llobet *et al.*, 2003).

Kolmas kiht, mis on ühendatud Schlemmi kanali endoteelirakkude siseseinaga, on jukstakanalikulaarne võrgustik. Selle moodustavad tihedasse ekstratsellulaarsesse maatriksisse (edasjuti ECM) paigutatud rakud ja tänu kitsastele rakkudevahelistele ruumidele panustab see kõige enam vesivedeliku väljavoolu takistamisse (Llobet *et al.*, 2003; Bill, 1975).

Schlemmi kanali endoteelirakkude kiht on viimane barjäär, mille vesivedelik peab enne silmast väljumist ületama. Schlemmi kanalist väljumisel siseneb vesivedelik veenidesse ja seguneb verega

episkleraalsetes veenides ning kõikide takistuste koosmõjul tagatakse keskmiselt  $15,5 \pm 2,6$  mmHg silmasisene rõhk (Bill, 1975; Llobet *et al.*, 2003).

Vesivedeliku väljavoolu katkemine põhjustab silmasisese rõhu tõusu, mis on silma haiguste patogeneesis peamine riskitegur (Goel *et al.*, 2010). Vesivedeliku väljavooluteede struktuuride ebanormaalsused võivad olla ka kaasasündinud ning põhjustada nt. glaukoomi (Abu-Hassan *et al.*, 2014). Glaukoomi puhul on näidatud, et nende kudede kaudu vähenenud väljavool on kõrgeenenud silmasisese rõhu üks peamisi põhjuseid (Drewry *et al.*, 2018).

Trabekulaarse võrgustiku ekstratsellulaarne maatriks sisaldab arvukalt erinevaid komponente, nagu kollageenid, laminiinid, elastiin, fibronektiin, fibrilliin, proteoglykaanid, matritsellulaarsed valgud jne. (Abu-Hassan *et al.*, 2014).

## 1.2. Eksfoliatsiooni sündroom

Eksfoliatsiooni sündroom (edaspidi XFS) on haigus, mida iseloomustab fibrillaarse rakuvälise materjali tootmine ja kuhjumine silma erinevates kudedes (Ritch ja Schlötzer-Schrehardt, 2001). Arvatakse, et XFS-i puhul võivad kaasned ECM-is struktuursed häired ja see võib olla seotud muutustega elastsetes kudedes üldisemalt ning ka silma arteriaalse hüpertensiooniga (Kaljurand ja Teesalu, 2010).

XFS on globaalselt esinev haigus, mis mõjutab 60–70 miljonit inimest maailmas, esinedes 0,3–30% üle 60-aastastest inimestest (Belovay *et al.*, 2010). XFS-i levimus inimpopulatsioonide vahel varieerub märkimisväärselt: 0% eskimotel, Austraallia populatsioonis 0,9% ning kuni 40,6% vanematel kui 80-aastastel patsientidel Põhjamaades (Forsius, 1979; Mccarty ja Taylor, 2000; Aström ja Lindén, 2007; Hirvelä *et al.*, 1995). XFS-i levimus Eestis on suur, 25,5% viiskümmend aastat ja vanematel isikutel, mis on sarnane üldisele põhjamaade levimusele (Kaljurand ja Teesalu, 2010). XFS-i sagedus suureneb järsult koos vanusega. Näiteks Islandi populatsioonis on XFS-i esinemissagedus 70 kuni 79-aastaste seas 17,7% ja üle 80-aastastel patsientidel 40,6%. Selline varieeruvus arvatakse olevat tingitud populatsioonide geneetilise tausta erinevustest, kuid lisaks võib-olla mõjutatud ka uuringute valimi heterogeensusest ja XFS-i diagnoosimiseks kasutatud kliiniliste kriteeriumide erinevustest (Aasved, 1969 ; Ritch, 2014; Nazarali *et al.*, 2018).

Silma XFS-i iseloomustab ekstratsellulaarse fibrillaarse materjali (edaspidi XFM) ladestumine kõikidele vesivedelikuga kokkupuutuvatele struktuuridele silma eesmisel segmendil (Elhawry *et al.*, 2012). Pilulambi uuringutes ilmneb XFM peene kōõmalaadse materjalina, mida tavaliselt leidub läätse eesmisel pinnal kontsentreerituna ringikujuliselt (Tarkkanen ja Kivelä, 2002). XFM-

i ladestusi võib leida ka trabekulaarses võrgustikus, pupilaaräärisel, tsonulaarkiududel, tsiliaarkeha esiküljel ja sarvkesta endoteelil (Nazarali *et al.*, 2018). XFM-i päritolu on ebaselge, kuid senised uurimistööd on osutanud võimalusele, et see pärineb intraokulaarsetest rakkudest (trabekulaar- ja sarvkesta endoteel, tsiliaar- ja läätseepiteel ja iiris) ning silmavälistest rakkudest (fibrotsüüdid, veresooned ja lihased) (Zenkel ja Schlötzer-Schrehardt, 2014).

XFM-i kuhjumine takistab vesivedeliku voolu trabekulaarses võrgustikus ja edasist väljavoolu Schlemmi kanalisse (Schlötzer-Schrehardt ja Naumann, 1995). XFM-i kuhjumise tulemuseks on silmasisese rõhu tõus, mis võib omakorda põhjustada optilise neuropaatia (Gharagozloo *et al.*, 1992). XFS on glaukoomi kõige levinum tuvastatav põhjus, moodustades mõnes riigis enamiku juhtudest. XFS võib lõppeda patsiendi haiges silmas nägemise kaotamisega (Aung *et al.*, 2018; Challa ja Johnson, 2018; Ovodenko *et al.*, 2007).

### **1.2.1. Eksfoliatsiooni sündroomiga seotud markerid**

XFS esinemisega seoses on tuvastatud nii geneetilisi kui ka valgulisi markereid, mis arvatakse olevat iseloomulikud sellele haigusele, kuid kindlat markerit pole siiani kirjeldatud.

XFM-i analüüsimisel on tuvastatud haigusega kaasnevaid muudatusi basaalmembraanis ja sellega seotud valkudes (sealhulgas laminiin, fibronektiin), elastsete kiudude valkude (sealhulgas fibrilliin-1 ja vitronektiin) latentset TGF- $\beta$ -siduvate valkudes ja latentse TGF- $\beta$ 1 ekspressioonis (Konstas *et al.*, 1991; Konstas *et al.*, 1990; Schlötzer-Schrehardt, 1997; Vogiatzis *et al.*, 1994; Challa ja Johnson, 2018; Borrás, 2018). Nende valkude ebanormaalne paiknemine või normaalsest erinev hulk XFS-i silmas on üheks võimaluseks selle haiguse kulu kirjeldamisel (Tamhane *et al.*, 2019). Lisaks võimalikele valgulistele markeritele on XFS-i puhul seostatud ka geneetilisi markereid nagu näiteks *LOXLI* (lüsüülloksüdaasisarnase valk 1) (Thorleifsson *al.* 2007).

### 1.2.1.1. *LOXLI*

*LOXLI* on geen viieliikmelisest ensüümide perekonnast (*LOXL*, *LOXLI*, *LOXL2*, *LOXL3* ja *LOXL4*), mis kodeerivad fibrilliini, elastiini ja kollageeni ristsidumisel osalevaid ensüüme (Li *et al.*, 2021). Muudatused *LOXLI* ensüümi kodeerivas alas võivad kaasa tuua kõrvalekaldeid ensüümi töös, millega võib kaasneda elastsete kiudude kuhjumine vastavas koes ning just selline protsess on ka omane XFS-ile (Nazarali *et al.*, 2018). *LOXLI* on tunnistatud XFS-i haiguse peamiseks mõjulookuseks (Schlötzer-Schrehardt, 2018).

*LOXLI* oli esimene geen, mis seostati XFS-i ning selle variatsioonidega ülegenoomse assotsiatsiooniuringu abil. Avastati seos haiguse ja *LOXLI* ühenukleotiidsete polümorfismide vahel, mis paiknevad kromosoomil 15q24.1 (Thorleifsson *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2021). Avastusest saadik on mitmed uuringud kinnitanud, et XFS-ga seotud *LOXLI* polümorfismid on paljudes, kuid mitte kõigis uuritud populatsioonides haigusele seni teadaolev omane geneetiline riskitegur (Aung *et al.*, 2018). Kuna seni tuvastatud XFS-iga seotud variandid *LOXLI*-s on kohati varieeruva fenotüübilise seosega populatsioonide vahel, seab see kahtluse alla nende rolli haiguse patogeneesis (Berner *et al.*, 2019).

Praeguste teadmiste kohaselt ei oma *LOXLI* mitte ainult tugevaimat geneetilist seost kõigist teadaolevatest XFS-i vastuvõtlikkuse geenidest, vaid sel näib olevat ka teatud funktsionaalne roll XFS-i patogeneesis (Schlötzer-Schrehardt, 2009). *LOXLI* kodeerib lüsüloksüdaas homoloog-1-te, mis katalüüsib lüsiinist lähtuvate kovalentsete ristsidemete teket rakuvälise maatriksi molekulides, nagu kollageen ja elastiin (Mäki, 2009). Arvatakse, et *LOXLI* geeni düsreguleeritud ekspressioon XFS-i patsientide kudedes aitab kaasa elastiini ja fibrilliini ristsidumisele fibrillaarsete agregaatide moodustumisel. Lisaks on näidatud, et see on seotud ka sidekoe degeneratsiooniliste muutustega, mis soodustavad glaukoomi ja süsteemsete komplikatsioonide teket (Schlötzer-Schrehardt *et al.*, 2012). Täpsed mehhanismid, mille kaudu *LOXLI* variandid mõjutavad haiguse riski on endiselt teadmata, kuid on pakutud, et see on seotud ebanormaalsete *LOXLI* ekspressioonitasemetega või häiritud valgu funktsioonidega (Schlötzer-Schrehardt, 2018; Berner *et al.*, 2019).

Laiemalt vaadatuna on *LOXLI* ensüüm, mis on spetsiifiliselt seotud tropoelastiini ristsidumisega ja elastsete kiudude moodustumisega, säilitamisega ja ümberkujundamisega, eriti dünaamiliste protsesside ajal, nagu kudede vigastus, fibroos ja isegi vähk (Liu *et al.*, 2004). Ristsidemed tagavad sidekudede, sealhulgas veresoonte seinte elastsuse, mis on vajalikud mehaanilise koormuse talumiseks (Responde *et al.*, 2007; Schlötzer-Schrehardt, 2018). *LOXLI* reguleerimatut

ekspressiooni ja aktiivsust seostatud fibrootiliste sidekoe häiretega nagu XFS-i patogeneesiga (Schlötzer-Schrehardt, 2009).

Lisaks on *LOXLI* ekspressiooni puhul märgatud, et ensüümi kogus on ajutiselt suurenenud fibrootilise valgumaatriksi tekke protsessi algstaadiumis. Kusjuures on teada, et seda fibrootilist protsessi võivad stimuleerida TGF- $\beta$ 1 ja IL-6, mille ebanormaalset hulka on tuvastatud XFS-i patsientide vesivedelikus (Schlötzer-Schrehardt *et al.*, 2008; Zenkel *et al.*, 2010; Garweg *et al.* 2017).

### **1.2.1.2. TGF- $\beta$ , selle isovormid ja retseptorid**

Transformeeriv kasvufaktor (TGF) on tsütokiin, mis mõjutab rakkude proliferatsiooni, migratsiooni, diferentseerumist, apoptoosi ja lisaks ka rakuvälise maatriksi komponentide akumulereerumist (Gao *et al.*, 2022).

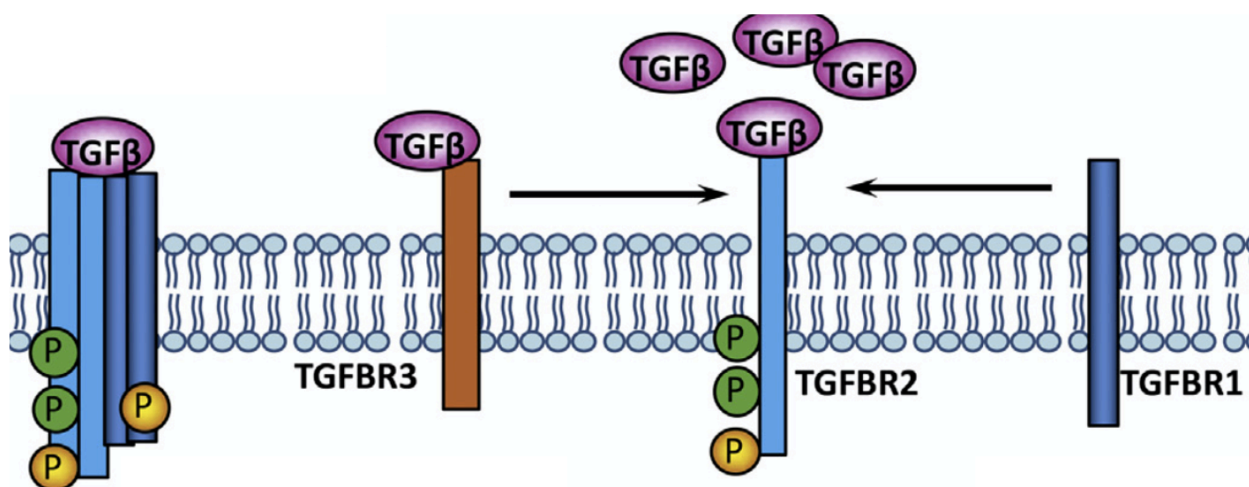
TGF- $\beta$  isovormide ekspresseerumist XFS-i patsientide vesivedelikus on eelnevalt uuritud ning teatud isovormide suurenenud hulka on seostatud sealhulgas XFS-i esinemisega (Yoneda *et al.*, 2007; Schlötzer-Schrehardt *et al.*, 2001). Need kasvufaktorid arvatakse olevat seotud XFM-i tootmisega või muutustega rakkudes, mis on seotud vesivedeliku väljavoolusüsteemiga, põhjustades suurenenud väljavoolu takistust (Park *et al.*, 2021), kuid koos teiste tsütokiinidega, mida XFS-i vesivedelikust on leitud, võivad põhjustada ka laiemalt muutusi silma ECM-i struktuurides. TGF- $\beta$  on tuvastatud ka vesivedeliku proovides, mis pärinesid Jaapani populatsioonist, kus mitte ainult TGF- $\beta$ 1 tase ei olnud oluliselt kõrgeks XFS-i patsientidel, vaid tuvastati ka kolmanda isovormi, TGF- $\beta$ 3 erinevad tasemed (Yoneda *et al.*, 2007). Nende uuringute ja mitmete teiste tulemused toetavad hüpoteesi, et just TGF- $\beta$ 1 on oluline faktor reguleerimaks XFM-i ladestumist (Borrás, 2018; Garweg *et al.*, 2017; Schlötzer-Schrehardt *et al.*, 2001; Rao ja Padhy, 2014; Takai *et al.*, 2012).

On huvitav, et seoses ühe XFS-i peamise geneetilise markeri (*LOXLI*) variantidega, on leitud LOXL ensüümide vähenenud aktiivsus ning on täheldatud TGF- $\beta$ 1 ja TGF- $\beta$ 2 isovormide suurenenud hulka XFS-i patsientide vesivedelikus. See võib osutada TGF- $\beta$  rollile LOXL ensüümide reguleerimises (Gayathri *et al.*, 2016; Sahay *et al.*, 2021).

Arvatakse, et TGF- $\beta$ 1 lokaalne tootmine silmas on XFS-is keskse tähtsusega (Borrás, 2018). TGF- $\beta$ 1 näib indutseerivat *LOXLI* ekspressiooni ja teiste rakuvälise maatriksi komponentide tootmist, mis esinevad XFM-i seas (Sethi *et al.*, 2011). Lisaks näitavad mitmete uuringute tulemused, et XFS-i glaukoomi patsientide vesivedelikus on vähenenud antioksidantide aktiivsus ja suurenenud

oksüdatiivse stress (Ferreira *et al.*, 2009; Ferreira *et al.*, 2004). Uuringud on kinnitanud, et lisaks TGF- $\beta$  muutustele vesivedelikus, on IL-6 (interleukiin-6) ja IL-8 tase XFS-i patsientide vesivedelikus kolm korda kõrgem kui kontrollrühmas ning just IL-6 tundub olevat oluline TGF- $\beta$  ekspressiooni indutseerimiseks. Nii TGF- $\beta$ , kuid ka pro-oksüdatiivne ja põletikku soodustav keskkond on olulised faktorid XFS-is (Zenkel *et al.*, 2010).

