

TARTU ÜLIKOOL
ARSTITEADUSKOND
PATOLOOGILISE ANATOMIA JA KOHTUARSTITEADUSE
ÕPPETOOL

LIINA TSEREL

METALLOPROTEAASIDE INHIBIITORITE EKSPRESSIOONI
ANALÜÜS INIMESE KESKNÄRVISÜSTEMIS

Magistritöö biomeditsiinis

Juhendajad:
Andres Kulla, Ph.D.
Pille Pärn, M.Sc.

TARTU
2007

SISUKORD

SISUKORD	2
LÜHENDID JA MÕISTED	5
SISSEJUHATUS	7
KIRJANDUSE ÜLEVAADE	8
1. Ekstratsellulaarsed proteaasid	8
1.1. Rakuväline maatriks ja selle remodelleerimine	8
1.2. Maatriks-metalloproteaasid	10
1.2.1. MMP-de struktuur	10
1.2.2. MMP-de regulatsioon	12
1.2.3. MMP-de roll füsioloogilistes ja patoloogilistes protsessides	13
1.3. MMP-de inhibiitorid	14
1.3.1. TIMP-1	15
1.3.2. TIMP-2	16
1.3.3. TIMP-3	17
1.3.4. TIMP-4	18
1.3.5. Sünteetilised MMP inhibiitorid	18
1.3.6. TIMP-de MMP-dest sõltumatud funktsioonid	20
2. Rakuväliste proteaaside regulatsioon ja roll neurobioloogias ja –patoloogilistes protsessides	21
2.1. TIMP-d imetajate närvisüsteemis	21
2.2. TIMP-d kasvajate bioloogias	22
3. Töö eesmärgid	24
EKSPERIMENTAALNE OSA	25
4. Materjal ja meetodika	25
4.1. Kasutatud koed	25
4.1.1. <i>In situ</i> hübriidisatsioon	25

4.1.1.1. RNA eraldamine kudedest	25
4.1.1.2. RNA geeli elektroforees	26
4.1.1.3. DNAasi töötlus	26
4.1.1.4. cDNA süntees	27
4.1.1.5. PCR	27
4.1.1.6. Agarosgeelelektroforees	28
4.1.1.7. DNA sadestamine	28
4.1.1.8. Restriksioon	28
4.1.1.9. DNA eraldamine geelist	29
4.1.1.10. Ligeerimine	29
4.1.1.11. Kompetentide valmistamine	30
4.1.1.12. Transformatsioon	31
4.1.1.13. DNA eraldamine rakkudest aluselise lüüsi meetodil	31
4.1.1.14. DNA eraldamine rakkudest suures mahus	31
4.1.1.15. DNA restriksioonijärgne puhastamine	31
4.1.1.16. <i>In situ</i> hübridisatsioon	32
4.1.2. Immuuno-histokeemilised uuringud koekiipidel	33
4.2. Q-PCR	33
4.2.1. Töös kasutatud närvisüsteemi lokalisatsioonid	33
4.2.2. RNA eraldamine kudedest ja cDNA süntees	34
4.2.3. Praimerite disain	34
4.2.4. Q-PCR	35
4.3. Western blot	35
5. Tulemused	37
5.1. <i>In situ</i> hübridisatsioon	37
5.2. Immuuno-histokeemiline analüüs	40
5.3. Western blot	45
5.4. Q-PCR	46
6. Arutelu	49
6.1. TIMP-1 ekspressioon kesknärvisüsteemis	49
6.2. TIMP-2 ekspressioon kesknärvisüsteemis	49

6.3. TIMP-3 ekspressioon kesknärvisüsteemis	50
6.4. TIMP-4 ekspressioon kesknärvisüsteemis	51
6.5. TIMP-d inimese normaalses kesknärvisüsteemis	51
6.6. Järeldused	53
KOKKUVÕTE	54
SUMMARY	55
KASUTATUD KIRJANDUS	57
LISA1	66
LISA2	68
LISA3	70
LISA4	72
LISA5	74
LISA6	76
LISA7	78
LISA8	80
LISA9	82

LÜHENDID JA MÕISTED

ADAM-	disintegriin ja metalloproteas (<i>A Disintegrin and Metalloprotease</i>)
Amp-	ampitsilliin
bFGF-	aluseline fibroblasti kasvufaktor (<i>Basic fibroblast growth factor</i>)
cDNA-	komplementaarne DNA
C-terminaalne-	karboksüterminaalne
CNS-	kesknärvisüsteem
DAB-	diaminobensidiin
DEPC-	dietüülpürokarbonaat
DNA-	desoksüribonukleiinhape
dNTP-	deoksüribonukleotiid trifosfaat
DTT-	ditiotreitool
EDTA-	etüleendiamiintetraädikhape
EGTA-	etüleenglükooltetraatsetaanhape
HEPES-	4-(2-hüdoksüetüül)-1-piperatsineetaansulfoonhape
IL-	interleukiin
IPTG-	isopropüül- β -tiogalaktopüranosiid
kb-	kiloaluspaari
kDa-	kilodalton
LB sööde-	Luria-Bertani sööde
MOPS-	3-(N-morfoliino)propaansulfoonhape
MMP-	maatriks metalloproteinaas
mRNA-	sõnumikandja RNA (<i>messenger RNA</i>)
MT-MMP-	membraani tüüpi maatriks metalloproteinaas
PA-	plasminogeeni aktivaator
PAI-	plasminogeeni aktivaatori inhibiitor
PCR-	polümeraasi ahelreaktsioon (<i>polymerase chain reaction</i>)
PVDF-	polüvinülideen difluoriid
Q-PCR-	kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon
RNA-	ribonukleiinhape