TGF- $\beta$  perekonna liikmed toimivad peamiselt läbi kahte tüüpi retseptorite: tüüp I (T $\beta$ RI) ja tüüp II (T $\beta$ RII) (Shi ja Massagué, 2003; Lawler *et al.* 1997). Signaaliraja aktivatsioonis võivad kuni kolm kolme tüüpi retseptorid: tüüp I, tüüp II ja tüüp III (T $\beta$ RII) (Joonis 2) (Groppe *et al.*, 2008). Signaalirada aktiveerub T $\beta$ RI-i ja T $\beta$ RII-i heterotetrameersete komplekside kaudu, mida kontrollivad posttranslatsioonilised modifikatsioonid, nagu fosforüülimine, ubikvitüleerimine, sumoüleerimine ja neddüülimine (Wells, 1996; Heldin ja Moustakas, 2016). TGF- $\beta$  isovormid, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 ja TGF- $\beta$ 3, seonduvad kõige pealt T $\beta$ RII-ga, mis algatab signaaliraja (Bertolio *et al.*, 2021). T $\beta$ RII-id seovad ligandiga ning fosforüleerivad T $\beta$ RI-i, misjärel aktiveerivad järgmiseid efektoreid (Groppe *et al.*, 2008). T $\beta$ RIII, tuntud ka kui beetaglukaan, võivad seonduda TGF- $\beta$  ligandidega, kuid neil ei ole signaaliülekanne domeene, kuid see-eest võivad moduleerida ligandi kättesaadavust ja retseptori aktiveerimist (Heldin ja Moustakas, 2016; Groppe *et al.*, 2008). T $\beta$ RIII-id võivad sõltuvalt ekspressioonitasemest ja rakusisesest paiknemisest suurendada või pärssida TGF- $\beta$  ligandide seondumist T $\beta$ RII-ga ja moduleerida TGF- $\beta$  perekonnaliikmete signaaliülekanne aktiivsust (You *et al.* 2007; Eickelberg *et al.* 2002; Groppe *et al.*, 2008). T $\beta$ RIII võib toimida TGF- $\beta$  signaaliraja inhibiitorina, kuid osades uuringutes on lisaks leitud, et T $\beta$ RIII-i puudumisel on spetsiifiliselt TGF- $\beta$ 2 mõjutusvõime rakkudele palju suurem. Paraku pole täpselt teada, millised mehhanismid selle taga on (Huang *et al.*, 2014; Hariyanto *et al.*, 2021; Heldin *et al.*, 2016; You *et al.*, 2007; Eickelberg *et al.*, 2002).



Joonis 2. TGF- $\beta$  signaaliülekanne retseptorid. Modifitseeritud Vander Ark *et al.*, 2018 järgi.

### 1.2.2. Eksfoliatsiooni sündroom ja ekstratsellulaarne maatriks

XFS-i patsientidel on tihti leitud mitmesugused sidekoe patoloogiaid, mis on seotud ECM-i allareguleeritud homöostaasiga (Schmitt *et al.*, 2021). See osutab asjaolule, et ECM-i muudatused nendel patsientidel on organismis laiemalt esinevad (Aboobakar *et al.*, 2017).

ECM-i muudatuste jälgimine *in vivo* XFS-i erinevates haiguse progresseerumise etappides on keeruline (Sahay *et al.*, 2021). Peamiseks takistuseks on protseduuride vähesus ECM-i funktsioonide otseseks mõõtmiseks patsientidel, kellel on määratud haiguse varane vorm (Sahay *et al.*, 2021). Molekulaarsed mehhanismid, mis selgitaksid XFS-i kliiniliste leidude põhjuseid, pole täpselt teada. (Sahay *et al.*, 2021) Senised uuringud haiguse varaste staadiumite kohta on tuvastanud, et XFS-i korral suureneb silmasisese rõhu tase vesivedeliku väljavoolu vähenemise tõttu trabekulaarses võrgus, Schlemmi kanalid ja läbivoolu kanalites (Chono *et al.*, 2018). Selle põhjuseks on suurenenud vesivedeliku väljavoolu takistus, mis on tingitud fibrootilistest (Chono *et al.*, 2018) muutustest ECM-il, mis on omakorda tingitud trabekulaarvõrgustikus toimuvatest muutustest (Takai *et al.*, 2012; Chono *et al.*, 2018). Senini ei ole põhjalikult uuritud võimalikke seoseid XFS-i ja mittepigmenteerunud tsiliaarses epiteelise ECM-i muudatuste vahel.

Kovalentne valkude ristseondumine on oluline mehhanism ECM-i molekulide stabiliseerimiseks ja aitab kaasa nende mehhaanilisele tugevusele ning ensümaatilisele lagunemisele (Zenkel *et al.*, 2005). XFS-iga seoses tuleb täheldada, et *LOXLI* üheks funktsiooniks on elastiini ristsidumisele kaasaaitamine (Molnar *et al.*, 2003). ECM-i valkudest, mis on seotud XFS-i haigusega, on kirjeldatud eelkõige elastseid mikrofiibrillaarseid komponente nagu fibrilliin-1 ja fibrilliin-2 ning

basaalmembraaniga seotud komponendid nagu laminiin, elastiin, entaktiin/nidogeen, fibronektiin ja vitronektiin, mis kõik esinevad XFM-is (Schlötzer-Schrehardt *et al.*, 1992; Li *et al.*, 1988; Sharma *et al.*, 2018). Fibrillaarseid maatriksvalke toodavad peamiselt läätse ekvatoriaalne epiteel, mittepigmenteerunud tsiliaarne epiteel ja iirise tagumine pigmentepiteel (Naumann *et al.*, 1998; Zenkel *et al.*, 2005). Lisaks on leitud, et ka trabekulaarvõrgustiku rakud, sarvkesta endoteelirakud ning iirise veresoonte endoteeli- ja silelihasrakud võivad olla nende valkude ekspresseerijad (Naumann *et al.*, 1998; Zenkel *et al.*, 2005).

### 1.2.2.1. Fibrilliin

Fibrilliin on suur (~320 kDa) ECM-molekul, mis polümeriseerudes moodustab mikrofibrille, on paljude sidekudede komponent ning oluline lähtematerjal elastsete kiudude ehitamiseks, kus esmasele fibrilliinist maatriksile lisatakse tropoelastiin ja toetatakse ka edasist elastiini ristsidumist (Olivieri *et al.*, 2010). Elastsed mikrofibrillid on kehas laialdaselt esinevad sidekoe struktuurielemendid, sealhulgas silma koes, kus need aitavad kaasa kudede elastsetele ja biomehaanilistele omadustele ning tagavad kinnituse rakkude ja maatriksstruktuuride vahel (Ramirez *et al.*, 2004).

Fibrilliin interakteerub paljude teiste ECM-s leiduvate valkudega ning on vajalik muuhulgas ka TGF- $\beta$  ECM-i külge seondumisel (Borrás, 2018). Seda reguleerib LTBP-2 (Hirani *et al.*, 2007) ning vahendab LTBP-1, mille läbi seotakse inaktiivne TGF- $\beta$  suure latentse kompleksina (moodustunud LTBP-1, TGF- $\beta$  ja nendega seotud peptiidide poolt) (Borrás, 2018).

Lisaks sisaldavad sidumissaite integriini retseptoritele, mis kutsuvad esile adaptiivse vastuse rakuvälise mikrokeskkonna muutustele, korrastades tsütoskeletti, kontrollides geeniekspressiooni ning vabastades ja aktiveerides maatriksiga seotud latentseid TGF- $\beta$  komplekse (Olivieri *et al.*, 2010). On märkimisväärne, et silmas paiknevad normaalsed tsiliaarjätked sisaldavad fibrilliini kuid mitte elastiini (Thomson *et al.*, 2019).

Kuigi inimestel on tuvastatud kolm fibrilliini isovormi, leidub just fibrilliin-1 kõige rohkem täiskasvanud kudedes (Thomson *et al.*, 2019). Mutatsioonid *FBNI* geenis võivad põhjustada ECM-is aktiveeritud TGF- $\beta$  kuhjumist (Kaartinen ja Warburton, 2003). Fibrilliini ekspressiooni indutseerib ka omakorda TGF- $\beta$ , mis põhjustab näiteks fibroosi (Kissin *et al.*, 2002).

Mutatsioonid, mis mõjutavad *fibrilliin-1* (*FBNI*) struktuuri või ekspressiooni, häirivad mikrofibrillide biogeneesi ja stimuleerivad ebaõiget varajast TGF- $\beta$  aktivatsiooni (Loeys *et al.*, 2010; Olivieri *et al.*, 2010). Lisaks võivad põhjustada mutatsioonid *FBNI* geenis integriini

sidumissaidi lähedal häireid rakk maatriksi interaktsioonides, maatriksi struktuuri korrektset formeerumist ja varajast TGF- $\beta$  komplekside rakuvälist jaotumist (Loeys *et al.*, 2010; Olivieri *et al.*, 2010).

### **1.2.2.2. Elastiin**

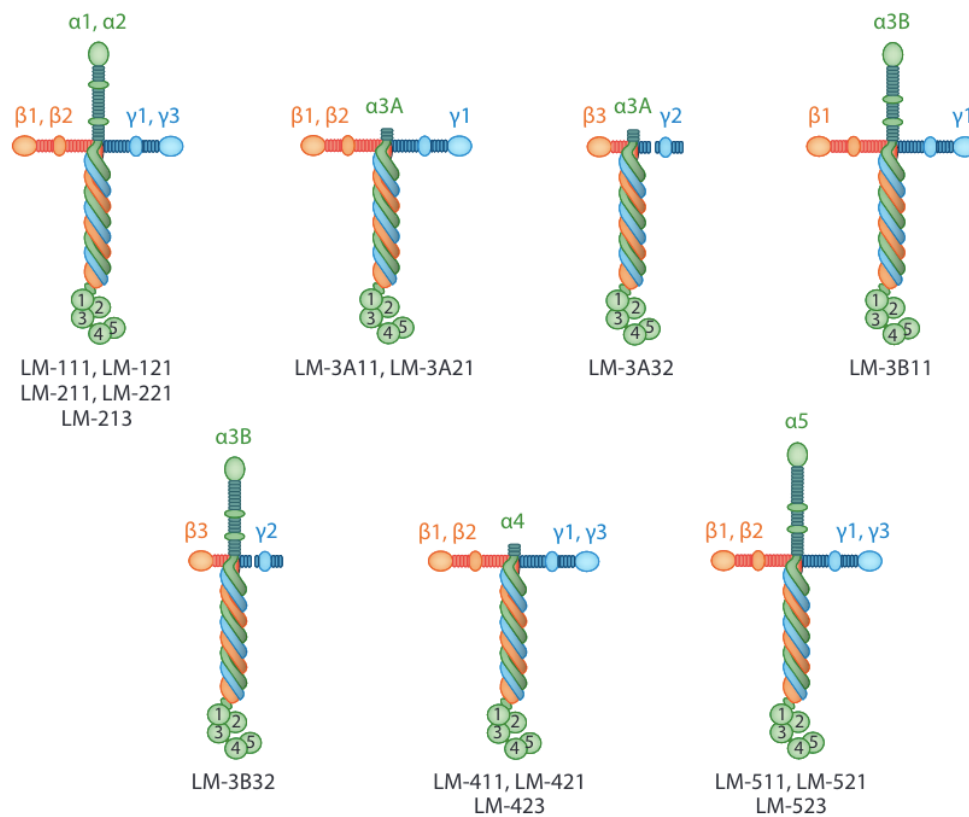
Elastiin on ECM-i valk, mis vastutab paljude kudede, näiteks suurte arterite, südameklappide, kopsukudede, naha, teatud sidemete ning kõhrede venivuse ja tõmbevõime funktsioonide eest (Reichheld *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2021). Elastsed kiud, mis on ensümaatilisel ristseotud tropoelastiini monomeeride ja mikrofibrillaarsete valkude saadused, koosnevad lahustumatust elastiini tuumast ja perifeerias paiknevatest mikrokiududest ehk mikrofibrillidest (Yeo *et al.*, 2011; Shin ja Yanagisawa, 2019; Wang *et al.*, 2021). Paljud geneetilised, kui ka omandatud südameveresoonehaigused, on seotud elastiini puudulikkusega ja elastsete kiudude lagunemisega (Cocciolone *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2021).

Elastiinil on tähtis roll XFS-i haiguse arengus ja progresseerumises, läbi ekspressiooni- ja struktuurimuutuste ECM-ile ladestumisel (Nazarali *et al.*, 2018). Kollageen ja elastiin on ECM ühed peamised komponendid, millega seotud muudatused on füsioloogiliste ja patoloogiliste seisundite kirjeldamisel olulised. Elastiin võimaldab kudede kokkutõmbumist ja vastupidavust. Lisaks indutseerib elastiin mitmesuguseid rakutegevusi, sealhulgas rakkude migratsiooni ja proliferatsiooni, valgumaatriksi sünteesi ja reguleerib erinevate proteaaside tootmist (Pérez-Rico *et al.*, 2014).

### **1.2.2.3. Laminiinid**

Laminiinid on suure molekulmassiga (vahemikus 400 kuni 900 kDa) glükoproteiinid, mis koosnevad kolmest disulfiidsidemetega seotud polüpeptiidi  $\alpha$ -,  $\beta$ - ja  $\gamma$ -ahelast (Hamill *et al.*, 2009; Aumailley, 2013). Need moodustavad ristküliku molekul (Joonis 3), millel on kaks või kolm lühikest haru ja üks pikk haru (Aumailley *et al.*, 2005; Tunggal *et al.*, 2000; Tzu ja Marinkovich, 2008; Yurchenco *et al.*, 2004; Hamill *et al.*, 2009). Inimese genoom kodeerib 11 geneetiliselt erinevat laminiini ahelat (Aumailley, 2013). Struktuurselt erinevad laminiinide ahelad domeenide arvu, suuruse ja struktuurse paigutuse poolest, andes laminiini perekonna liikmetele nii ühised kui ka ainulaadseid funktsioone (Aumailley, 2013; Domogatskaya *et al.*, 2012). Laminiinid on

vajalikud nn ehitusplokid rakkudevahelise võrgustiku loomisel, aidates edastada signaale rakkude vahel (Aumailley, 2013; Domogatskaya *et al.*, 2012).



### Joonis 3. Laminiinide struktuur ja isovormid. Ülevaade Domogatskaya *et al.* (2012) järgi.

Basaalmembraanid eraldavad parenhüümirakud sidekoest (Hamill *et al.*, 2009) ja on spetsiaalsed ECM-i struktuursed vormid, mis sisaldavad ühe põhikomponendina laminiine (Aumailley, 2013). Inimese genoomis kodeerivad 11 geeni laminiini ahelate järgmisi variante: viis  $\alpha$ -ahelat (*LAMA 1-5*), kolm  $\beta$ -ahelat (*LAMB 1-3*) ja kolm  $\gamma$ -ahelat (*LAMC 1-3*) (Aumailley, 2013). Laminiinide üks kõige olulisem funktsioon on interaktsioon basaalmembraanidega külgnevate rakkude membraansete retseptoritega nagu näiteks integriinid (Aumailley, 2013). Laminiinid reguleerivad selle kaudu mitmeid rakkude aktiivsuse- ja signaaliülekanne radasid (Aumailley, 2013). Lisaks basaalmembraanide struktuurse komponendina on laminiinid raku adhesiooni, migratsiooni, diferentseerumise ja proliferatsiooni peamised rakuvälise maatriksi regulaatorid (Hamill *et al.*, 2009).

Laminiinide ahelate keerdunud spiraal domeenide järjestused sisaldavad teavet ahela selektiivseks äratundmiseks ja nende domeenide vahelised ioonilised interaktsioonid määravad ahelate

kokkupaneku spetsiifilisuse (Kammerer *et al.*, 1995; Beck *et al.*, 1993; Nomizu *et al.*, 1996; Macdonald *et al.*, 2010). Heterotrimeerid pannakse kokku raku sees, esiteks toimub dimerisatsioon  $\beta$ - ja  $\gamma$ -ahelate vahel, millele järgneb  $\alpha$ -ahela lisamine (Aumailley, 2013).

Inimese puhul on kõikide  $\alpha$ -,  $\beta$ - ja  $\gamma$ -ahelate vahel rohkem kui 50 teoreetiliselt võimalikku heterotrimeerset seost. Siiski on pakutud ainult 16 ja isegi väiksem arv isovorme on lõplikult tõestatud ja puhastatud (Aumailley *et al.*, 2005; Aumailley, 2013). Vastavalt laminiinide heterotrimeersetele isovormidele, varieeruvad laminiinide funktsioonid ning hulk basaalmembraanide struktuuri formeerumisel (Shaw *et al.*, 2021). Näiteks  $\alpha1\beta1\gamma1$  (LM-111) on asendamatult oluline embrüonaalsel arengul (Perrin *et al.*, 2017; Henry *et al.*, 2001; Shaw *et al.*, 2021), samas kui  $\alpha3A\beta3\gamma2$  (LM-332) ekspresseerub tugevalt täiskasvanu epiteelikudedes ja selle funktsiooni kadumine põhjustab epidermise haprust (Rousselle *et al.*, 1997; Shaw *et al.*, 2021).

$\alpha5$ -ahelat sisaldavad heterotrimeerid, eriti LM-511 ja LM-521, on täiskasvanud organismis kõige levinumad isovormid (Miner *et al.*, 1997).  $\alpha2$ -ahelat sisaldavad isovormid LM-211 ja LM-221 esinevad skeleti- ja südamelihaste basaalmembraanides (Falk *et al.*, 1999; Durbeej 2010), samas kui LM-411 ja LM-421 on rohkesti ekspresseeritud endoteeli basaalmembraanides. LM-332 on aga näiteks spetsiifiline epiteelirakkude aluseks olevas basaalmembraanis (Rousselle ja Beck, 2013; Aumailley, 2013).

Üldreeglina interakteeruvad laminiinide C-terminaalsed otsad teiste valkudega, mis on ankurdatud rakkude plasmamembraanidesse, edastades seeläbi biokeemilisi ja mehaanilisi signaale rakusiseste ja rakuväliste molekulaarsete struktuuride vahel (Aumailley, 2013). Laminiinide N-terminaalsed otsad osalevad interaktsioonides peamiselt teiste basaalmembraanides esinevate rakuvälise maatriksi molekulidega (Aumailley, 2013).

Mõned laminiinide veel täpselt määratlemata osad arvatakse väikeste molekulidega interakteeruvat, nagu kasvufaktorid ja tsütokiinid (Aumailley, 2013). Võimalik, et see funktsioon on oluline väikeste molekulide säilitamiseks ning nende leviku, aktiveerimise ja rakkudele esitamise reguleerimiseks (Aumailley, 2013).

Mehhanismidest, mille abil laminiinid sadestuvad ja organiseeritakse ECM-i, teatakse vähe (Hamill *et al.*, 2009). Senised uuringud on vaid spekuleerinud laminiinide mehhanismide üle, mis määravad, kuidas rakud laminiini molekule ladestavad, eelkõige rakupinna retseptorite ja laminiini siduvate valkude rolli selle protsessi reguleerimisel (Hamill *et al.*, 2009).

Laminiine on leitud pigmenteerimata epiteelirakkude läheduses ja basaalmembraanis, kuid ei ole täpsustatud, millised laminiinide isovormid tuvastati (Marshall *et al.*, 1992). Laminiine on leitud nii väikestes kui ka suurtes veresoontes.  $\alpha$ 4- ja  $\alpha$ 5-ahelaid sisaldavad laminiinid on peamised veresoone endoteelis leiduvad isovormid (Yousif *et al.*, 2013). Teave laminiini isovormi funktsioonide kohta veresoone seinas erinevates kihtides on piiratud, kuid on oletatud, et laminiin  $\alpha$ 5 omab rolli rakkude migratsiooni pärssimisel läbi veresoone seinas (Armulik *et al.*, 2005; Gloe *et al.*, 1999). Yousif *et al.* (2013) on pakkunud, et laminiini ekspressiooni muutused võivad põhjustada vaskulaarseid haigusi (hüpertensioon ja ateroskleroos) silma struktuurides kus toimub veresoonte ümber kujundamine. On täheldatud, et laminiini  $\alpha$ 4 ahela, mida ekspresseeritakse basaalmembraanides, (näiteks endoteeli basaalmembraanis), deletsioon põhjustab mikroveresoonte arengu halvenemist (Thyboll *et al.*, 2002). Vere-vesibarjääri kahjustused võivad võimendada põletikuliste silmahaiguste patofüsioloogiat, võimaldades vere kaudu levivatel molekulidel ja põletikulistel rakkudel lekkida silma eesmise segmenti (Coca-Prados, 2014).

## 2. EKSPERIMENTAALOSA

### 2.1. Töö eesmärgid

Käesoleva uurimustöö eksperimentaalseosa eesmärgid oli:

- Kaardistada TGF- $\beta$ 1 vahendatud muudatused laminiini  $\alpha$ -ahelate ekspressioonis silma mittepigmenteerunud tsiliaarse epiteeli ODM-2 rakuliinis ja läbi viia immunofluorestsentsanalüüs, et tuvastada laminiini ekspressiooni valgu tasemel.
- Tuvastada, kas TGF- $\beta$ 1 mõjutab TGF- $\beta$  isovormide *TGFB1*, *TGFB2* ja *TGFB3* geeniekspressiooni ODM-2 rakuliinis.
- Välja selgitada, kas TGF- $\beta$ 1 mõjutab TGF- $\beta$  retseptorite *TGFBRI*, *TGFB2* ja *TGFB3* geeniekspressiooni ODM-2 rakuliinis.
- Teada saada, kuidas TGF- $\beta$ 1 töötlus mõjutab *FBNI* ja *LOXLI* geeniekspressiooni ODM-2 rakuliinis.

### 2.2. Materjal ja metoodika

#### 2.2.1. ODM-2 rakuliini kasvatamine

Uurimustöö eksperimentaalses kasutati immortaliseeritud inimese silma mittepigmenteerunud tsiliaarse epiteeli rakuliini ODM-2, mis saadi koos juhistega rakkude koekultuuris kasvatamiseks Fernández-Vega Oftalmoloogia Instituudist (Oviedo, Astuuria, Hispaania) Héctor González Iglesias-e uurimusgrupilt. ODM-2 rakke kasvatati DMEM/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham) söötmes, millele oli lisatud 10% FBS ja Pen-Strep (penitsilliin 50 U/ml, streptomütsiin 50 ug/ml). Rakke kasvatti 10 cm rakukultuuri tassidel (BioLite, ThermoFisher Scientific) 37 °C juures, 5% CO<sub>2</sub> ning veeauruga küllastatud inkubaatoris.

Söödet vahetati vähemalt iga 48h tagant ning rakke paseeriti suhtes 1:2 60-70% konfluentsuse saavutamisl uutele 10cm rakukultuuri tassidele. Rakkude passeerimiseks pesti rakke PBS-iga ning kasutati 0,025 % trüpsiini (Gibco™1Trypsin-EDTA) lahust. Trüpsiini neutraliseerimiseks kasutati FBS-i sisaldavat rakusöödet (1:1 kasutatud trüpsiini hulga kohta).

### **2.2.2. ODM-2 rakkude mõjutamine TGF- $\beta$ 1 tsütokiiniga**

Rakud jagati 12-kannulistele plaatidele ( $1 \times 10^5$  raku/kann), et teostada TGF- $\beta$ 1 mõjutamised: 24h, 48h ja 72h. Rakkude loendamiseks kasutati hemotsütomeetrit. Järgmisel päeval vahetati rakkudel söödet ning sellele järgneval päeval vahetati rakusööde seerumvaba söötme vastu. Seerumvaba söödet hoiti rakkudel 24 tundi ning siis alustati TGF- $\beta$ 1-ga rakkude mõjutamist.

Rakkude töötlemiseks kasutati TGF- $\beta$ 1 (Peprotech), lõppkontsentratsiooniga 5ng/mL. Töötlemata kontrollidena kasutati paralleelkultuure, mida hoiti seerumivabades tingimustes ilma TGF- $\beta$ 1 mõjutamiseta. Rakud lüüsiiti QIAzol reagentis (Qiagen) vastavalt 24h, 48h ja 72h möödudes. Sööde eemaldati rakkude pealt ning rakkudele lisati 500  $\mu$ l QIAzol (Qiagen) lüüsilahust 5 minutiks toatemperatuuril, suspendeeriti ningkoguti materjal 1,5 ml tuubi ja hoiti -80C juures.

### **2.2.3. RNA eraldamine**

RNA eraldati kasutades Total RNA Zol-Out KIT-i (A&A Biotechnology, Poola). Toatemperatuurile sulatatud rakulüsaatidele lisati 500  $\mu$ l lahuse kohta 110  $\mu$ l kloroformi. Kloroformi ja lüsaadi segu segati 20 sekundit vorteksil. Proovid inkubeeriti 3 minutit toatemperatuuril. Järgnevalt tsentrifugeeriti proove 15 minutit 12 000 g, 4°C juures. 300  $\mu$ l tekkinud vesifaasi tõsteti uude 1,5 ml tuubi ja lisati 1:1 suhtega isopropanooli. Vesifaasi segu kanti minikolonniidele ja eraldati RNA vastavalt tootja protokollile järgi. RNA kontsentratsiooni mõõtmiseks kasutati NanoDrop 2000c spektrofotomeetrit (ThermoFisher Scientific).

### **2.2.4. RT-qPCR sihtmärkgeenide mRNA ekspresiooni tuvastamiseks**

Sihtmärkgeenide ekspresioonitasemete tulemuste analüüsiks viidi läbi RT-qPCR.. Võimaliku DNA kontaminatsiooni eemaldamiseks puhastatud RNA proovides teostati eelnevalt DNAasi töötlus (EN0521, Thermo Fisher Scientific). Seejärel teostati cDNA sünteesimine (K1622, Thermo Fisher Scientific).

96 kannuga plaadile kanti proovid, kus kogu RNA kogus oli 355 ng. Lisati DNAasi (1U ensüümi 1  $\mu$ g RNA kohta), Ribolocki (Thermo Fisher Scientific), vastava DNAasi puhvrit ja vett reaktsiooni lõppmahu 10,5  $\mu$ l kohta tootja soovitude järgi. DNAasi töötlus toimus 37°C juures 30 minutit, liasti 1  $\mu$ l EDTA-d ja inkubeeriti 65°C juures 10 minutit reaktsiooni peatamiseks.

DNaasi töötamise järel sünteesiti RNA-le komplementaarne DNA (cDNA). Proovidele lisati 1 µl 100µM Oligo(dT) praimerit ja 2 µl 10mM nukleotiidide segu (dNTP *mix*) ning kuumutati 65 C juures 5 minutit. Igale proovile lisati 4 µl RT puhvrit (RevertAid esüümile sobilik tööpuhver), 1 µl RevertAid pöördtranskriptaasi (Thermo Fisher Scientific) ja 0,5 µl RNAasi inhibiitorit (Thermo Fisher Scientific). cDNA sünteesiks hoiti proove 1h 42°C ja reaktsiooni peatamiseks 10 minutit 75°C juures. Saadud cDNA lahjendati veega 200 µl-ni. Kasutatud praimerid on Lisas 1.

qPCR jaoks pipeteeriti 384 kannuga plaadile sihtmärkgeenide tuvastamiseks vajalikud praimerid koos HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermix seguga (1 µl 4 µM *forward+reverse* praimerite segu; 2,4 µl 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR segu ning 2,6 µl vett). Seejärel pipeteeriti igasse kannu 6 µl lahjendatud cDNA proovi ja plaat asetati masinasse QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Kasutatud programm on toodud Lisas 2. Iga proovi mõõdeti kolm korda ning saadud  $\Delta\Delta C_t$  (*delta delta threshold cycle*) väärtusi analüüsiti MS Exceli abil (Microsoft.). Sihtmärkgeenide ekspresioon normaliseeriti referentsgeeni *EEF1A1* suhtes.

### 2.2.5. Immunofluorestsentsmikroskoopia

Immunofluorestsentsmikroskoopia läbiviimiseks kasvatati rake 24-kannulistes plaatides, kuhu oli eelnevalt lisatud sobiva suurusega ümarad kattedklaasid. Kaudne immunofluorestsentsmärgistamine viidi läbi ODM-2 rakkudel. Primaarsete hiirest ( $\alpha 4$ -spetsiifiline monoklonaalne antikeha 3H2;  $\alpha 5$ -spetsiifiline Mab  $\alpha 4$ -spetsiifiline monoklonaalne 3H2; päritolu: Sulev Ingerpuu) ja küülikust ( $\alpha 3$ -spetsiifiline polükloonaalne antikeha sc-20143 (H-187); päritolu: Santa Cruz Biotechnology) pärit vastavaid laminiinide aheleaid tuvastavate antikehade seondumine tuvastati kitsest pärit hire või küüliku antikehasid tuvastavate konjugeeritud sekundaarsete antikehadega 1:500 (Alexa 488 ja Alexa 555, Thermo Fisher Scientific) ja tuuma visualiseerimiseks kasutati DAPI-it. Negatiivse kontrolli puhul kasutati vaid vastava sekundaarse antikehaga töötalemist. Pärast rakkude fikseerimist teostati PBS-iga pesemine neli korda ja permeabiliseeriti rake 0,1% Triton X-100 PBS lahusega 10 minutit toatemperatuuril. Seejärel pesti preparaate kolm korda PBS-iga. Mittespetsiifilise seondumise vähendamiseks blokeeriti esmalt rake 5% NGS PBS lahusega 30 minutit toatemperatuuril. Antikehadega inkubeerimine toimus 1h märjas kambris parafilmil 50 µl tilkadel. Kattedklaasid paigutati pärast 1h tagasi 24-kannudesse ning pesti kolm korda värseke PBS-iga. Järgnevalt korrati märgkambrilise inkubatsiooni sekundaarsete antikehadega 45 minutit. Kattedklaasid paigutati pärast 45 minutit tagasi 24-kannudesse ning pesti kolm korda PBS-iga. Viimase etapina töödeldi rake 300 µl DAPI lahusega 1:1000 (1 mg/mL kontsentratsioonist) 10 minutit

ja pesti seejärel 3x PBS-iga. Preparaadid sulundati spetsiaalsesse isetahkuvasse sulundamisvedelikku (Fluorecent mounting medium, Dako) ning analüüsiti fluorestantsmikroskoobiga (*Zeiss AxioCam MRc 5*).

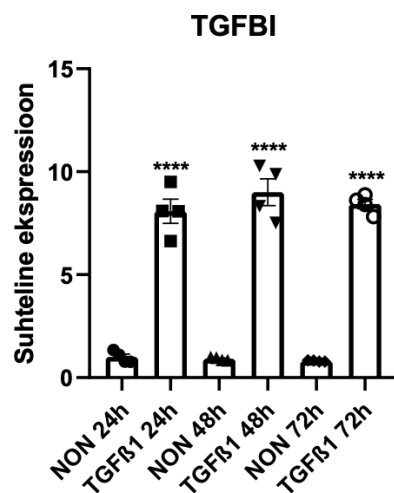
### **2.2.6. Statistiline analüüs**

Andmete analüüsiks ning graafikute esitamiseks kasutati programmi GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc, USA). Statistiliseks analüüsiks kasutati ühe-suunalist ANOVA testi (*one-way ANOVA*) Tukey testiga (*Tukey's multiple comparison test*). Statistiliselt oluliseks arvestati tulemused, mille korral P-väärtus oli väiksem kui 0,05.

## 2.3. Tulemused

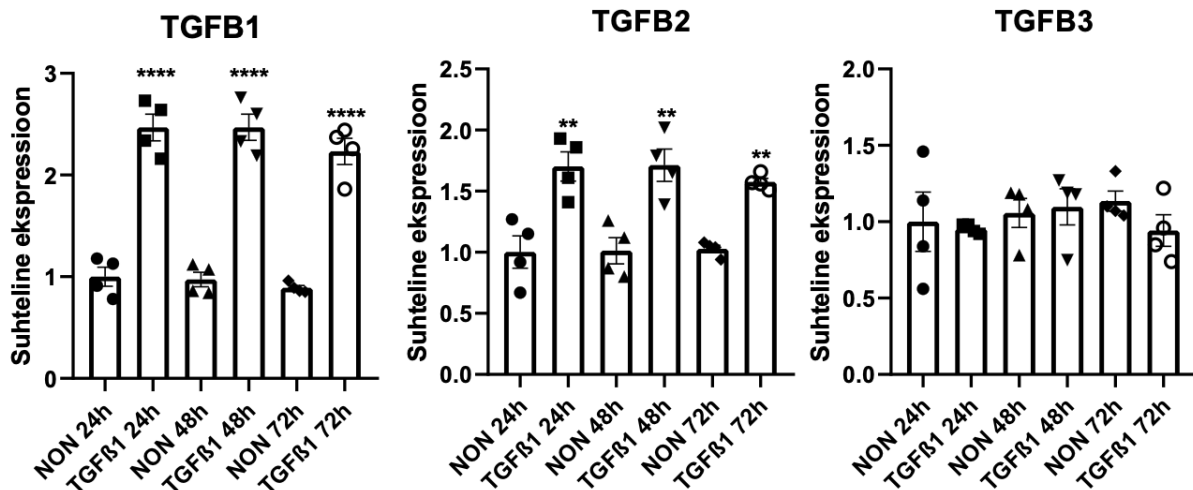
Antud töös uuriti kuidas ekstratsellulaarse maatriksiga seotud geenide, laminiinide geeniekspressioon muutub ODM-2 rakuliinis, kui neid stimuleeritakse vastavalt 24h, 48h ja 72h tsütokiiniga TGF- $\beta$ 1 (5 ng/mL). Erinevate laminiinide esmaseks kaardistamiseks tuvastati nende alfa-ahelaid (*LAMA1*, *LAMA2*, *LAMA3*, *LAMA4*, *LAMA5*), kuna just need ahelad on ühed peamised, mis tagavad erinevate laminiinide funktsionaalsed erinevused. Selleks, et hinnata TGF- $\beta$ 1 poolt põhjustatud rakuvastust, analüüsiti lisaks laminiinidele ka teisi TGB- $\beta$  vastuses olulisi sihtmärkgeene nagu *TGFBI*, *TGFB2*, *TGFB3*, *TGFBRI*, *TGFBR2*, *TGFBR3* ja *TGFBI*.