RT-PCR-	reaalaja polümeraasi ahelreaktsioon
RVM-	rakuväline maatriks
SEM-	<i>standard error of measurement</i>
SDS-	naatriumdodeküülhape
TAE-	Tris-atsetaat-EDTA puhver
TE-	Tris-EDTA puhver
Taq-	<i>Thermus aquaticus</i>
TGF- β -	transformeeriv kasvufaktor β (<i>Transforming Growth Factor-beta</i>)
TIMP-	metalloproteinaaside koe inhibiitor (<i>Tissue Inhibitor of MetalloProteinases</i>)
tPA-	koe plasminogeeni aktivaator (<i>Tissue Plasminogen Activator</i>)
Tris-	trishüdrosümetüülaminmetaan
U-	ühik (unit)
uPA-	urokinaasi-tüüpi plasminogeeni aktivaator
uPAR-	urokinaasi-tüüpi plasminogeeni aktivaatori retseptor
VEGF-	vaskulaarne endoteliaalne kasvufaktor (<i>vascular endothelial growth factor</i>)
X-gal-	5-bromo-4-kloro-3-indolüül-beeta-D-galactopüranosiid

SISSEJUHATUS

Ekstratsellulaarne proteolüüs ja eriti MMP (maatriks metalloproteas)/TIMP (maatriks metalloproteaside koeinhibiitorid) süsteem omab suurt tähtsust erinevates kesknärvisüsteemi füsioloogilistes ja patoloogilistes protsessides. Proteaasid mängivad keskset rolli paljudes bioloogilistes protsessides, mille hulka kuuluvad embrüogenees, normaalne kudede ümberehitamine, haava paranemine ja angiogenees, ning mitmetes haiguslikes protsessides (nt. kasvajate invasioon, artriit ja koe haavandumine).

Maatriks metalloproteasid on Zn^{2+} -sõltuvate proteaside perekonna liikmed, mille aktiivsus on normaalsetes tingimustes täpselt reguleeritud transkriptsiooni, eellasmolekuli aktiveerimise ja spetsiifiliste inhibiitorite tasemel. TIMP-d on MMP-de koespetsiifilised inhibiitorid, mis osalevad MMP-de lokaalse aktiivsuse kontrollis. TIMP-de perekond koosneb neljast liikmest: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 ja TIMP-4. Kõiki neid võib leida enamusest organismi kudedest ja kehavedelikest. Kuigi kõigil neljal TIMP-1 palju ühiseid jooni, on neil erinev struktuur, biokeemilised omadused ning ekspressioonimustrid seetõttu arvatavasti ka *in vivo* erinev roll.

Lisaks TIMP-de MMP-sid inhibeerivatele omadustele on neil ka vähemtuntuid funktsioone MMP-de koaktivaatoritena ja MMP-sõltumatuid funktsioone.

Suur osa informatsioonist TIMP-de rolli kohta neurofüsioloogilistes ja – patoloogilistes protsessides on saadud uurides erinevaid katseloomi, peaaesjalikult hiiri ja rotte. Selleks on kasutatud nii transgeenseid loomi, kui ka *knockout* mudeleid.

Käesoleva töö eesmärk on luua süstemaatiline iseloomustus TIMP-1, -2, -3, -4 ekspressiooni kohta normaalses inimese kesknärvisüsteemis. Selleks hinnati TIMP-de ekspressiooni inimese kesknärvisüsteemi 11-s olulisemas anatoomilises struktuuris, kasutades selleks immuuno-histokeemilist analüüsi, *in situ* hübriidisatsiooni, *Western blot* meetodit ning Q-PCR-i.

KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1. Ekstratsellulaarsed proteaasid

1.1. Rakuväline maatriks ja selle remodelleerimine

Imetajate kudedest olulise osa moodustab rakuväline maatriks (RVM) – kompleksne struktuursete valkude, proteoglükaanide, kasvufaktorite, erinevate ensüümide ja nende inhibiitorite kogum. Rakuvälisel maatriksil on võtmeroll organite ja kudede struktuuri tagamisel. Samas pole RVM pelgalt inertne mehaaniline raamistik, vaid paljude bioaktiivsete makromolekulide kompleks. Paljud RVM molekulid (fibronektiin, vitronektiin, mitmed kollageenid) täidavad nii struktuurset kui ka reguleerivat funktsiooni. RVM on dünaamiline struktuur ja selle seisund sõltub maatriksi molekulide sünteesi ja ensümaatilise lagundamise vahelisest tasakaalust (Werb, 1997). Aktiivne maatriksi ümberkujundamine on iseloomulik kudede struktuuri kiire ümberkorraldumise ja rakuinvasiooniga seotud füsioloogilistes protsessides (embrüogenees ja postnataalne areng, neurogenees). Maatriksi metabolismi häired on olulised paljude haiguslike protsesside tekkes: ühelt poolt põhjustab ülemäärane maatriksi ladestumine fibrootilisi muutusi, samas on suurenenud maatriksi degradatsioon seotud vähirakkude invasiooni ja metastaseerumisega, närvikiudude demüelinatsiooniga, isheemilise koekahjustusega.