Kinnitamaks, et TGF- $\beta$ 1 stimulatsioon oli ODM-2 rakkudes sihtmärkgeenidele tõhus ja nende ekspressioon detekteeritav, uuriti TGF- $\beta$ 1 mõju *TGFBI* mRNA ekspressiooni tasemele (Joonis 4). Tuvastati *TGFBI* ekspressiooni statistiliselt oluline suurenemine TGF- $\beta$ 1 töötlusel 24h, 48h ja 72h ajapunktis, võrreldes mitte stimuleeritud 24h rakkudega (Joonis 4).



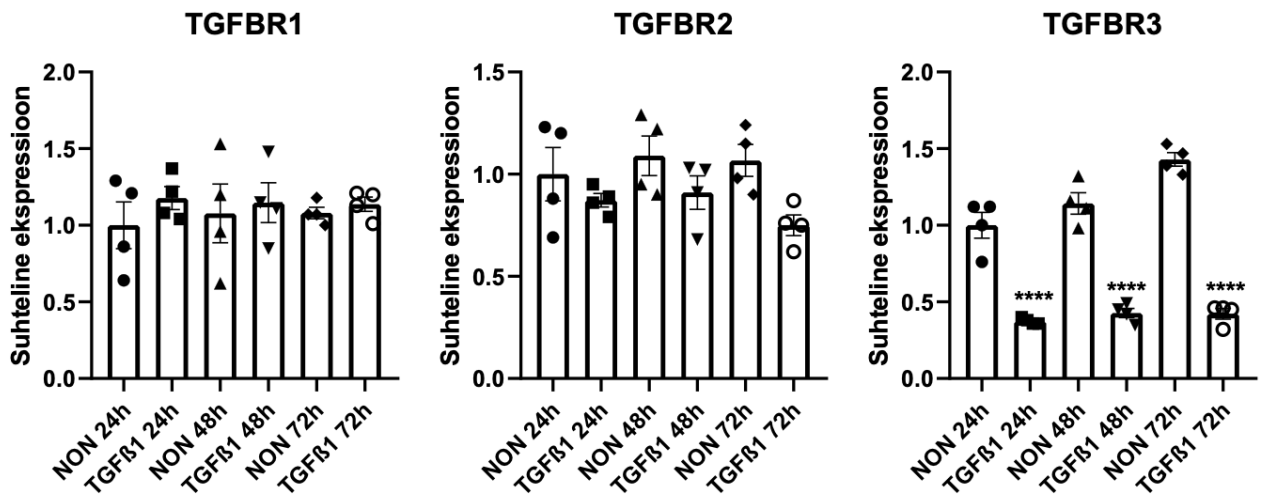
**Joonis 4. *TGFBI* mRNA ekspressioon inimese silma mittepigmenteerunud tsiliaarse epiteeli ODM-2 rakuliinis 24h, 48h ja 72h ajapunktis TGF- $\beta$ 1 stimulatsioonil.** ODM-2 rakke stimuleeriti 24, 48 või 72 tundi TGF- $\beta$ 1-ga, 5ng/mL. Võrdluseks kasutati stimuleerimata rake (NON). Geeniekspressiooni muutusi tuvastati RT-qPCRi abil ja CT väärtused normaliseeriti *EEF1A1* suhtes. Statistiliseks analüüsiks kasutati ühepoolset ANOVA testi, koos Tukey (*Tukey's multiple comparison test*) korrigeerimisega. \*\*\*\* P < 0.0001.

Järgmisena uuriti kuidas TGF- $\beta$ 1 mõjutab ODM-2 rakuliinis omaenda või teiste alternatiivsete isovormide ekspressiooni. Analüüsiti vastavalt sihtmärkgeenide *TGFB1*, *TGFB2* ja *TGFB3* mRNA ekspressioonitaseme muutusi (Joonis 5). TGF- $\beta$ 1 põhjustas *TGFB1* ja *TGFB2* ekspressiooni statistiliselt olulist suurenemist 24h, 48h ja 72h ajapunktis, võrreldes mitte stimuleeritud 24h rakkudega. *TGFB3* puhul statistiliselt olulist ekspressiooni muutust võrreldes kontrolliga ei esinenud (Joonis 5).



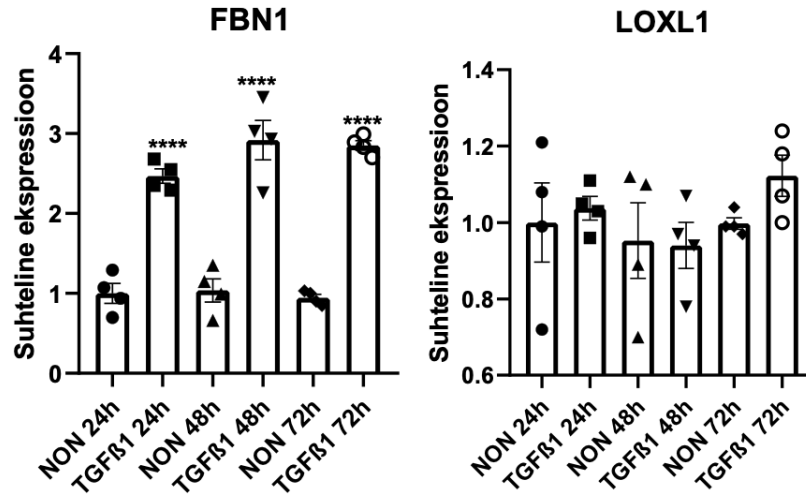
**Joonis 5. TGF- $\beta$  isovormide mRNA ekspressioon inimese silma mittepigmenteerunud tsiliaarse epiteeli ODM-2 rakuliinis 24h, 48h ja 72h ajapunktil TGF- $\beta$ 1 stimulatsioonil.** ODM-2 rakke stimuleeriti 24, 48 või 72 tundi TGF- $\beta$ 1-ga, 5ng/mL. Võrdluseks kasutati stimuleerimata rake (NON). Geeniekspressiooni muutusi tuvastati RT-qPCRi abil ja CT väärtused normaliseeriti *EEF1A1* suhtes. Statistiliseks analüüsiks kasutati ühepoolset ANOVA testi, koos Turkey (*Tukey's multiple comparison test*) korrigeerimisega. \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*\*  $P < 0.0001$ .

Järgnevalt kontrolliti kuidas TGF- $\beta$  retseptor geenide mRNA ekspressioon inimese ODM-2 rakuliinis TGF- $\beta$ 1 stimulatsioonile vastab (Joonis 6). ODM-2 rakuliinis mõõdetud TGF- $\beta$  retseptori isovormide puhul leiti mRNA ekspressioonis statistiliselt oluline muutus võrreldes 24h töötlemata rakkudega ainult *TGFBR3* puhul, kus TGF- $\beta$ 1 põhjustas *TGFBR3* ekspressiooni taseme vähenemist (Joonis 6). Teiste isovormide puhul ei tuvastatud statistiliselt olulist muutust geeniekspressiooni tasemes (Joonis 6).



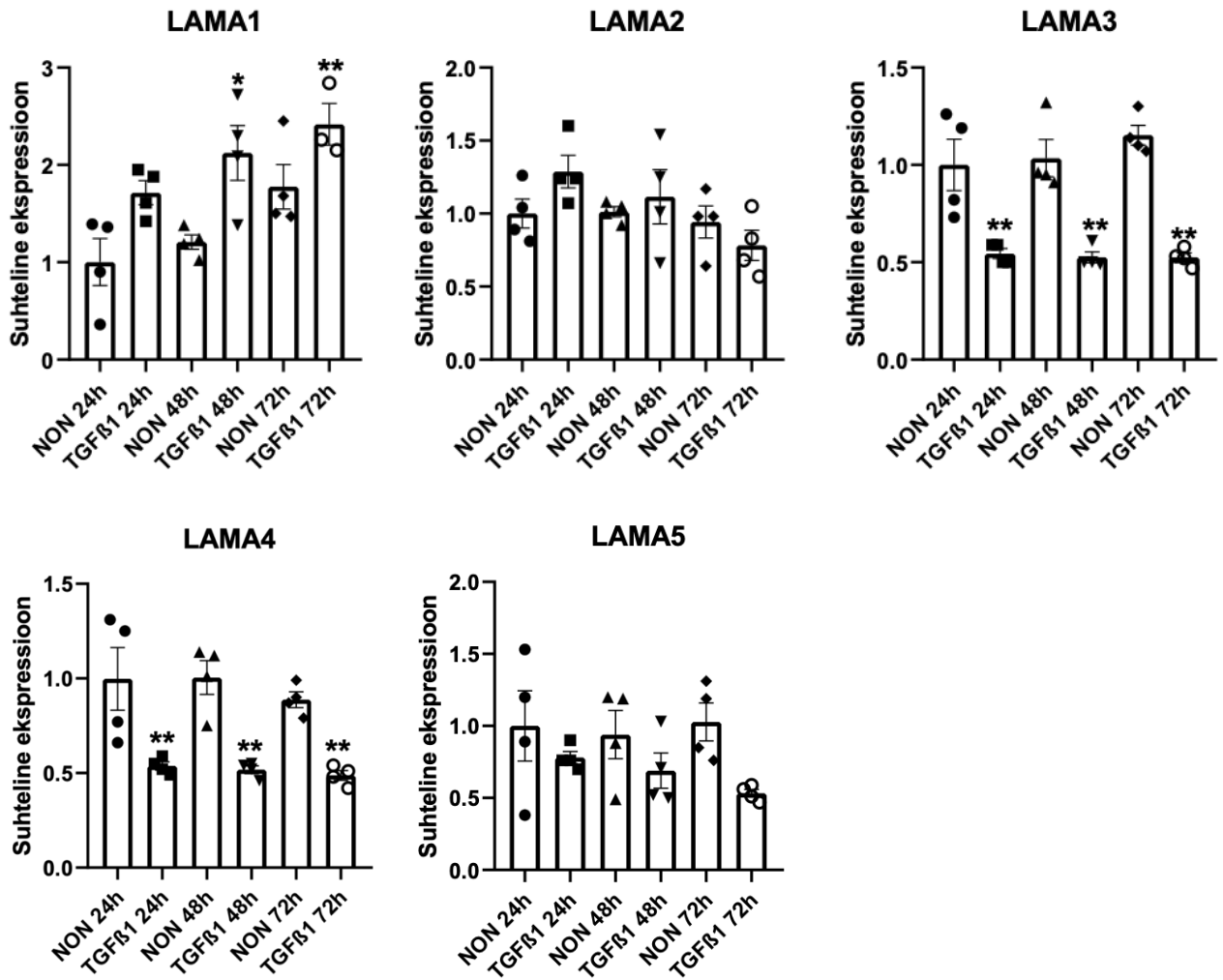
**Joonis 6.** *TGFBR* isovormide mRNA ekspressioon inimese silma mittepigmenteerunud tsiliaarse epiteeli ODM-2 rakuliinis 24h, 48h ja 72h ajapunktil *TGFβ1* stimulatsioonil. ODM-2 rakke stimuleeriti 24, 48 või 72 tundi TGF-β-ga 5ng/mL. Võrdluseks kasutati stimuleerimata rake (NON). Geeniekspressiooni muutusi tuvastati RT-qPCRi abil ja CT väärtused normaliseeriti *EEF1A1*. Statistiliseks analüüsiks kasutati ühepoolset ANOVA testi koos Tukey (*Tukey's multiple comparison test*) korrigeerimisega. \*\*\*\* P < 0.0001.

Järgmisena kontrolliti TGF-β1 mõju XFS puhul oluliste markergeenide *FBNI* ja *LOXLI* ekspressiooni mõjutamises (Joonis 7). *FBNI* mRNA ekspressioonitase oli kõigis ajapunktides statistiliselt oluliselt suurenenud TGF-β1 töötuse korral, võrreldes mittestimuleeritud 24h rakkudega (Joonis 7). *LOXLI* mRNA tasemete muutustes statistiliselt olulisi erinevusi ei leitud (Joonis 7).



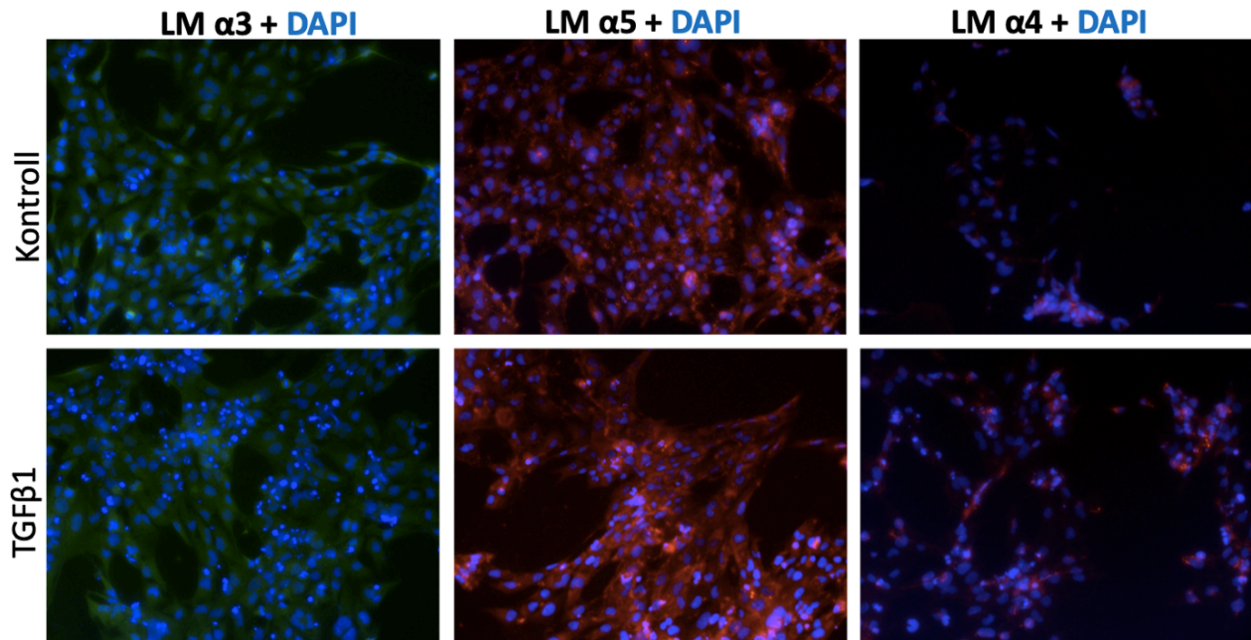
**Joonis 7. *FBN1* ja *LOXL1* mRNA ekspressioon inimese silma mittepigmenteerunud tsiliaarse epiteeli ODM-2 rakuliinis 24h, 48h ja 72h ajapunktil TGF-β1 stimulatsioonil.** ODM-2 rakke stimuleeriti 24, 48 või 72 tundi TGF-β1-ga 5ng/mL. Võrdluseks kasutati stimuleerimata rakke. Geeniekspressiooni muutusi tuvastati RT-qPCRi abil ja CT väärtused normaliseeriti *EEF1A1* suhtes. Statistiliseks analüüsiks kasutati ühepoolset ANOVA testikoos Tukey (*Tukey's multiple comparison test*) korrigeerimisega. \*\*\*\* P < 0.0001.

Varasemates töödes on näidatud, et XFS haiguse korral silmas välja sadenenud materjalis esineb laminiini (Sharma *et al.*, 2018; Konstas *et al.*, 1991), kuid pole täpsustatud, mis laminiini isovormidega on tegemist. Samas on teada ka, et tsiliaarepiteeli basaalmembraanis, mis vahetult külgneb mittepigmenteerunud tsiliaarse epiteeli rakkudega esineb laminiini (Konstas *et al.*, 1990; Marshall *et al.*, 1992). Seetõttu analüüsiti antud uurimistöös, kuidas muutuvad laminiinide alfa-ahelate (1-5) mRNA ekspressioonitasemed ODM-2 rakuliinis, TGF-β1 stimulatsioonil (Joonis 8). Leiti, et *LAMA1*, *LAMA3* ja *LAMA4* on statistiliselt oluliselt ekspresseeritud TGF-β1 stimulatsioonil, võrreldes mittestimuleeritud 24h rakkudega. *LAMA1* puhul tuvastati ekspressiooni tõus 24h, 48h ja 72h ajapunktis, ning on huvitav täheldada, et tõusis ka töötlemata rakkude ekspressioonitase (Joonis 8). *LAMA3* ja *LAMA4* geeniekspressioonis ei olnud TGF-β1 töötamise korral märgata erinevusi ajapunktide vahel ja kõigis ajapunktides oli geeniekspressioon madalam võrreldes töötlemata 24h rakkudega (Joonis 8). *LAMA2* ja *LAMA5* puhul ei esinenud statistiliselt olulist ekspressiooni muutusi TGF-β1 stimulatsiooni korral, ent *LAMA2* 24h ajapunktis võis täheldada tendentsi ekspressiooni suuremise suunas võrreldes sama ajapunkti töötlemata rakkudega ning *LAMA5* korral võis täheldada tendentsi vähenemise suunas TGF-β1 töötamise korral 72h ajapunktis (Joonis 8).