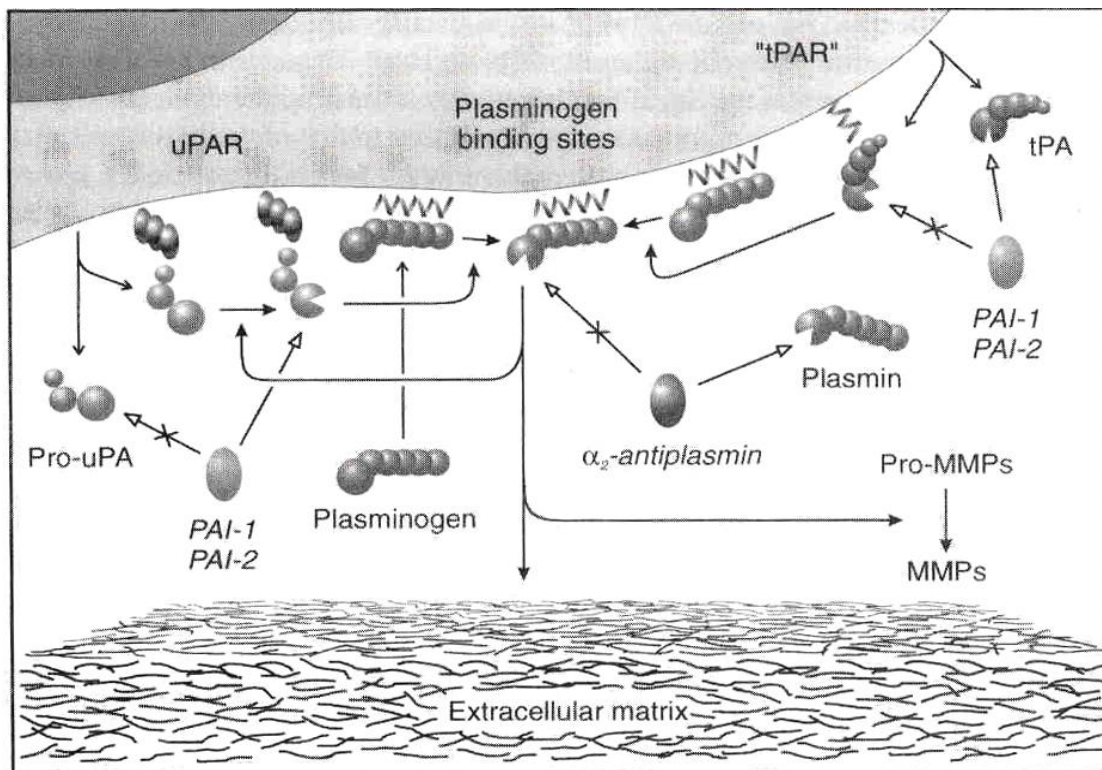
Olulisemad imetajate rakuvälise maatriksi degradatsiooni läbi viivad proteolüütiliste ensüümide rühmad on metalloproteaasid (maatriks-metalloproteaasid, adamlüsiinid ja pappalüsiinid) ja seriinproteaasid (plasminogeeni aktivatsiooni süsteem, elastaas, koagulatsioonifaktorid; Garcia-Touchard jt., 2005). Ekstratsellulaarsed proteaasid on oma struktuurilt väga varieeruvad, kuid nende ühiseks jooneks on süntees valkudena, mis vajavad aktiveerimist tegutsevateks proteaasideks, ning aktiivsuse reguleerimine inhibiitorite poolt.

Maatriks metalloproteinaasid (MMP) on proteaasid, mis osalevad pidevas ekstratsellulaarse maatriksi ümberkorraldamises. MMP-d kuuluvad Zn^{2+} sõltuvate metsinsiinide hulka ning normaalsetes füsioloogilistes tingimustes on nende aktivatsioon täpselt reguleeritud transkriptsiooni, aktivatsiooni, teiste RVM komponentide

interaktsioonide ja endogeensete inhibiitoritega (Nagase ja Woessner, 1999; Sternlicht ja Werb, 2001). MMP aktiivsuse kontrollmehhanismide häired võivad põhjustada mitmeid tõsiseid haiguseid, nagu näiteks artriit, kasvajakad, kardiovaskulaarsed haigused, nefriit, neuroloogilised häired, kudede haavandid ja fibroos (Woessner, 1998).

Olulisimaks rakuväliste seriinproteasaaside süsteemiks on plasminogeeni aktivatsiooni (PA) süsteem. PA süsteem mängib tähtsat rolli ekstratsellulaarse matriksi lagundamises, fibrinolüüsis ja paljudes rakkude migratsiooniga seotud füsioloogilistes ja patoloogilistes protsessides, nagu näiteks embrüogeneesis, neurogeneesis ja angiogeneesis ning erinevates RVM ümberkujundamisega seotud patoloogilistes protsessides (Mak jt., 1976; Strickland jt., 1976; Gross jt., 1983; Ossowski ja Reich, 1983; Dano jt., 1985; Nielsen jt., 1988; Schafer jt., 1994; Teesalu jt. 1996; Teesalu jt. 1998). Plasminogeeni aktivatsiooni süsteemi komponentideks on plasminogeen (laia spektriga proteaasi plasmiini eellasmolekul, leidub kõrges kontsentratsioonis veres ja paljudes kudedes), plasminogeeni aktivaatorid (urokinaas/uPA ja koetüüpi plasminogeeni aktivaator/tPA), retseptorid (uPAR; anneksiin) ning inhibiitorid (alfa-1-antiplasmiin, plasminogeeni aktivaatori inhibiitorid 1-3, alfa-2-makroglobuliin; joonis 1.). tPA peamine füsioloogiline roll seisneb intra- ja ekstravaskulaarses trombolüüsis. uPA on oluline peritsellulaarse plasmiini tekkeks ja rakuinvasiooniks. Sekreteeritud pro-uPA seondub oma membraaniseoselise retseptori uPAR-i ning katalüüsib membraaniseoselise plasminogeeni muutumist plasmiiniks. uPA poolt tekitatud membraaniseoselist plasmiini kaitseb inhibitsiooni eest alfa-1-antiplasmiin. Plasmiin on laia substraadispetsiifilisega ensüüm, mis on võimeline lagundama paljusid ekstratsellulaarse matriksi valke, aktiveerima mitmeid matriksi metalloprotease ning aktiveerima ja/või matriksist vabastama mitmeid latentseid kasvufaktoreid (TGF-Beta, VEGF; Ellis ja Murphy, 2001). Plasminogeeni aktivatsiooni süsteem on väga täpselt reguleeritud mitmete füsioloogiliste inhibiitorite, nagu α -antiplasmiin, PAI-1 ja PAI-2 poolt (Ellis jt., 1990).

Tsüsteiinproteasid on samuti väga laialdaselt levinud. Imetajatel kõige levinumad tsüsteiinproteasid - katepsiinid on peaaegjalikult seotud intratsellulaarse proteolüüsiga: valkude degradatsiooni (Turk jt., 2000), antigeeni esitlemisega (Chapman jt., 1997). Otseselt või kaudselt on tsüsteiinproteasid seotud ka põletikuliste protsesside (Dickinson, 2002) ja kasvujate invasiooniga (Sloane jt., 1994; Kos ja Lah, 1998).



Joonis 1. Plasminogeeni aktivatsiooni süsteem (Waisman, 2003).

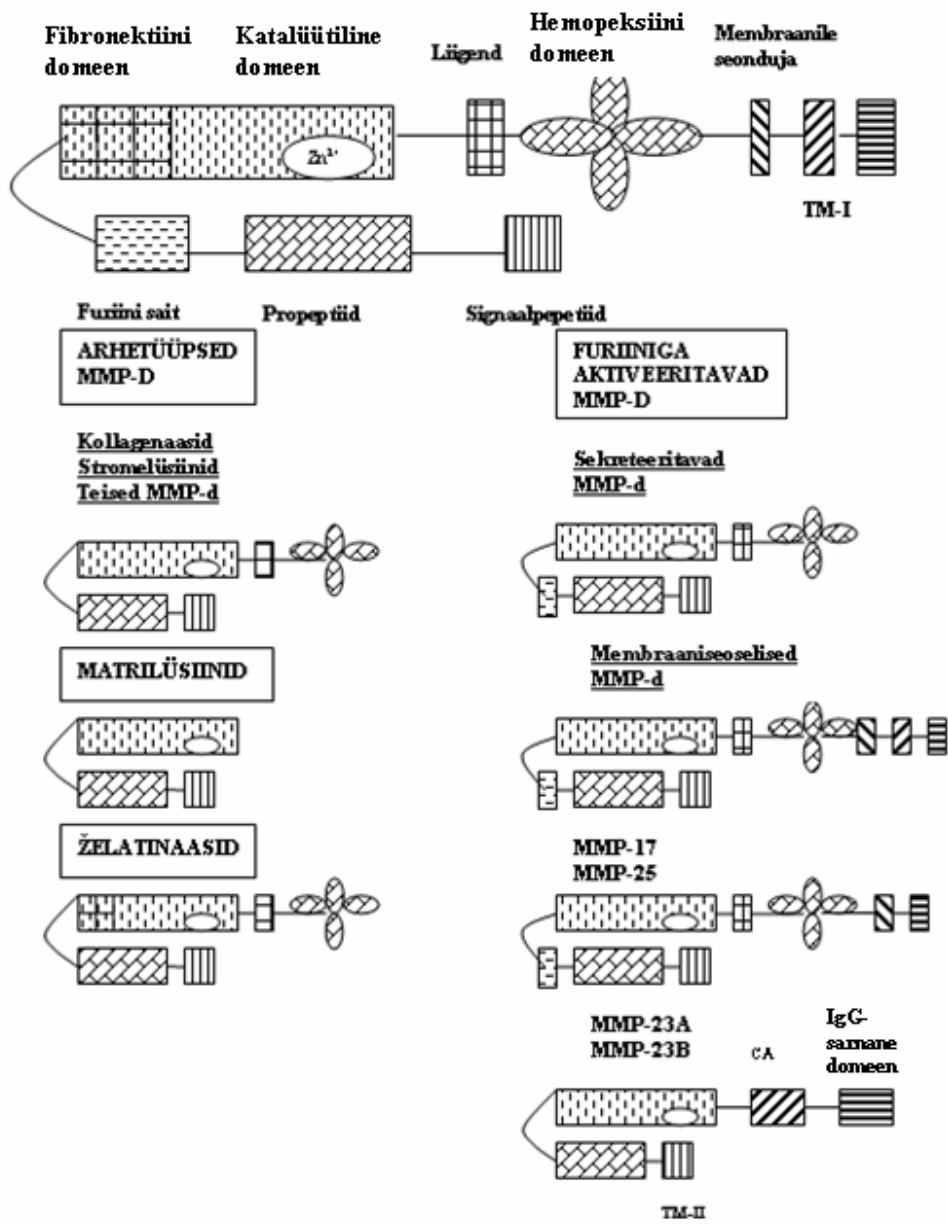
1.2. Maatriks - metalloproteaasid

1.2.1 MMP-de struktuur

MMP-d kuuluvad Zn^{2+} -sõltuvate metalloproteaaside perekonda (*metzincins*), kuhu kuuluvad veel astatsiinid (*astacins*), bakteriaalsed serralüsiinid ja ADAM-sid (disintegriin-metalloproteaasid; Stocker jt., 1995). MMP perekond koosneb vähemalt 24 liikmest (Puente jt., 2003).

MMP-sid on võimalik klassifitseerida nii substraadispetsiifilisuse kui ka struktuuri alusel. Substraadi alusel jagatakse MMP-d želatinaasideks, stromelüsiinideks, membraani tüüpi MMP-deks (MT-MMP-d) ja "teisteks MMP-deks" (Kojima jt., 2000). Oma struktuurilt on MMP-d järgmistest domeenidest koosnevad valgud: sekreteerimist määravast propeptiidist, latentsust säilitavast propeptiidist, katalüütilisest domeenist,

substraadispetsiifilisust määravast domeenist, interakteeruvast C-terminaalsest hemopeksiini domeenist (Overall jt., 2002). Struktuuri alusel võib MMP-d jagada arhetüüpseteks MMP-deks, matrilüsiinideks, želatinaasideks, furiiniga aktiveeritavateks MMP-deks ning kaheks „ebatavaliseks“ MMP-ks (vt joonis 2).