**Joonis 8. Laminiinide  $\alpha$ -ahelate mRNA ekspressioon inimese silma mittepigmenteerunud tsiliaarse epiteeli ODM-2 rakuliinis 24h, 48h ja 72h ajapunktil TGF- $\beta$ 1 stimulatsioonil.** ODM-2 rakke stimuleeriti 24, 48 või 72 tundi TGF- $\beta$ 1-ga 5ng/mL. Võrdlusena kasutati stimuleerimata rakke. Geeniekspressiooni muutusi tuvastati RT-qPCRi abil ja CT väärtused normaliseeriti *EEF1A1* suhtes. Statistiliseks analüüsiks kasutati ühepoolset ANOVA testi koos Tukey (*Tukey's multiple comparison test*) korrigeerimisega. \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ .

Tuvastamaks laminiinide  $\alpha$ -ahelate isovorme valgu tasemel ODM-2 rakuliinis viidi läbi immunofluorestsentsanalüüs, kasutades 72h TGF- $\beta$ 1 töötlust. Tuginedes mRNA ekspressioonitasemete analüüsile (Joonis 8), valiti sihtmärkideks välja laminiinide  $\alpha$ -ahelad 3, 4 ja 5. Immunofluorestsentsmikroskoopia tuvastati  $\alpha$ 3,  $\alpha$ 4 ja  $\alpha$ 5 ekspressioon valgu tasemel ODM-2 rakuliinis (Joonis 9), ent  $\alpha$ 4 korral oli tuvastamismäär väga lähedal mittespetsiifilisele taustsignaalile (Joonis 9 ja Lisa 3).



**Joonis 9. Laminiini  $\alpha$ 3,  $\alpha$ 4 ja  $\alpha$ 5 ahelate tuvastamine immunofluorestsentsmikroskoopiaga. TGF- $\beta$ -ga töödeldud ODM-2 rakud ja töötlemata rakud (Kontroll). Siniselt on värvunud rakutuomad (DAPI), roheliselt ja punaselt on värvunud piirkonnad, kus vastav antikeha on spetsiifiliselt seondunud. Pildid on saadud 20x suurendusega objektiiviga.**

## 2.4. Arutelu

XFS põhjust ei ole täpselt teada, kuid on tuvastatud nii geneetilisi kui valgulisi markereid, mis arvatakse olevat olulised haiguse tekkes (Nazarali *et al.*, 2018; Borrás, 2018). Peamised markerid, mida seostatakse XFS sündroomiga on laminiin, fibronektiin, vitronektiin, entaktiin/nidogeen, elastiin, fibrilliin-1 ja fibuliin-2 (Sharma *et al.*, 2018) ning lisaks on haigusega seostatud ka geneetilisi markereid nagu *LOXLI* (Thorleifsson, G. *et al.* 2007). Varasemad uuringud on leidnud, et XFS patsientide silma vesivedelikes on ülesreguleeritud nii latentset kui aktiivset TGF- $\beta$  vormid (Ozaki, 2018; Schlötzer-Schrehardt *et al.*, 2001) ning TGF- $\beta$ 1 on pakutud kui üks võimalik regulaator seoses XFS-ga. On välja pakutud, et suurenenud kasvufaktori aktiivsus, eriti TGF- $\beta$ 1, võib olla seotud XFM-ide tootmisega, mis põhjustab suurenenud väljavoolutakistust (Koliakos *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2021). XFM ladestustes on XFS-i patsientide silmadest leitud laminiini (Konstas *et al.*, 1990), kuid pole täpsustatud mis isovormidega on tegemist. Kuna varasemalt pole uuritud TGF- $\beta$ 1 poolt vahendatud muudatusi laminiinidie geeniekspressioonile XFS puhul olulises rakutüübis, mittepigmenteerunud tsilaarses epiteelis, ega pole täpsustatud milliste laminiini isovormidega on tegemist, uuriti antud bakalaureusetöös, kuidas on mõjutatud laminiini  $\alpha$ -ahelate ekspressioon ODM-2 rakuliinis.

Just laminiini  $\alpha$ -ahelad on funktsionaalselt kõige olulisemad ja annavad ka parima ülevaate potentsiaalsetest laminiini isovormidest, mida kindlates kudedes ekspresseeritakse (Miner *et al.* 1997). Laminiinide roll XFS-i puhul ei ole teada, kuid laminiini  $\alpha$ 1 ahela suurenenud ekspressiooni, mis antud bakalaureusetöö puhul oli TGF- $\beta$ 1 stimulatsiooniga ülesreguleeritud, on täheldatud ka teiste põletikuliste haiguste puhul (Spenlé *et al.*, 2014). Laminiini  $\alpha$ 3 puhul on leitud, et laminiini  $\alpha$ 3 ahela vähenenud ekspressioon suurendab kasvaja invasiooni (Caley *et al.*, 2021 ) ning käesolevas töös tuvastatud *LAMA3* ekspressiooni vähenemine, mis võib viidata, laminiini  $\alpha$ 3 ahel avaldab sarnast mõju silma epiteeli komponentidele. In vivo uuringud, milles kasutati LM- $\alpha$ 4 ahela puudulikkusega hiiri, on näidanud neutrofiilide funktsiooni halvenemist vastusena põletikule, kus antud laminiini ahel oli vajalik neutrofiilide veresoonest läbi migreerumiseks (Wondimu *et al.*, 2004). Kuna antud bakalaureusetöös oli TGF- $\beta$ 1 mõjutuse korral *LAMA4* mRNA ekspressioon vähenenud võib see osutada, et  $\alpha$ 4 laminiinide ekspressioon on tsilaarepiteelis põletiku korral vähenenud ja see võib omakorda reguleerida sealse basaalmembraani omadusi immuunrakkude migreerumisel. Pigmenteerunud tsilaarse epiteeli puhul on eelnevalt näidatud selle olulist immuunregulatoorset rolli (Yoshida *et al.*, 2000) kuid pole teada, kas ja kuidas võiks selles osaleda antud bakalaureusetöös fookuseks olnud mittepigmenteeritud epiteel. Basaalmembraanile

iseloomulike laminiin  $\alpha 5$  ja laminiin  $\alpha 2$  ahelate puhul ei toimunud olulist geeniekspressiooni muutust mRNA tasemetes ODM-2 rakkudes, kuigi  $\alpha 5$  puhul võis täheldada sarnast trendi nagu  $\alpha 4$  korral. Silma vere-vesi barjääri kahjustused, võivad kaasa aidata võimalike silmahaiguste patofüsioloogiale, võimaldades vere kaudu levivatel molekulidel ja immuunrakkudel lekkida silma eesmise segmenti (Coca-Prados, 2014). Vaja on täiendavaid uuringuid, et paremini mõista, kuidas laminiinid silma tsilaarepiteelis toimivad.

Rakkudevaheline ja rakk-maatriks signaalimine on oluline kudede homöostaasi säilitamiseks ja rakkude reaktsioonide reguleerimiseks ECM-i muutuste korral (Brizzi *et al.*, 2012). Kuna ECM võib olla oluline reguleerija kasvufaktorite kättesaadavusel (Horiguchi *et al.*, 2012) ja kasvufaktorid nagu TGF- $\beta$  mõjuvad rakkudele läbi vastavate raku retseptorite, analüüsiti antud bakalaureusetöös ka TGF- $\beta$  retseptorite ekspresioonimuutusi TGF- $\beta$  aktiivse toimimise korral. Haiguste korral nagu XFS on pakutud, et TGF- $\beta$  signaalirada võibolla liigselt aktiivne (Borrás, 2018), seega on oluline mõista, kuidas vahendatakse antud signaali.

Kolmest TGF- $\beta$  retseptori isovormist ilmnes *TGFBR3* puhul olulisi ekspresioonimuutusi TGF- $\beta 1$  stimulatsioonis, mida pole varem dokumenteeritud. See võib tähendada, et kõrgeenenud TGF- $\beta 1$  olemasolu võib potentsiaalselt suurendada TGF- $\beta$  signaali ülekannet, kuna varasemalt on näidatud, et *TGFBR3* takistab signaaliülekanne rada, blokeerides TGF- $\beta$  retseptoritele seondumist (Eickelberg *et al.* 2002). ODM-2 rakkudes ei toimunud *TGFBR1* ja *TGFBR2* ekspresioonis TGF- $\beta 1$  stimulatsioonil märgatavaid muutusi.

On viiteid, et põletikuline keskkond indutseerib TGF- $\beta$  isovormide ekspresiooni XFS patsientides (Borrás, 2018). Antud bakalaureusetöö uuriti ODM-2 rakkudes TGF- $\beta$  isovormide geeniekspressiooni TGF- $\beta 1$  stimulatsiooni korral. TGF- $\beta 1$  indutseeris *TGFB1* ja *TGFB2*, kuid mitte *TGFB3* ekspresiooni ODM-2 rakuliinis. Tulemused on kooskõlas varasema uuringuga (Zenkel *et al.*, 2010), kus TGF- $\beta 1$  asemel kasutati teist põletikulist stiimulat interleukin-6 (IL6), mis muu hulgas indutseeris ka *TGFB1* ekspresiooni. Nende põletikuliste markerite osalus on seostatud suurenenud oksüdatiivne stressiga, ning on pakutud välja kui ühe olulise patobioloogilise markerina XFS arengus. TGF- $\beta$  isovormide täpsema funktsiooni kontrollimiseks on vaja täiendavaid molekulaarseid uuringuid.

Käesoleva bakalaureusetöö käigus analüüsiti ka XFS puhul oluliste markerite nagu *FBN1* (fibrilliin-1) ja *LOXLI* ekspresiooni muutust TGF- $\beta 1$  töötuse korral. *Fibrilliin-1* kontrollib aktiivse TGF- $\beta$  vabanemist ECM-ist, piirates selle aktiveerimist (Borrás, 2018) ja mutatsioonid *FBN1* geenis võivad põhjustada TGF- $\beta$  liigset ekspresiooni ECM-is (Kaartinen & Warburton, 2003). Täpne mehhanism, mille abil fibrilliin-1 kontrollib TGF- $\beta 1$  aktiveerimist, pole teada. Antud

bakalaureusetöös tuvastati *FBNI* ekspressiooni suurenemine TGF- $\beta$ 1 stimulatsioonil ja tulemused olid kooskõlas varasemate uuringutega, milles vaadeldi fibriliin-1 ekspressiooni samades rakkudes IL-6 mõjutusel (Zenkel *et al.*, 2010). Kuna fibrilliin-1 on oluline alustala paljudes ECM-i struktuurides, on välja pakutud, et TGF- $\beta$ 1 ebanormaalne aktiveerimine düsfunktsionaalse FBNI korral on seotud patoloogiliste muutustega, kus kaasnevad ECM valkude ebanormaalsed ümberkorraldused ja valgu produktsioon (Chaudhry *et al.*, 2007; Kaartinen and Warburton, 2003). Arvatakse, et kuna basaalmembraaniga seotud komponendid nagu laminiin, nidogeen/entaktiin ja fibronektiin, on lokaliseeritud XFM-i, võib selle produktsiooni põhjustanud olla ka ebanormaalne basaalmembraani metabolism (Schlötzer-Schrehardt *et al.*, 2008). Lisaks on leitud, et ensümaatilistelt aktiivsed komponendid, nagu elastogeneesi ja elastsete kiudude homöostaasi võtmeensüüm *LOXLI* ning rakuväline *chaperone* klusteriin (*clusterin*), on XFM peamised komponendid (Schlötzer-Schrehardt *et al.*, 2008) Need leiud viitavad ebanormaalse ristsidumise ja valkude väärvoltimise protsesside kaasamisele, mis põhjustavad XFM ladestuste agregatsiooni ja kogunemist. Zenkel *et al.*, 2014 ja Sethi jt, 2011 kirjeldasid seost LOXL-1 ja XFS vahel, eriti elastsete kiudude häire XFS varases staadiumis, kus LOXL-1 kolokaliseerus elastiini ja fibrilliin-1-ga. Antud bakalaureusetöös teostatud eksperimentidesi avaldanud TGF- $\beta$ 1 mõju *LOXLI* geeniekspresioonile. On välja pakutud hüpotees, et LOXL-1 vähenenud funktsionaalsus võib põhjustada XFS-silmade stabiilsuse ja biomehaaniliste omaduste vähenemist, suurendades nägemisnärv kahjustuse tõenäosust (Zenkel *et al.*, 2014).

Kuigi antud bakalaureusetöös tuvastati esmakordselt ekspressioonimuutusi laminiinide  $\alpha$ -ahelate geenides LAMA1, LAMA3 ja LAMA4 ning ka  $\alpha$ 3,  $\alpha$ 4 ja  $\alpha$ 5 esinemine valgutasel mittepigmenteerunud tsiliaarse epiteeli rakuliinis ODM-2, oleks edasisteks kvantitatiivseteks uuringuteks valgu tasemel vaja teostada pikemaajalisemaid mõjutamisi TGF- $\beta$ 1 kasvufaktoriga. Antud bakalaureusetöö tulemused tõstasid uusi küsimusi seoses erinevate laminiinide funktsiooniga silma tsiliaarses epiteelis ning antud teema edasine uurimine võib kunagi aidata paremini mõista XFS haigusega kaasnevaid muutusi ECM-is ja aidata kaudset kaasa ka uute raviviiside väljatöötamisele.

# KOKKUVÕTE

Eksfoliatsiooni sündroom (XFS) on kompleksne ja süsteemne east sõltuv haigus, mida iseloomustab eksfoliatiivse fibrillaarse materjali (XFM) liigne tootmine ja kuhjumine silma eesmise segmenti (Ritch ja Schlötzer-Schrehardt, 2001). XFS-i tekkepõhjused ei ole täpselt teada, kuid mitmed eelnevad uuringud on leitud, et XFS-võib olla seotud erinevate põletikuliste protsessidega (Küchle *et al.*, 1995; Zenkel *et al.*, 2005). XFS tuvastatakse tavaliselt ebanormaalse, kõõma laadse, fibrillaarse materjali kuhjumise tõttu silma eesmises segmentis ning selle haigusega kaasneb suurenenud glaukoomi haigestumise risk (Schlötzer-Schrehardt *et al.*, 1992). TGF- $\beta$ 1 tsütokiin, mis on XFS patsientide silma vesivedelikes kõrgelt ekspresseeritud, on välja pakutud kui oluline faktor reguleerimaks XFM-i ladestumist (Borrás, 2018). Peamised XFM komponendid, mida on kirjeldatud XFS silmades, on laminiin, fibronektiin, vitronektiin, entaktiin/nidogeen, elastiin, fibrilliin-1 ja fibuliin-2 (Sharma *et al.*, 2018). Laminiinide isovorme pole XFM seast täpsustatud.

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli uurida kas ja kuidas muutub laminiinide  $\alpha$ -ahelate (*LAMA1*, *LAMA2*, *LAMA3*, *LAMA4* ja *LAMA5*) geeniekspressioon tsütokiini TGF- $\beta$ 1-ga stimuleeritud immortaliseeritud inimese silma mittepigmenteerunud tsiliaarse epiteeli ODM-2 rakuliinis. Antud bakalaureusetöö eksperimentaalse osa tulemusena selgus, et TGF- $\beta$ 1 tõstab laminiini  $\alpha$ -ahela *LAMA1* geeniekspressiooni ning statistiliselt olulisi erinevusi tuvastati 48h ja 72h ajapunktis. TGF- $\beta$ 1 stimulatsioon ODM-2 rakuliinis vähendas *LAMA3* ja *LAMA4* ekspressiooni. Samuti leiti, et ODM-2 rakuliinis TGF- $\beta$ 1 mõjul vähenes TGF- $\beta$  retseptori *TGFBR3* ekspressioon. Samas tuvastati, et TGF- $\beta$ 1 suurendas *TGFBI*, *TGFB1* ja *TGFB2* ekspressiooni kui ka *FBN1* ekspressiooni.