Joonis 2. MMP-de ehituse mitmekesisus (Folgueras jt., 2004 järgi)

Arhetüüpsed MMP ehitust omavad alamgrupp sekreteeritavaid: kolm inimese kollagenaasi (MMP-1, MMP-8 ja MMP-13), kaks stromelüsiini (MMP-3 ja MMP-10) ning lisaks veel neli unikaalse ehitusega MMP-d (MMP-12, MMP-19, MMP-20 ja MMP-27). Matrilüsiine (MMP-7 ja MMP-26) iseloomustab hemopeksiini domeeni puudumine ning želatinaase (MMP-2 ja MMP-9) kolm fibronektiin II tüüpi moodulit, millega need seonduvad kollagenaaside (Morgunova jt., 1999). Membraani tüüpi MMP-d (MT-MMP) seonduvad rakule C-terminaalse domeeni (MT1-, MT2-, MT3-, ja MT6-MMP) või glükosüülfosfatidüülinositolankru kaudu (MT4- ja MT6-MMP; Zucker jt., 2003). MT-MMP-del on propeptiidi ja katalüütilise domeeni vahele lisandunud uus osa, mis on seotud furiinisarnase seriinproteaaasiga ja viib läbi propeptiidi rakusisesest aktiveerimist (Thomas, 2002; Zucker jt., 2003). Furiinisarnane sidumiskoht on olemas ka kolmel sekreteeritaval MMP-l (MMP-11, MMP-21 ja MMP-28), mis ei kuulu ühesegi eelnevasse gruppi, ja samuti kahel ebatavalisel transmembraansel MMP-l (MMP-23A ja MMP-23B), mis on seotud rakumembraaniga N-terminaalse domeeni kaudu ning näivad olevat sama aminohappelise järjestusega, kuigi neid kodeeritakse erinevate geenide poolt (Pei jt., 2000; Velasco jt., 1999).

1.2.2. MMP-de regulatsioon

MMP-d on laia substraadispektriga ensüümid, mille kontrollimatu aktiivsus võiks kahjustada kudede struktuuri ja põhjustada rakkude surma. Seetõttu on MMP-de aktiivsus täpselt reguleeritud. MMP-de regulatsioon toimub geeni transkripsiooni, proensüümi aktivatsiooni ja ensümaatilise aktiivsuse inhibeerimise tasemel.

Enamus MMP-sid ei ekspresseeru konstitutiivselt (Yong, 1999). Paljud regulaatormolekulid, sealhulgas tsütokiinid ja kasvufaktorid reguleerivad MMP-de ekspressiooni (Westermarck ja Kahari, 1999). MMP-de ajaliselt ja ruumiliselt reguleeritud ekspressiooni on kasutades *in situ* hübriidisatsiooni kirjeldatud paljudes füsioloogilistes rakuinvasiooni protsessides – embrüo implantatsioonis, trofoblasti invasioonis, neurogenesis (Teesalu jt., 1999). Hästi dokumenteeritud on ka MMP-de

induktsioon tumorigeneesi erinevates faasides – kasvajarakkude invasioonis ja kasvajates aset leidvas neoangiogeneesis. MMP-sid toodavad paljud erinevad rakud, mille hulka kuuluvad nii epteliaalsed kasvajarakud kui ka kasvajatesse tungivad stromaalsed fibroblastid ja põletikulised rakud. MMP-de transkriptsiooni regulatsiooni võtmeküsimuseks on just erinevate rakkude MMP-de ekspressiooni blokeerimine (De Wever ja Mareel, 2003; Nielsen jt., 2001).

MMP-d sünteesitakse inaktiivsete pro-MMP-dena. Seetõttu on pro-MMP-de aktivatsioon järgmineks astmeks MMP-de aktiivsuse reguleerimiseks. *In vivo* toimub pro-MMP-de aktivatsioon propeptiidi eemaldamise kaudu, mida viivad läbi teised proteaasid (Lijnen, 2001). *In vitro* põhjustavad MMP-de aktivatsiooni paljud valgu struktuuri destabiliseerivad ained/tingimused (kaotroopsed ühendid, denatureerivad ained, madal pH ja kõrge temperatuur; Nagase, 1997). Nende tulemusel katkeb side propeptiid domeeni tsüsteiini ja katalüütilise domeeni Zn²⁺ iooni vahel (*cystein-switch*; Morgunova jt., 1999; Van Wart ja Birkedal-Hansen, 1990).

Kord aktiveeritud MMP-de bioloogilist aktiivsust reguleerivad endogeensed ekstratsellulaarsed inhibiitorvalgud. Osad inhibiitorid on üldised, nagu näiteks α 2-makroglobuliin (inhibeerib laia spektrit erinevate perekondade proteaase). MMP-de spetsiifilised inhibiitorid on metalloproteaaside koeinhibiitorid (Tissue Inhibitor of MetalloProteinases, TIMP). Imetajatel on iseloomustatud neli erinevat TIMP-i, TIMP-1-4 (Brew jt., 2000). TIMP-d inaktiveerivad proteaasi seondudes selle aktiivtsentrisse. Huvitaval kombel on TIMP-e vaja ka mõnede MMP-de aktiveerimiseks (Murphy ja Knauper, 1997).

1.2.3. MMP-de roll füsioloogilistes ja patoloogilistes protsessides

MMP-de ja TIMP-de ekspressioon on indutseeritud paljude kudede struktuursete muutustega seotud protsessides: ovulatsioonis, blastotsüsti implantatsioonis, loote embrüonaalses arengus, elundite morfogeneesis, muuhulgas neurogeneesis (Nagase ja Woessner, 1999). Täiskasvanud organismis on proteaaside aktiivsus pärsitud. Erandiks on proteaaside induktsioon seoses tsükliliste struktuursete muutustega emasorganismi reproduktiivorganites. Kooskõlas MMP-de rolliga patoloogilistes koe