Antud bakalaureusetöö tulemused viitavad, et TGF- $\beta$ 1 omab mõju erinevate laminiinide ekspressioonile immortaliseeritud inimese silma mittepigmenteerunud tsiliaarse epiteeli ODM-2 rakuliinis. Edasised uuringud vastavate laminiinide funktsiooni teadasaamiseks XFS kontekstis võiksid aidata paremini mõista muutusi XFS silmas ning võivad aidata leida uusi raviviise selle haiguse puhul.

## Cytokine TGF- $\beta$ 1-mediated changes in the expression of laminins in the ODM-2 cell line

Liis Hirvesoo

### SUMMARY

Exfoliation syndrome (XFS), also known as pseudoexfoliation (Dvorak-Theobald, 1954), is a complex and systemic age-related disease, characterized by the production and accumulation of fibrillar extracellular material in various tissues of the eye (Ritch and Schlötzer-Schrehardt, 2001). The exact causes of XFS is not known, but recently published works have found that XFS may be related to various inflammatory processes (Küchle *et al.*, 1995; Schlötzer-Schrehardt ja Naumann, 2006; Zenkel *et al.*, 2005). XFS is usually identified by the accumulation of abnormal fibrillar material in the anterior segment of the eye and is associated with an increased risk of glaucoma development (Schlötzer-Schrehardt *et al.*, 1992). TGF- $\beta$ 1 cytokine is considered as an important factor to regulate exfoliative material (XFM) deposition (Borrás, 2018). The major extracellular proteins found in deposited XFM are laminin, fibronectin, vitronectin, entactin/nidogen, elastin, fibrillin-1 and fibulin-2 (Sharma *et al.*, 2018).

Laminins are glycoproteins composed of three polypeptide chains  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  linked by disulfide bonds (Hamill *et al.*, 2009; Aumailley, 2013) and form a crosslike molecule with two or three short arms and one long arm (Tzu and Marinkovich, 2008; Yurchenco *et al.*, 2004; Hamill *et al.*, 2009). Laminins are structural components of basement membranes and are key extracellular matrix (ECM) regulators of cell adhesion, migration, differentiation, and proliferation (Hamill *et al.*, 2009). Little is known about the mechanisms by which laminins are deposited and organized in the ECM (Hamill *et al.*, 2009) and what their role in XFS is. Studies to date have only speculated about the mechanisms of laminins that determine how cells deposit laminin molecules, particularly, the role of cell surface receptors and laminin-binding proteins in regulating this process (Hamill *et al.*, 2009).

The aim of this bachelor's thesis was to investigate whether and how the gene expression of laminin  $\alpha$ -chains (*LAMA1*, *LAMA2*, *LAMA3*, *LAMA4* and *LAMA5*) is affected in the immortalized human eye non-pigmented ciliary epithelium ODM-2 cell line when stimulated by the cytokine TGF- $\beta$ 1, as there are no previous studies on this topic.

The results of the experimental part of this bachelor thesis revealed that TGF- $\beta$ 1 increases the gene expression of the laminin  $\alpha$ -chain *LAMA1*, where statistically significant differences were detected at the 48h and 72h time points. TGF- $\beta$ 1 stimulation in the ODM-2 cell line downregulated the expression of *LAMA3* and *LAMA4*. It was also found that TGF- $\beta$ 1 treatment suppressed the expression of the TGF- $\beta$  receptor *TGFBR3* in the ODM-2 cell line. In addition, TGF- $\beta$ 1 was seen

to upregulate the expression of *TGFBI*, *TGFB1*, and *TGFB2*, as well as the expression of *FBNI*. Based on the results of this bachelor thesis, it was revealed that TGF- $\beta$ 1 can have effect on the expression of different laminins in the immortalized human eye non-pigmented ciliary epithelium ODM-2 cell line. Further experiments are needed to determine the functional importance of different laminins in the context of XFS, which may help to better characterize the changes in eye ECM and point to novel therapeutic options.

# TÄNUSÕNAD

Kõige suurema tänusõna ja lugupidamist väärrib minu juhendaja Martin Pook, kes toetas mind igal sammul ning tutvustas mulle nii huvitavat teemat. Martin on mind õpetanud teaduslikult mõtlema ja on aidanud mul teadusvaldkonna keskkonnas orienteeruda. Suur tänu heade ettepanekute ja igati toetava suhtumise eest. Tänan ka Indrek Teinot, heade paranduste ning näpunäidete eest.

Tahaksin veel tänada meie uurimisgrupi juhti Ana Rebast, kes mind lahkelt oma laborisse vastu võttis ning imeliste inimestega kokku viis. Tänan ka kõiki meie uurimisgrupi liikmeid nende teadmiste ja kogemuste jagamise eest ning positiivse töökeskkonna loomise eest.

Viimaseks tänan oma pere ja sõpru, kes olid minu motivaatorid ja toesambad kui ma seda vajasin.

## KASUTATUD KIRJANDUS

Aasved, H. (1969). The geographical distribution of fibrillopathia epitheliocapsularis, so-called senile exfoliation or pseudoexfoliation of the anterior lens capsule. *Acta ophthalmologica*, 47(3), 792–810.

Aboobakar, I. F., Johnson, W. M., Stamer, W. D., Hauser, M. A. and Allingham, R. R. (2017). Major review: Exfoliation syndrome; advances in disease genetics, molecular biology, and epidemiology. *Experimental eye research*, 154, 88–103.

Abu-Hassan, D. W., Acott, T. S. and Kelley, M. J. (2014). The Trabecular Meshwork: A Basic Review of Form and Function. *Journal of ocular biology*, 2(1).

Armulik, A., Abramsson, A. and Betsholtz, C. (2005). Endothelial/pericyte interactions. *Circulation research*, 97(6), 512–523.

Aström, S. and Lindén, C. (2007). Incidence and prevalence of pseudoexfoliation and open-angle glaucoma in northern Sweden: I. Baseline report. *Acta ophthalmologica Scandinavica*, 85(8), 828–831.

Aumailley, M. (2013). The laminin family. In *Cell Adhesion and Migration* (Vol. 7, Issue 1, pp. 48–55). Taylor and Francis Inc.

Aumailley, M., Bruckner-Tuderman, L., Carter, W. G., ... Yurchenco, P. D. (2005). A simplified laminin nomenclature. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, 24(5), 326–332.

Aung, T., Chan, A. S. and Khor, C. C. (2018). Genetics of Exfoliation Syndrome. *Journal of glaucoma*, 27 Suppl 1, S12–S14.

Barsotti, M. F., Bartels, S. P., Freddo, T. F. and Kamm, R. D. (1992). The source of protein in the aqueous humor of the normal monkey eye. *Investigative ophthalmology & visual science*, 33(3), 581–595.

Beck, K., Dixon, T. W., Engel, J. and Parry, D. A. (1993). Ionic interactions in the coiled-coil domain of laminin determine the specificity of chain assembly. *Journal of molecular biology*, 231(2), 311–323.

Belovay, G. W., Varma, D. K. and Ahmed, I. I. (2010). Cataract surgery in pseudoexfoliation syndrome. *Current opinion in ophthalmology*, 21(1), 25–34.

Berner, D., Hoja, U., Zenkel, M. ... Schlötzer-Schrehardt, U. (2019). The protective variant rs7173049 at *LOXLI* locus impacts on retinoic acid signaling pathway in pseudoexfoliation syndrome. *Human Molecular Genetics*, 28(15), 2531–2548.

Bertolio, M. S., La Colla, A., Carrea, A., ... Dewey, R. A. (2021). A Novel Splice Variant of Human TGF- $\beta$  Type II Receptor Encodes a Soluble Protein and Its Fc-Tagged Version Prevents Liver Fibrosis *in vivo*. *Frontiers in cell and developmental biology*, 9, 690397.

Bill A. (1975). Blood circulation and fluid dynamics in the eye. *Physiological reviews*, 55(3), 383–417.

Bill, A. and Phillips, C. I. (1971). Uveoscleral drainage of aqueous humour in human eyes. *Experimental eye research*, 12(3), 275–281.

Borrás T. (2018). Growth Factors, Oxidative Damage, and Inflammation in Exfoliation Syndrome. *Journal of glaucoma*, 27 Suppl 1(Suppl 1), S54–S60.

Borrás, T. (2014). The cellular and molecular biology of the Iris, an overlooked tissue: The iris and pseudoexfoliation glaucoma. *Journal of Glaucoma*, 23(8), S39–S42.

Brandes, M. E., Mai, U. E., Ohura, K. and Wahl, S. M. (1991). Type I transforming growth factor-beta receptors on neutrophils mediate chemotaxis to transforming growth factor-beta. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 147(5), 1600–1606.

Brizzi, M. F., Tarone, G. and Defilippi, P. (2012). Extracellular matrix, integrins, and growth factors as tailors of the stem cell niche. *Current opinion in cell biology*, 24(5), 645–651.

Byström, B., Virtanen, I., Rousselle, P., Gullberg, D. and Pedrosa-Domellöf, F. (2006). Distribution of laminins in the developing human eye. *Investigative ophthalmology & visual science*, 47(3), 777–785.

Caley, M. P., Martins, V. L., Moore, K., ... O'Toole, E. A. (2021). Loss of the laminin subunit alpha-3 induces cell invasion and macrophage infiltration in cutaneous squamous cell carcinoma. *The British journal of dermatology*, 184(5), 923–934.

Challa, P and Johnson, W. M. (2018). Composition of Exfoliation Material. *Journal of Glaucoma*, 27(7), S29–S31.

Chaudhry, S. S., Cain, S. A., Morgan, A., Dallas, S. L., Shuttleworth, C. A. and Kielty, C. M. (2007). Fibrillin-1 regulates the bioavailability of TGFbeta1. *The Journal of cell biology*, 176(3), 355–367.

Chen, X., Wang, H., Liao, H. J., ... Pozzi, A. (2014). Integrin-mediated type II TGF-β receptor tyrosine dephosphorylation controls SMAD-dependent profibrotic signaling. *The Journal of clinical investigation*, 124(8), 3295–3310.

Chono, I., Miyazaki, D., Miyake, H., Komatsu, N., Ehara, F., Nagase, D., Kawamoto, Y., Shimizu, Y., Ideta, R. and Inoue, Y. (2018). High interleukin-8 level in aqueous humor is associated with poor prognosis in eyes with open angle glaucoma and neovascular glaucoma. *Scientific Reports*, 8(1).

Chowdhury, U. R., Madden, B. J., Charlesworth, M. C. and Fautsch, M. P. (2010). Proteome analysis of human aqueous humor. *Investigative ophthalmology & visual science*, 51(10), 4921–4931.

Coca-Prados M. (2014). The blood-aqueous barrier in health and disease. *Journal of glaucoma*, 23(8 Suppl 1), S36–S38.

Cocciolone, A. J., Hawes, J. Z., Staiculescu, M. C., Johnson, E. O., Murshed, M. and Wagenseil, J. E. (2018). Elastin, arterial mechanics, and cardiovascular disease. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 315(2), H189–H205.

Costagliola, C., dell'Omo, R., Agnifili, L., Bartollino, S., Fea, A. M., Uva, M. G., Zeppa, L. and Mastropasqua, L. (2020). How many aqueous humor outflow pathways are there?. *Survey of ophthalmology*, 65(2), 144–170.

Danysh, B. P. and Duncan, M. K. (2009). The lens capsule. In *Experimental Eye Research* (Vol. 88, Issue 2, pp. 151–164).

de Maria, A., Zientek, K. D., David, L. L., ... Bassnett, S. (2021). Compositional Analysis of Extracellular Aggregates in the Eyes of Patients with Exfoliation Syndrome and Exfoliation Glaucoma. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 62(15).

Delamere, N. A. (2005). Ciliary Body and Ciliary Epithelium. In *Advances in Organ Biology* (Vol. 10, pp. 127–148).

Dismuke, W. M., Challa, P., Navarro, I., Stamer, W. D. and Liu, Y. (2015). Human aqueous humor exosomes. *Experimental Eye Research*, 132, 73–77.

Domogatskaya, A., Rodin, S. and Tryggvason, K. (2012). Functional diversity of laminins. *Annual review of cell and developmental biology*, 28, 523–553.

Drewry, M. D., Challa, P., Kuchtey, J. G., Navarro, I., Helwa, I., Hu, Y., Mu, H., Stamer, W. D., Kuchtey, R. W. and Liu, Y. (2018). Differentially expressed microRNAs in the aqueous humor of patients with exfoliation glaucoma or primary open-angle glaucoma. *Human Molecular Genetics*, 27(7), 1263–1275.

Durbeej, M. (2010). Laminins. *Cell and tissue research*, 339(1), 259–268.

Dvorak-Theobald, G. (1954). Pseudo-exfoliation of the lens capsule: relation to true exfoliation of the lens capsule as reported in the literature and role in the production of glaucoma capsulocuticulare. *American journal of ophthalmology*, 37(1), 1–12.

Eickelberg, O., Centrella, M., Reiss, M., Kashgarian, M. and Wells, R. G. (2002). Betaglycan inhibits TGF-beta signaling by preventing type I-type II receptor complex formation. Glycosaminoglycan modifications alter betaglycan function. *The Journal of biological chemistry*, 277(1), 823–829.

Elhawy, E., Kamthan, G., Dong, C. Q. and Danias, J. (2012). Pseudoexfoliation syndrome, a systemic disorder with ocular manifestations. *Human genomics*, 6(1), 22.

Esko, J. D., Kimata, K. and Lindahl, U. (2009). Proteoglycans and Sulfated Glycosaminoglycans. In A. Varki (Eds.) et. al., *Essentials of Glycobiology*. (2nd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Falk, M., Ferletta, M., Forsberg, E., & Ekblom, P. (1999). Restricted distribution of laminin alpha 1 chain in normal adult mouse tissues. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, 18(6), 557–568.

Ferreira, S. M., Lerner, S. F., Brunzini, R., Evelson, P. A. and Llesuy, S. F. (2004). Oxidative stress markers in aqueous humor of glaucoma patients. *American journal of ophthalmology*, 137(1), 62–69.

Ferreira, S. M., Lerner, S. F., Brunzini, R., Evelson, P. A. and Llesuy, S. F. (2009). Antioxidant status in the aqueous humour of patients with glaucoma associated with exfoliation syndrome. *Eye (London, England)*, 23(8), 1691–1697.

Forsius, H. (1979). Prevalence of pseudoexfoliation of the lens in Finns, Lapps, Icelanders, Eskimos, and Russians. *Transactions of the ophthalmological societies of the United Kingdom*, 99(2), 296–298.

Frantz, C., Stewart, K. M., and Weaver, V. M. (2010). The extracellular matrix at a glance. In *Journal of Cell Science* (Vol. 123, Issue 24, pp. 4195–4200).

Freddo T. F. (1993). The Glenn A. Fry Award Lecture 1992: aqueous humor proteins: a key for unlocking glaucoma?. *Optometry and vision science : official publication of the American Academy of Optometry*, 70(4), 263–270.

Gao, C., Lin, X., Fan, F., Liu, X., Wan, H., Yuan, T., Zhao, X., and Luo, Y. (2022). Status of higher TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 2 levels in the aqueous humour of patients with diabetes and cataracts. *BMC Ophthalmology*, 22(1), 156.

Garweg, J. G., Zandi, S., Gerhardt, C. and Pfister, I. B. (2017). Isoforms of TGF- $\beta$  in the aqueous humor of patients with pseudoexfoliation syndrome and a possible association with the long-term stability of the capsular bag after cataract surgery. *Graefes archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie*, 255(9), 1763–1769.

Garweg, J. G., Zandi, S., Pfister, I. B., Skowronska, M. and Gerhardt, C. (2017). Comparison of cytokine profiles in the aqueous humor of eyes with pseudoexfoliation syndrome and glaucoma. *PLoS ONE*, 12(8).

Gayathri, R., Coral, K., Sharmila, F., Sripriya, S., Sripriya, K., Manish, P., Shantha, B., Ronnie, G., Vijaya, L. and Narayanasamy, A. (2016). Correlation of Aqueous Humor Lysyl Oxidase Activity with TGF- $\beta$  Levels and *LOXLI* Genotype in Pseudoexfoliation. *Current eye research*, 41(10), 1331–1338.

Gharagozloo, N. Z., Baker, R. H. and Brubaker, R. F. (1992). Aqueous dynamics in exfoliation syndrome. *American journal of ophthalmology*, 114(4), 473–478.

Gloe, T., Riedmayr, S., Sohn, H. Y. and Pohl, U. (1999). The 67-kDa laminin-binding protein is involved in shear stress-dependent endothelial nitric-oxide synthase expression. *The Journal of biological chemistry*, 274(23), 15996–16002.

- Goel, M., Picciani, R. G., Lee, R. K. and Bhattacharya, S. K. (2010). Aqueous humor dynamics: a review. *The open ophthalmology journal*, 4, 52–59.
- Goel, R., Murthy, K. R., Srikanth, S. M., ... Pandey, A. (2013). Characterizing the normal proteome of human ciliary body. *Clinical proteomics*, 10(1), 9.
- Groppe, J., Hinck, C. S., Samavarchi-Tehrani, P., Zubieta, C., Schuermann, J. P., Taylor, A. B., Schwarz, P. M., Wrana, J. L. and Hinck, A. P. (2008). Cooperative assembly of TGF-beta superfamily signaling complexes is mediated by two disparate mechanisms and distinct modes of receptor binding. *Molecular cell*, 29(2), 157–168.
- Hallmann, R., Horn, N., Selg, M., Wendler, O., Pausch, F. and Sorokin, L. M. (2005). Expression and function of laminins in the embryonic and mature vasculature. *Physiological reviews*, 85(3), 979–1000.
- Hamill, K. J., Kligys, K., Hopkinson, S. B. and Jones, J. C. (2009). Laminin deposition in the extracellular matrix: a complex picture emerges. *Journal of cell science*, 122(Pt 24), 4409–4417.
- Hamill, K. J., Langbein, L., Jones, J. C. and McLean, W. H. (2009). Identification of a novel family of laminin N-terminal alternate splice isoforms: structural and functional characterization. *The Journal of biological chemistry*, 284(51), 35588–35596.
- Hariyanto, N. I., Yo, E. C. and Wanandi, S. I. (2021). Regulation and Signaling of TGF- $\beta$  Autoinduction. *International journal of molecular and cellular medicine*, 10(4), 234–247.
- Heldin, C. H. and Moustakas, A. (2016). Signaling Receptors for TGF- $\beta$  Family Members. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 8(8), a022053.
- Henry, M. D., Satz, J. S., Brakebusch, C., Costell, M., Gustafsson, E., Fässler, R., and Campbell, K. P. (2001). Distinct roles for dystroglycan, beta1 integrin and perlecan in cell surface laminin organization. *Journal of cell science*, 114(Pt 6), 1137–1144.
- Hirani, R., Hanssen, E. and Gibson, M. A. (2007). LTBP-2 specifically interacts with the amino-terminal region of fibrillin-1 and competes with LTBP-1 for binding to this microfibrillar protein. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, 26(4), 213–223.
- Hirvelä, H., Luukinen, H. and Laatikainen, L. (1995). Prevalence and risk factors of lens opacities in the elderly in Finland. A population-based study. *Ophthalmology*, 102(1), 108–117.
- Horiguchi, M., Ota, M. and Rifkin, D. B. (2012). Matrix control of transforming growth factor- $\beta$  function. *Journal of biochemistry*, 152(4), 321–329.
- Huang, T., Schor, S. L., & Hinck, A. P. (2014). Biological activity differences between TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 3 correlate with differences in the rigidity and arrangement of their component monomers. *Biochemistry*, 53(36), 5737–5749.
- Kaartinen, V. and Warburton, D. (2003). Fibrillin controls TGF-beta activation. *Nature genetics*, 33(3), 331–332.

Kaljurand, K. and Teesalu, P. (2010). Prevalence of exfoliation syndrome in Estonia. *European journal of ophthalmology*, 20(6), 1012–1017.

Kammerer, R. A., Antonsson, P., Schulthess, T., Fauser, C. and Engel, J. (1995). Selective chain recognition in the C-terminal alpha-helical coiled-coil region of laminin. *Journal of molecular biology*, 250(1), 64–73.

Kels, B. D., Grzybowski, A. and Grant-Kels, J. M. (2015). Human ocular anatomy. *Clinics in Dermatology*, 33(2), 140–146.

Khalef, N., Labib, H., Helmy, H., Abd El Hamid, M., Moemen, L. and Fahmy, I. (2017). Levels of cytokines in the aqueous humor of eyes with primary open angle glaucoma, pseudoexfoliation glaucoma and cataract. *Electronic Physician*, 9(2), 3833–3837.

Kissin, E. Y., Lemaire, R., Korn, J. H. and Lafyatis, R. (2002). Transforming growth factor beta induces fibroblast fibrillin-1 matrix formation. *Arthritis and rheumatism*, 46(11), 3000–3009.

Kiyozumi, D., Nakano, I., Sato-Nishiuchi, R., Tanaka, S. and Sekiguchi, K. (2020). Laminin is the ECM niche for trophoblast stem cells. *Life science alliance*, 3(2), e201900515.

Kleinman, H. K., Cannon, F. B., Laurie, G. W., Hassell, J. R., Aumailley, M., Terranova, V. P., Martin, G. R. and DuBois-Dalcq, M. (1985). Biological activities of laminin. *Journal of cellular biochemistry*, 27(4), 317–325.

Kohno, T., Sorgente, N., Ishibashi, T., Goodnight, R., & Ryan, S.J. (1987). Immunofluorescent studies of fibronectin and laminin in the human eye. *Investigative ophthalmology & visual science*, 28 3, 506-14.

Koliakos, G. G., Konstas, A. G., Schlötzer-Schrehardt, U., Hollo, G., Katsimbris, I. E., Georgiadis, N. and Ritch, R. (2003). 8-Isoprostaglandin F2a and ascorbic acid concentration in the aqueous humour of patients with exfoliation syndrome. *The British journal of ophthalmology*, 87(3), 353–356.

Koliakos, G. G., Schlötzer-Schrehardt, U., Konstas, A. G., Bufidis, T., Georgiadis, N. and Dimitriadou, A. (2001). Transforming and insulin-like growth factors in the aqueous humour of patients with exfoliation syndrome. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie*, 239(7), 482–487.

Konstas, A. G., Marshall, G. E. and Lee, W. R. (1990). Immunogold localisation of laminin in normal and exfoliative iris. *The British journal of ophthalmology*, 74(8), 450–457.

Konstas, A. G., Marshall, G. E. and Lee, W. R. (1991). Iris vasculopathy in exfoliation syndrome. An immunocytochemical study. *Acta ophthalmologica*, 69(4), 472–483.

Küchle, M., Nguyen, N. X., Hannappel, E. and Naumann, G. O. (1995). The blood-aqueous barrier in eyes with pseudoexfoliation syndrome. *Ophthalmic research*, 27 Suppl 1, 136–142.

Lawler, S., Feng, X. H., Chen, R. H., Maruoka, E. M., Turck, C. W., Griswold-Prenner, I. and Derynck, R. (1997). The type II transforming growth factor-beta receptor autophosphorylates not only on serine and threonine but also on tyrosine residues. *The Journal of biological chemistry*, 272(23), 14850–14859.

Lerner, N., Avissar, S. and Beit-Yannai, E. (2017). Extracellular vesicles mediate signaling between the aqueous humor producing and draining cells in the ocular system. *PLoS ONE*, 12(2).

Li, X., He, J. and Sun, J. (2021). *LOXLI* gene polymorphisms are associated with exfoliation syndrome/exfoliation glaucoma risk: An updated meta-analysis. In *PLoS ONE* (Vol. 16, Issue 4 April 2021). Public Library of Science.

Li, Z. Y., Streeten, B. W. and Wallace, R. N. (1988). Association of elastin with pseudoexfoliative material: an immunoelectron microscopic study. *Current eye research*, 7(12), 1163–1172.

Lindberg J. G. (1989). Clinical investigations on depigmentation of the pupillary border and translucency of the iris in cases of senile cataract and in normal eyes in elderly persons. *Acta ophthalmologica. Supplement*, 190, 1–96.

Liton, P. B., Li, G., Luna, C., Gonzalez, P. and Epstein, D. L. (2009). Cross-talk between TGF-beta1 and IL-6 in human trabecular meshwork cells. *Molecular vision*, 15, 326–334.

Liu, X., Zhao, Y., Gao, J., Pawlyk, B., Starcher, B., Spencer, J. A., Yanagisawa, H., Zuo, J., & Li, T. (2004). Elastic fiber homeostasis requires lysyl oxidase-like 1 protein. *Nature genetics*, 36(2), 178–182.

Llobet, A., Gasull, X., & Gual, A. (2003). Understanding trabecular meshwork physiology: a key to the control of intraocular pressure?. *News in physiological sciences : an international journal of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society*, 18, 205–209.

Loeys, B. L., Gerber, E. E., Riegert-Johnson, D., ... Dietz, H. C. (2010). Mutations in fibrillin-1 cause congenital scleroderma: stiff skin syndrome. *Science translational medicine*, 2(23), 23ra20.

Lu, P., Takai, K., Weaver, V. M. and Werb, Z. (2011). Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(12), a005058.

Macdonald, P. R., Lustig, A., Steinmetz, M. O. and Kammerer, R. A. (2010). Laminin chain assembly is regulated by specific coiled-coil interactions. *Journal of structural biology*, 170(2), 398–405.

Mäki, J. M. (2009). Lysyl oxidases in mammalian development and certain pathological conditions. *Histology and histopathology*, 24(5), 651–660.

Mandel Õ., Parik M., Kuiv R. (1983). *Silma kliiniline anatoomia*. Tartu: Tartu Riiklik Ülikool.

- Marshall, G. E., Konstas, A. G., Abraham, S. and Lee, W. R. (1992). Extracellular matrix in aged human ciliary body: an immunoelectron microscope study. *Investigative ophthalmology & visual science*, 33(8), 2546–2560.
- Martin-Vasallo, P., Ghosh, S. and Coca-Prados, M. (1989). Expression of Na,K-ATPase alpha subunit isoforms in the human ciliary body and cultured ciliary epithelial cells. *Journal of cellular physiology*, 141(2), 243–252.
- Massagué, J. (1990). The transforming growth factor-beta family. *Annual review of cell biology*, 6, 597–641.
- Mccarty, C. A. and Taylor, H. R. (2000). Pseudoexfoliation syndrome in Australian adults. *American journal of ophthalmology*, 129(5), 629–633.
- McKee, K. K., Harrison, D., Capizzi, S. and Yurchenco, P. D. (2007). Role of laminin terminal globular domains in basement membrane assembly. *The Journal of biological chemistry*, 282(29), 21437–21447.
- McLaren, J. W., Ziai, N. and Brubaker, R. F. (1993). A simple three-compartment model of anterior segment kinetics. *Experimental eye research*, 56(3), 355–366.
- Miner, J. H., Patton, B. L., Lentz, S. I., Gilbert, D. J., Snider, W. D., Jenkins, N. A., Copeland, N. G. and Sanes, J. R. (1997). The laminin alpha chains: expression, developmental transitions, and chromosomal locations of alpha1-5, identification of heterotrimeric laminins 8-11, and cloning of a novel alpha3 isoform. *The Journal of cell biology*, 137(3), 685–701.
- Molnar, J., Fong, K. S., He, Q. P., Hayashi, K., Kim, Y., Fong, S. F., Fogelgren, B., Szauter, K. M., Mink, M. and Csiszar, K. (2003). Structural and functional diversity of lysyl oxidase and the LOX-like proteins. *Biochimica et biophysica acta*, 1647(1-2), 220–224.
- Naumann, G. O., Schlötzer-Schrehardt, U. and Küchle, M. (1998). Pseudoexfoliation syndrome for the comprehensive ophthalmologist. Intraocular and systemic manifestations. *Ophthalmology*, 105(6), 951–968.
- Nazarali, S., Damji, F. and Damji, K. F. (2018). What have we learned about exfoliation syndrome since its discovery by John Lindberg 100 years ago?. *The British journal of ophthalmology*, 102(10), 1342–1350.
- Nomizu, M., Utani, A., Beck, K., Otaka, A., Roller, P. P. and Yamada, Y. (1996). Mechanism of laminin chain assembly into a triple-stranded coiled-coil structure. *Biochemistry*, 35(9), 2885–2893.
- Olivieri, J., Smaldone, S. and Ramirez, F. (2010). Fibrillin assemblies: Extracellular determinants of tissue formation and fibrosis. In *Fibrogenesis and Tissue Repair* (Vol. 3, Issue 1).
- Ovodenko, B., Rostagno, A., Neubert, T. A., Shetty, V., Thomas, S., Yang, A., Liebmann, J., Ghiso, J. and Ritch, R. (2007). Proteomic analysis of exfoliation deposits. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 48(4), 1447–1457.

Ozaki, M. (2018). Mechanisms of Glaucoma in Exfoliation Syndrome. *Journal of glaucoma*, 27 Suppl 1, S83–S86.

Park, D. Y., Kim, M. and Cha, S. C. (2021). Cytokine and growth factor analysis in exfoliation syndrome and glaucoma. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 62(15).

Pérez-Rico, C., Pascual, G., Sotomayor, S., Asúnsolo, Á., Cifuentes, A., García-Honduvilla, N. and Buján, J. (2014). Elastin development-associated extracellular matrix constituents of subepithelial connective tissue in human pterygium. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 55(10), 6309–6318.

Perrin, A., Rousseau, J. and Tremblay, J. P. (2017). Increased Expression of Laminin Subunit Alpha 1 Chain by dCas9-VP160. *Molecular therapy. Nucleic acids*, 6, 68–79.

Ramirez, R. D., Sheridan, S., Girard, L., ... Minna, J. D. (2004). Immortalization of human bronchial epithelial cells in the absence of viral oncoproteins. *Cancer research*, 64(24), 9027–9034.

Rao, A. and Padhy, D. (2014). Pattern of pseudoexfoliation deposits on the lens and their clinical correlation--clinical study and review of literature. *PloS one*, 9(12), e113329.

Reekie, I. R., Sharma, S., Foers, A., Sherlock, J., Coles, M. C., Dick, A. D., Denniston, A. K. and Buckley, C. D. (2021). The Cellular Composition of the Uveal Immune Environment. *Frontiers in medicine*, 8, 721953.

Reibman, J., Meixler, S., Lee, T. C., Gold, L. I., Cronstein, B. N., Haines, K. A., Kolasinski, S. L. and Weissmann, G. (1991). Transforming growth factor beta 1, a potent chemoattractant for human neutrophils, bypasses classic signal-transduction pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(15), 6805–6809.

Reichheld, S. E., Muiznieks, L. D., Lu, R., Sharpe, S. and Keeley, F. W. (2019). Sequence variants of human tropoelastin affecting assembly, structural characteristics and functional properties of polymeric elastin in health and disease. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, 84, 68–80.

Responde, D. J., Natoli, R. M. and Athanasiou, K. A. (2007). Collagens of articular cartilage: structure, function, and importance in tissue engineering. *Critical reviews in biomedical engineering*, 35(5), 363–411.

Ritch, R. (2014). Ocular and systemic manifestations of exfoliation syndrome. *Journal of glaucoma*, 23(8 Suppl 1), S1–S8.

Ritch, R. and Schlötzer-Schrehardt, U. (2001). Exfoliation syndrome. *Survey of ophthalmology*, 45(4), 265–315.

Roberts, A. B., McCune, B. K. and Sporn, M. B. (1992). TGF-beta: regulation of extracellular matrix. *Kidney international*, 41(3), 557–559.

Rousselle, P. and Aumailley, M. (1994). Kalinin is more efficient than laminin in promoting adhesion of primary keratinocytes and some other epithelial cells and has a different requirement for integrin receptors. *The Journal of cell biology*, 125(1), 205–214.

Rousselle, P. and Beck, K. (2013). Laminin 332 processing impacts cellular behavior. *Cell adhesion & migration*, 7(1), 122–134.

Rousselle, P., Keene, D. R., Ruggiero, F., Champlaud, M. F., Rest, M. and Burgeson, R. E. (1997). Laminin 5 binds the NC-1 domain of type VII collagen. *The Journal of cell biology*, 138(3), 719–728.

Saccà, S. C., Gandolfi, S., Bagnis, A., Manni, G., Damonte, G., Traverso, C. E. and Izzotti, A. (2016). The Outflow Pathway: A Tissue With Morphological and Functional Unity. *Journal of cellular physiology*, 231(9), 1876–1893.

Sahay, P., Reddy, S., Prusty, B. K., Modak, R. and Rao, A. (2021). TGFβ1, MMPs and cytokines profiles in ocular surface: Possible tear biomarkers for pseudoexfoliation. *PloS one*, 16(4), e0249759.

Schlötzer-Schrehardt U. (2018). Molecular Biology of Exfoliation Syndrome. *Journal of glaucoma*, 27 Suppl 1, S32–S37.

Schlötzer-Schrehardt, U. (2009). Molecular pathology of pseudoexfoliation syndrome/glaucoma--new insights from *LOXLI* gene associations. *Experimental eye research*, 88(4), 776–785.

Schlötzer-Schrehardt, U. and Naumann, G. O. (1995). Trabecular meshwork in pseudoexfoliation syndrome with and without open-angle glaucoma. A morphometric, ultrastructural study. *Investigative ophthalmology & visual science*, 36(9), 1750–1764.

Schlötzer-Schrehardt, U. and Naumann, G. O. (2006). Ocular and systemic pseudoexfoliation syndrome. *American journal of ophthalmology*, 141(5), 921–937.

Schlötzer-Schrehardt, U. M., Koca, M. R., Naumann, G. O. and Volkholz, H. (1992). Pseudoexfoliation syndrome. Ocular manifestation of a systemic disorder?. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)*, 110(12), 1752–1756.