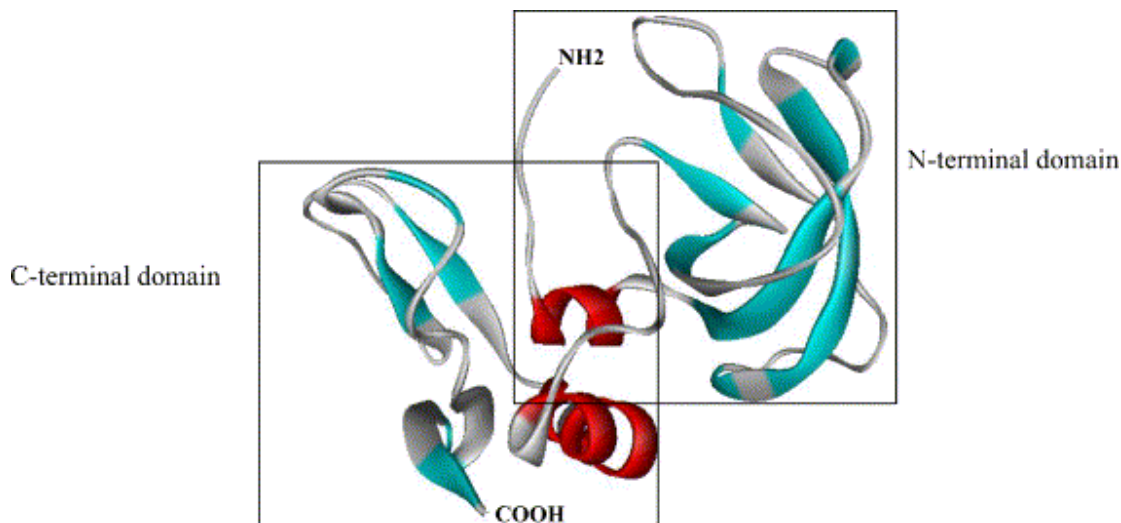
remodelleerimisprotsessides on kirjeldatud erinevate MMP-de rolli destruktiivsetes ja rakuinvasiooniga seotud protsessides artriit, vähk, südameveresoonkonna haigused, demüelinatsioon, periodontaalsed haigused, naha haavandid, maohaavad, sarvkesta haavandid, maksa tsirroos, emfüseem, krooniline fibroseeriv kopsuhaigus (Parks ja Mecham, 1998).

MMP ja TIMP *knockout* hiirte olemasolu on võimaldanud hinnata metalloproteaaside süsteemi funktsionaalset tähtsust hiire füsioloogilistes ja patoloogilistes protsessides. Transgeensete hiirtega on näidatud, et MMP-7 üleekspressioon paljunemisorganites muutis RVM terviklikkust, rakkude diferentseerumist ja koespetsiifilist rakkude hävitamist (Rudolph-Owen jt., 1998). MMP-3 konstitutiivselt aktiivse variandi üleekspressioon hiire rinnanäärme epiteelis põhjustas stroomarakkude aktivatsiooni, suurenenud kollageeni sünteesi ja fibroosi (Sympson jt., 1994), MMP-1 üleekspressioon assotsieerub kardiovaskulaarsete haiguste süvenemisega (D'Armiento jt., 1997)

MMP-de bioloogiliste funktsioonide lühikokkuvõte on toodud tabelis 3 (lisa1).

1.3. MMP-de inhibiitorid

Kõik imetajate TIMP-d on ligi 180 aminohappelised iseloomulikke tsüsteiinide paigutusega valgud. Struktuurselt koosnevad TIMP-d kahest domeenist: aminotermiinaalsest „OB kurru“ domeenist ja karboksütermiinaalsest domeenist. C-terminaalne domeen on omakorda volditud β -tünniks, milles on „Kreeka võtme“ (*Greek key*) motiiv ja üks või mitu α -heeliksit (joonis 3; Brew jt. 2000). Kahte domeeni hoiab koos kuus disulfiidsilda. TIMP-d seostuvad MMP-dega mittekovaalentsete sidemetega suhtes 1:1 (Gomis-Ruth jt., 1997). TIMP-de N-terminaalne domeen vastutab MMP-de inhibeerimise eest, samal ajal kui C-terminaalne domeen interakteerub teiste valkudega (Strongin jt., 1995; Kai jt., 2002).



Joonis 3. TIMP-1 tridimensionaalne struktuur (Lambert jt., 2004).

1.3.1. TIMP-1

TIMP-1 on 28,5 kDa suurune valk, mida kodeeriv geen paikneb X-kromosoomis. TIMP-1 mRNA on suurusega 0,9 kb ning valgu molekulmass 28,5 kDa (Lambert jt., 2004).

Koekultuuris ekspresseerub TIMP-1 paljudes rakutüüpides (fibroblastides, epiteelirakkudes, endoteelirakkudes, osteoblastides, kondrotsüütides, silelihasrakkudes ja paljudes kasvajarakkudes (Welgus jt., 1985; Bord jt., 1999; Cawston jt., 1999). TIMP-1 sekreteeritakse ekstratsellulaarsesse ruumi. TIMP-1 inhibeerib kõiki MMP-sid, välja arvatud MT1-MMP (Crocker jt., 2004). Roti kesknärvisüsteemis on ekspressiooni kirjeldatud hipokampuses (Rivera jt., 2002), ajukoos (Newton jt., 2003; von Gertten jt., 2003), väikeajus (Rathke-Hartlieb jt., 2000; Fager ja Jaworsky, 2000), taalamuses (Khuth jt., 2001) ja mustaines (*substantia nigra*; Lorenzl jt., 2002). TIMP-1 ekspressiooni tase närvisüsteemis langeb postnataalse arengu käigus (Vaillant jt., 1999; Rathke-Hartlieb jt., 2000; Fager ja Jaworsky, 2000).

TIMP-1 ekspressioon indutseerub mitmete haiguslike protsesside käigus: krampide (Rivera jt., 2002; Rivera jt., 1997; Nedivi jt., 1993; Jaworski jt., 1999; Newton

jt., 2003), katkuviruse (*canine distemper virus*) infektsiooni (Khuth jt., 2001), inimese T-lümfotroofilise viiruse tüüp I infektsiooni (Szymocha jt., 2000; Gardner ja Ghorpade, 2003), Parkinsoni tõve, demüelinatsiooni (Pagenstecher jt., 1998; Teesalu jt., 2001), inimese autoimmuunviirus 1-ga seotud dementsuse (Gardner ja Ghorpade, 2003), KCl-indutseeritud depolarisatsiooni, ajupõrutuse (von Gertten jt., 2003), hüpertroofilistes astrotsüütides gliooosi piirkonnas, mesenteriaaltromboosi (Rivera jt., 2002) ja mitmete hematoloogiliste haiguste korral (Murate jt., 1997).

TIMP-1 funktsionaalseks hindamiseks *in vivo* on kasutatud TIMP-1 *knockout* hiiri. Emastel TIMP1-*knockout* hiirtel esinesid suguelundite arengu kõrvalekalded: muutused menstruaaltsüklis, emaka morfoloogias ja süsteemsete steroidide kontsentratsioonid (Nothnick, 2000, 2001). Täheledata ka fertiilsuse ja reproduktiivse eluea lühenemist (Nothnick, 2000, 2001). Üllataval kombel on TIMP-1 negatiivsetel hiirtel täheldatud resistentsust bakteri *Pseudomonas aeruginosa* nakkuse vastu, mida on seostatud suurenenud põletikulise ja komplemendi-sõltuva immuunvastusega (Coussens jt., 2001; Osiewicz jt., 1999).

1.3.2. TIMP-2

TIMP-2 on peamine MMP-de inhibiitor täiskasvanud roti kesknärvisüsteemis (Fager ja Jaworsky, 2000). TIMP-2 on 21 kDa suurune valk, mida sekreteeritakse ekstratsellulaarsesse ruumi. TIMP-2 kodeeriv geen asub 17-ndas kromosoomis ning mRNA on suurusega 1,0-3,5 kb. TIMP-2 inhibeerib kõiki teadaolevaid MMP-sid (Lambert jt., 2004).

Roti kesknärvisüsteemis on TIMP-2 ekspressiooni kirjeldatud paljudes neuronite tüüpides: interneuronites, Purkinje rakkudes ja väikeaju sisemise granulaarkihi neuronites (Rathke-Hartlieb jt., 2000; Vaillant jt., 1999). Ka ajukoores on leitud TIMP-2 ekspressiooni peamiselt neuronites (Pagenstecher jt., 1998; von Gertten jt., 2003).

TIMP-2 ekspresseerub paljudes kudedes ja rakutüüpides konstitutiivselt ja madalal tasemel. Erinevalt TIMP-1-st, ei suurene TIMP-2 ekspressioon neuronite

depolarisatsiooni ja haiguslike muutuste korral (Pagenstecher jt., 1998; Lorenzl jt., 2002; Khuth jt., 2001). Samas on näidatud, et TIMP-2 stimuleerib fibroblastide ja lümfoomirakkude kasvu (Corcoran ja Stetler-Stevenson, 1995; Hayakawa jt., 1994).

TIMP-2 *knockout* hiirtel ei ole selget fenotüüpi. Sellistel hiirtel on pro-MMP-2 aktivatsioon pärsitud, mis on kooskõlas TIMP-2/MT1-MMP kompleksi rolliga pro-MMP-2 aktivatsioonil (Strongin jt., 1995, Caterina jt., 1999; Wang jt., 2000). MMP-2 on hiire normaalseks arenguks mittevajalik ning seetõttu pole täheldatud ka kindlat fenotüübilist efekti, kuid MMP-2 null-hiirtel on täheldatud transplanteeritud kasvajate aeglasemat kasvu ja pärsitud vaskularisatsiooni (Itoh jt., 1998).

1.3.3. TIMP-3

TIMP-3 kodeeriv geen paikneb 22-s kromosoomis. TIMP-3 mRNA on suurusega 2,6-2,4 või siis 5 kb ning valgu molekulmass vastavalt 22 või 27 kDa (Lambert jt., 2004). TIMP-3 erineb teistest TIMP-dest selle poolest, et peale sekretsiooni seostub ta ekstratsellulaarse maatriksiga sulfaaditud glükoosaminoglükaanide kaudu (Yu jt., 2000). Seetõttu inhibeerib TIMP-3 ka rohkem membraaniseoselisi proteaase, nagu näiteks membraani tüüpi matriksiinid (MT-MMP-d; Butler jt., 1997) ja disinegriin-metalloproteasid (ADAM; Amour jt., 1998; Kashiwagi jt., 2001).

Täiskasvanud roti ajus ekspresseerub TIMP-3 TIMP-dest kõige madalamal tasemel. TIMP-3 mRNA on leitud neuronites ajukoorest (Gardner ja Ghorpade, 2003), väikeajust (Vaillant jt., 1999), talamusest, haistesibulast (Jaworsky ja Fager, 2000) ja ajutüvest (Rathke-Hartlieb jt., 2000). Väikeajus ekspresseerub TIMP-3 Purkinje rakkude ja sisemise granulaarkihi neuronites (Vaillant jt., 1999; Rathke-Hartlieb jt., 2000). TIMP-3 valku toodavad kortikaalsed neuronid (Wetzel jt., 2003) ja astrotsüüdid (Muir jt., 2002). TIMP-3 tase tõuseb neuronites varajase katkuviruse infektsiooni (*Canine distemper virus*) korral väga kiiresti (Khuth jt., 2001). Samuti toimub taseme tõus tromboosi korral (Wallace jt., 2001).

TIMP-3 *knockout* on letaalne hingamisteede puuduliku funktsiooni tõttu.

Puudulikkus on detekteeritav kaks nädalat peale sünni ning areneb edasi looma vananedes. Letaalseks muutub defekt 13-ndal kuul. Sünnist alates iseloomustab TIMP-3 *knockout* hiirte kopse vähenenud kollageeni sisaldus, suurenenud kollageeni lagundamine peribronhiaalses ruumis ja kollageeni fibrillide disorganisatsioon alveolaarsetes interstiitsiumides (Leco jt., 2001). TIMP-3 negatiivsetel hiirtel on näidatud ka suurenenud rinnanäärmete epiteelirakkude apoptoosi imetamisjärgse involutsiooni käigus (Fata jt., 2001). TIMP-3 inimestel on seotud lihaste degeneratiivse haiguse Sorsby maopõhimiku düstroofiaga (Weber jt., 1994).