Schlötzer-Schrehardt, U., Dörfler, S. and Naumann, G. O. (1992). Immunohistochemical localization of basement membrane components in pseudoexfoliation material of the lens capsule. *Current eye research*, 11(4), 343–355.

Schlötzer-Schrehardt, U., Hammer, C. M., Krysta, A. W., Hofmann-Rummelt, C., Pasutto, F., Sasaki, T., Kruse, F. E. and Zenkel, M. (2012). *LOXLI* deficiency in the lamina cribrosa as candidate susceptibility factor for a pseudoexfoliation-specific risk of glaucoma. *Ophthalmology*, 119(9), 1832–1843.

Schlötzer-Schrehardt, U., Pasutto, F., Sommer, P., Hornstra, I., Kruse, F. E., Naumann, G. O., Reis, A. and Zenkel, M. (2008). Genotype-correlated expression of lysyl oxidase-like 1 in ocular tissues of patients with pseudoexfoliation syndrome/glaucoma and normal patients. *The American journal of pathology*, 173(6), 1724–1735.

Schlötzer-Schrehardt, U., von der Mark, K., Sakai, L. Y. and Naumann, G. O. (1997). Increased extracellular deposition of fibrillin-containing fibrils in pseudoexfoliation syndrome. *Investigative ophthalmology & visual science*, 38(5), 970–984.

Schlötzer-Schrehardt, U., Zenkel, M., Kühle, M., Sakai, L. Y. and Naumann, G. O. (2001). Role of transforming growth factor-beta1 and its latent form binding protein in pseudoexfoliation syndrome. *Experimental eye research*, 73(6), 765–780.

Sethi, A., Mao, W., Wordinger, R. J. and Clark, A. F. (2011). Transforming growth factor-beta induces extracellular matrix protein cross-linking lysyl oxidase (LOX) genes in human trabecular meshwork cells. *Investigative ophthalmology & visual science*, 52(8), 5240–5250.

Sharma, S., Chataway, T., Klebe, S., Griggs, K., Martin, S., Chegeni, N., Dave, A., Zhou, T., Ronci, M., Voelcker, N. H., Mills, R. A. and Craig, J. E. (2018). Novel protein constituents of pathological ocular pseudoexfoliation syndrome deposits identified with mass spectrometry. *Molecular vision*, 24, 801–817.

Shaw, L., Sugden, C. J. and Hamill, K. J. (2021). Laminin Polymerization and Inherited Disease: Lessons From Genetics. In *Frontiers in Genetics* (Vol. 12). Frontiers Media S.A.

Shi, Y. and Massagué, J. (2003). Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*, 113(6), 685–700.

Shin, S. J. and Yanagisawa, H. (2019). Recent updates on the molecular network of elastic fiber formation. *Essays Biochem.* 63, 365–376.

Spnlé, C., Lefebvre, O., Lacroute, J., ... Simon-Assmann, P. (2014). The laminin response in inflammatory bowel disease: protection or malignancy?. *PloS one*, 9(10), e111336.

Stamer, W. D. and Clark, A. F. (2017). The many faces of the trabecular meshwork cell. *Experimental eye research*, 158, 112–123.

Stenzel, D., Franco, C. A., Estrach, S., ... Gerhardt, H. (2011). Endothelial basement membrane limits tip cell formation by inducing Dll4/Notch signalling in vivo. *EMBO reports*, 12(11), 1135–1143.

Takai, Y., Tanito, M. and Ohira, A. (2012). Multiplex cytokine analysis of aqueous humor in eyes with primary open-angle glaucoma, exfoliation glaucoma, and cataract. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 53(1), 241–247.

Tamhane, M., Cabrera-Ghayouri, S., Abelian, G. and Viswanath, V. (2019). Review of Biomarkers in Ocular Matrices: Challenges and Opportunities. *Pharmaceutical research*, 36(3), 40.

Tarkkanen, A. and Kivelä, T. (2002). John G. Lindberg and the discovery of exfoliation syndrome. *Acta ophthalmologica Scandinavica*, 80(2), 151–154.

Taube, A. B. (2015). *Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Medicine 1130*. <http://urn.kb.se/resolve?urn=urn:nbn:se:uu:diva-260714>

Thomson, J., Singh, M., Eckersley, A., Cain, S. A., Sherratt, M. J. and Baldock, C. (2019). Fibrillin microfibrils and elastic fibre proteins: Functional interactions and extracellular regulation of growth factors. *Seminars in cell & developmental biology*, 89, 109–117.

Thorleifsson, G., Magnusson, K. P., Sulem, P., ... Stefansson, K. (2007). Common sequence variants in the *LOXLI* gene confer susceptibility to exfoliation glaucoma. *Science (New York, N.Y.)*, 317(5843), 1397–1400.

Thyboll, J., Kortessmaa, J., Cao, R., Soininen, R., Wang, L., Iivanainen, A., Sorokin, L., Risling, M., Cao, Y. and Tryggvason, K. (2002). Deletion of the laminin alpha4 chain leads to impaired microvessel maturation. *Molecular and cellular biology*, 22(4), 1194–1202.

To, C. H., Kong, C. W., Chan, C. Y., Shahidullah, M. and Do, C. W. (2002). The mechanism of aqueous humour formation. *Clinical & experimental optometry*, 85(6), 335–349.

Tunggal, P., Smyth, N., Paulsson, M. and Ott, M. C. (2000). Laminins: structure and genetic regulation. *Microscopy research and technique*, 51(3), 214–227.

Tzu, J. and Marinkovich, M. P. (2008). Bridging structure with function: structural, regulatory, and developmental role of laminins. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 40(2), 199–214.

Vander Ark, A., Cao, J. and Li, X. (2018). TGF- $\beta$  receptors: In and beyond TGF- $\beta$  signaling. *Cellular signalling*, 52, 112–120.

Vogiatzis, A., Marshall, G. E., Konstas, A. G. and Lee, W. R. (1994). Immunogold study of non-collagenous matrix components in normal and exfoliative iris. *The British journal of ophthalmology*, 78(11), 850–858.

Wang, K., Meng, X. and Guo, Z. (2021). Elastin Structure, Synthesis, Regulatory Mechanism and Relationship With Cardiovascular Diseases. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 9). Frontiers Media S.A.

Wells J. A. (1996). Binding in the growth hormone receptor complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(1), 1–6.

Willoughby, C. E., Ponzin, D., Ferrari, S., Lobo, A., Landau, K. and Omid, Y. (2010). Anatomy and physiology of the human eye: Effects of mucopolysaccharidoses disease on structure and function - a review. In *Clinical and Experimental Ophthalmology* (Vol. 38, Issue SUPPL. 1, pp. 2–11).

Wondimu, Z., Geberhiwot, T., Ingerpuu, S., ... Patarroyo, M. (2004). An endothelial laminin isoform, laminin 8 (alpha4beta1gamma1), is secreted by blood neutrophils, promotes neutrophil migration and extravasation, and protects neutrophils from apoptosis. *Blood*, 104(6), 1859–1866.

Wrighton, K. H., Lin, X. and Feng, X. H. (2009). Phospho-control of TGF-beta superfamily signaling. *Cell research*, 19(1), 8–20.

- Xu, R., Nelson, C. M., Muschler, J. L., Veiseh, M., Vonderhaar, B. K. and Bissell, M. J. (2009). Sustained activation of STAT5 is essential for chromatin remodeling and maintenance of mammary-specific function. *The Journal of cell biology*, 184(1), 57–66.
- Yeo, G. C., Keeley, F. W. and Weiss, A. S. (2011). Coacervation of tropoelastin. *Adv. Colloid Interface Sci.* 167, 94–103.
- Yoneda, K., Nakano, M., Mori, K., Kinoshita, S. and Tashiro, K. (2007). Disease-related quantitation of TGF-beta3 in human aqueous humor. *Growth factors (Chur, Switzerland)*, 25(3), 160–167.
- Yoshida, M., Takeuchi, M. and Streilein, J. W. (2000). Participation of pigment epithelium of iris and ciliary body in ocular immune privilege. 1. Inhibition of T-cell activation in vitro by direct cell-to-cell contact. *Investigative ophthalmology & visual science*, 41(3), 811–821.
- You, H. J., Bruinsma, M. W., How, T., Ostrander, J. H. and Blobe, G. C. (2007). The type III TGF-beta receptor signals through both Smad3 and the p38 MAP kinase pathways to contribute to inhibition of cell proliferation. *Carcinogenesis*, 28(12), 2491–2500.
- Yousif, L. F., Di Russo, J. and Sorokin, L. (2013). Laminin isoforms in endothelial and perivascular basement membranes. *Cell adhesion & migration*, 7(1), 101–110.
- Yue, B. (2014). Biology of the extracellular matrix: an overview. *Journal of glaucoma*, 23(8 Suppl 1), S20–S23.
- Yurchenco, P. D., Amenta, P. S. and Patton, B. L. (2004). Basement membrane assembly, stability and activities observed through a developmental lens. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, 22(7), 521–538.
- Zenkel, M. and Schlötzer-Schrehardt, U. (2014). Expression and regulation of *LOXLI* and elastin-related genes in eyes with exfoliation syndrome. *Journal of glaucoma*, 23(8 Suppl 1), S48–S50.
- Zenkel, M. and Schlötzer-Schrehardt, U. (2014). The composition of exfoliation material and the cells involved in its production. *Journal of glaucoma*, 23(8 Suppl 1), S12–S14.
- Zenkel, M., Lewczuk, P., Jünemann, A., Kruse, F. E., Naumann, G. O. and Schlötzer-Schrehardt, U. (2010). Proinflammatory cytokines are involved in the initiation of the abnormal matrix process in pseudoexfoliation syndrome/glaucoma. *The American journal of pathology*, 176(6), 2868–2879.
- Zenkel, M., Pöschl, E., von der Mark, K., Hofmann-Rummelt, C., Naumann, G. O. H., Kruse, F. E. and Schlötzer-Schrehardt, U. (2005). Differential gene expression in pseudoexfoliation syndrome. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 46(10), 3742–3752.
- Zenker, M., Tralau, T., Lennert, T., Pitz, S., Mark, K., Madlon, H., Dötsch, J., Reis, A., Müntefering, H. and Neumann, L. M. (2004). Congenital nephrosis, mesangial sclerosis, and distinct eye abnormalities with microcoria: an autosomal recessive syndrome. *American journal of medical genetics. Part A*, 130A(2), 138–145.

Zhu, J., Zhang, E. and Del Rio-Tsonis, K. (2012). Eye anatomy. eLS.

## **KASUTATUD VEEBIAADRESSID**

Eesti Entsüklopeedia - <http://entsyklopeedia.ee/artikkel/silm1> (29.05.2023)

# LISAD

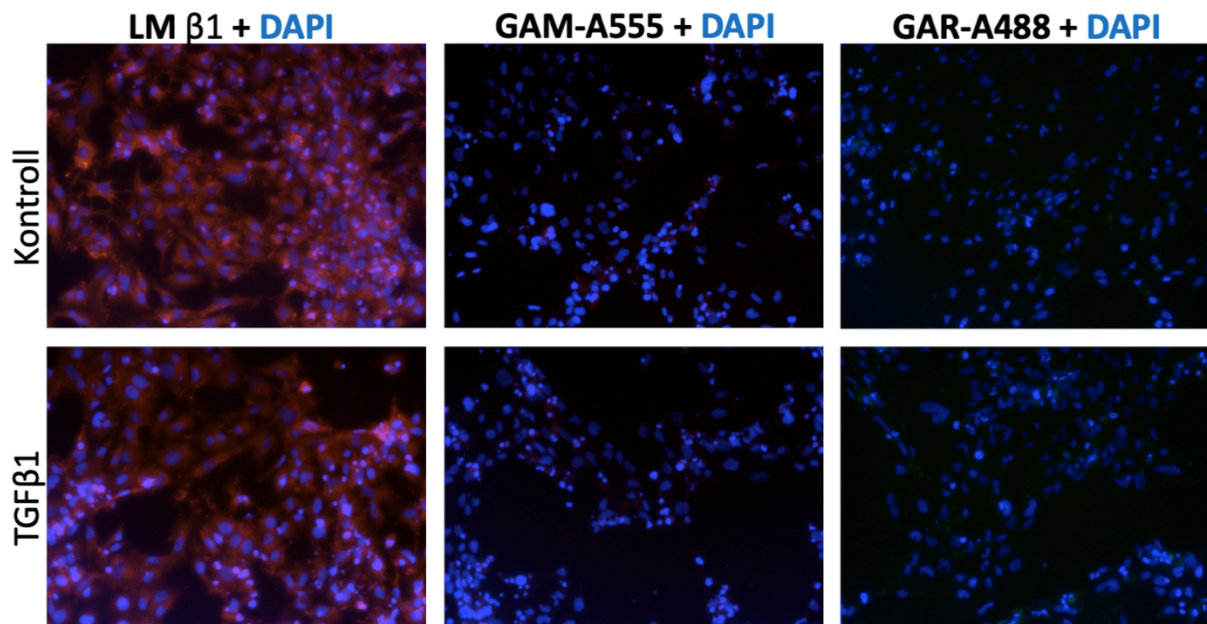
## Lisa 1. Kasutatud praimerid

Praimer		Järjestus
<i>FBN1</i>	F	5' TCTCCGCGTGTATCGACATC 3'
	R	5' GGGTTGCAGGCACACTGATA 3'
<i>LAMA1</i>	F	5' GTGAGGACCCCAGTAACGC 3'
	R	5' TAAAACGGCTCTGCACGGAT 3'
<i>LAMA2</i>	F	5' GTGACAAATGCAAGGCTGGGA 3'
	R	5' GGCACAGCGGTCACATTTC 3'
<i>LAMA3</i>	F	5' TGGGATGGCTGTGGATCTTT 3'
	R	5' ACCCTTTGCTGCTGTGAACT 3'
<i>LAMA4</i>	F	5' GCCTGAGACGAGCGAACC 3'
	R	5' CCAGGTGAAACTCTCAAGGCA 3'
<i>LAMA5</i>	F	5' CAATGCCTCGGCTCCATCAG 3'
	R	5' CGGGCCAGCAATCTCTGT 3'
<i>LOXL1</i>	F	5' GTGCTGCGGAGGAGAAGTGT 3'
	R	5' TCCATGCTGTGGTAATGCTGGT 3'
<i>TGFBI</i>	F	5' AAGGTAACGGCCAGTACACG 3'
	R	5' TGGTTGTTTCAGCAGGTCTCTC 3'
<i>TGFB1</i>	F	5' TTGAGGGCTTTCGCCTTAGC 3'
	R	5' CCGGTAGTGAACCCGTTGATG 3'
<i>TGFB2</i>	F	5' GCGAATGGCTCTCCTTCGAT 3'
	R	5' GGTGCCATCAATACCTGCAAA 3'
<i>TGFB3</i>	F	5' ATGACCCACGTCCCCTATCA 3'
	R	5' CAGACAGCCAGTTCGTTGTG 3'
<i>TGFBR1</i>	F	5' TTGTTGGTACCCAAGGAAAGCC 3'
	R	5' CCACTCTGTGGTTTGGAGCAA 3'
<i>TGFBR2</i>	F	5' TGTGTGGCTGTATGGAGAAAGA 3'
	R	5' TCATGGTAGGGGAGCTTGGG 3'
<i>TGFBR3</i>	F	5' TGCACTTTCCTATCCCGCAA 3'
	R	5' TGCACTTTCCTATCCCGCAA 3'

## Lisa 2. RT-qPCR program

Etapp	Temperatuur °C	Aeg	Korduste arv
Võimaliku kontaminatsiooni eemaldus	50	2 minutit	1
Ensüümi aktivatsioon	95	15 minutit	1
Denaturatsioon	95	15 sekundit	40
Produkti paljundamine	60	1 minut	
Dissotsiatsioonianalüüsi etapp	95	15 sekundit	1
	60	1 minut	
	95	15 sekundit	

**Lisa 3. Laminiini  $\beta$ 1**, konjugeeritud sekundaarsete antikehadega **Alexa 488** ja **Alexa 555** tuvastamine immunofluorestsentsmikroskoopiaga. TGF- $\beta$ -ga töödeldud ODM-2 rakud ja töötlemata rakud (Kontroll). Siniselt on värvunud rakutuomad (DAPI), punaselt on värvunud piirkonnad, kus vastav antikeha on spetsiifiliselt seondunud. Pildid on saadud 20x suurendusega objektiiviga. Sekundaarse antikeha lahjendus 1:500.



# LIHTLITSENTS

Mina, Liis Hirvesoo

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

## **Tsütokiini TGF- $\beta$ 1 poolt vahendatud muutused laminiinide ekspressioonis ODM-2 rakuliinis,**

mille juhendajad oli Martin Pook ja Indrek Teino,

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

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

**Liis Hirvesoo**  
**30.05.2023**