1.3.4. TIMP-4

TIMP-4 kodeeriv geen paikneb 3-ndas kromosoomis, mRNA on suurusega 1,4 kb ning valgu suuruseks on 22 kDa (Lambert jt., 2004). TIMP-4 sekreteeritakse ekstratsellulaarsesse ruumi ning ta inhibeerib MMP-1, -2, -3, -7, -9 (Crocker jt., 2004).

Roti kesknärvisüsteemis on TIMP-4 ekspressiooni näidatud väikeajus, suurajus ja ajutüves (Rathke-Hartlieb jt., 2000; Fager ja Jaworsky, 2000; Rahkonen jt., 2002).

TIMP-4 füsioloogiline roll on ebaselge. TIMP-4 *knockout* hiiri ei ole seni kirjeldatud. On teada, et TIMP-4 kiirendab inimese rinnanäärme kasvaja rakkude paljunemist *in vitro* (Baker jt., 2002) ning inhibeerib jagunemist inimese Wilmsi kasvaja rakkudes (Celiker jt., 2001).

1.3.5. Sünteetilised MMP inhibiitorid

Tänapäeval uuritakse MMP-de inhibeerimist eelkõige võimaliku kasvajatevastase teraapia eesmärgil. Esimesed ühendid, mida rakendati kliinilises katsetes, olid looduslikud MMP-de inhibiitorid (TIMP). TIMP-de võime inhibeerida mitmeid MMP-sid võiks teoreetiliselt viia kasulike terapeutiliste tulemusteni (Ahonen jt., 1998; Bian jt.,

1996), kuid tegelikult, piirab TIMP-de sellist kasutamist efektiivsete rakuteraapia meetodite puudumine. Samas on laialdaselt uuritud ja kliinilistes katsetes testitud sünteetilisi MMP-de inhibiitoreid (Denis jt., 1997; Wojtowicz-Praga jt., 1997; Brown, 1998; Brown, 1999). MMP-de sünteetilised inhibiitorid jagatakse kolme farmakoloogilisse kategooriasse : 1) peptidomimeetilised ja mittevalgulised MMP inhibiitorid, 2) tetratsükliini derivaadid ja 3) bisfosfonaadid (Hidalgo jt., 2001).

Peptidomimeetilised MMP inhibiitorid on pseudopeptiidide derivaadid, mis mimikeerivad kollageeni struktuuri kohtades, kus see seostub MMP-ga (Betz jt., 1997). Selle grupi kõige levinuimad esindajad on batimastaat ja marimastaat.

Batimastaat on esimene MMP inhibiitor, mida kasvajate inhibiitorina on katsetatud. Tegemist on hüdroksaamhappe derivaadiga, mis inhibeerib mitmeid MMP-sid. Loomudelites pärssis batimastaat nii kasvaja enda kasvu kui ka metastaaside teket (Chirivi jt., 1994; Watson jt., 1996). Batimastaadi puudusteks on vähene lahustuvus ja kättesaamatus suukaudse manustamise korral. Katsetatud on ka intrapleuraalset ja intraperitonaalset manustamist, kuid sellised teed ei ole sobilikud pikaajaliseks raviks (Wojtowicz-Praga jt., 1996; Macaulay jt., 1999; Beattie jt., 1998).

Marimastaat on sarnane batimastaadiga, kuid parem on omastamine oraalse manustamise korral. Marimastaat on seni kõige paremini uuritud sünteetiline MMP inhibiitor, mida on ka kõige enam kliinilistelt katsetatud (Millar jt., 1998). Uuringud on näidanud metastaaside vähenemist marimastaadi toimet kopsu- ja rinnavähi mudelites (Wojtowicz-Praga jt., 1998).

Mittevalgulised MMP inhibiitorid on sünteesitud vältimaks peptiidsete MMP inhibiitorite halba omastamine suukaudse manustamise korral (Millar jt., 1998). Keemilise disainiga on saavutatud ühendid, mis on MMP-de spetsiifilised, mis omakorda võimaldab neid kasutada kindlate haiguste raviks (kasvajad ja artriit). Näiteks, MMP-2 spetsiifilised on AG3340, BAY 12-9566 ja BMS-275291 ning MMP-1 spetsiifiline on Ro 32-3555 (Brown, 1999).

Tetratsükliini derivaadid inhibeerivad nii MMP-de aktiivsust kui ka produktsiooni ning kasutatakse seetõttu haiguste raviks, millega kaasneb MMP süsteemi võimendumine (Lokeshwar, 1999; Fife jt., 1997; Seftor jt., 1998; Greenwald jt., 1998). Vastavad ained inhibeerivad mitmeid kollageenaase (MMP-1, -3, -13) ja želatinaase (MMP-2, -9),

kasutades selleks mitmeid erinevaid mehhanisme (Lokeshwar, 1999; Fife jt., 1997; Seftor jt., 1998; Greenwald jt., 1998; Ryan jt., 1996). Mõnede tetratsükliini derivaatide toimet (doksütsükliin ja Col-3) on hinnatud kasvajamudelitel ning nad on leidnud rakendust ka varajastes kliinilistes katsetustes (Hidalgo jt., 2001).

Bisfosfonaadid loodi algselt selleks, et reguleerida kaltsiumi homöostaasi kõrvalekaldeid, kuid nad leidsid hiljem kasutust rinnavähi luu metastaaside ja müeloomtõvega patsientide ravis (Delmas, 1996; Hortobagyi jt., 1996). Nende toimemehhanism on seni ebaselge.

1.3.6. TIMP-de MMP-dest sõltumatud funktsioonid

TIMP-de ekspressiooni analüüsil rottide ja hiirte kudedes ilmnes, et iga inhibiitori ekspressioonimuster ja ajastus on unikaalsed (Young jt., 2002). TIMP-1 on eriti kõrgelt ekspresseeritud sigimiselundkonnas, TIMP-3 südames, neerudes ja tüümuses ning TIMP-4 peamiselt kesknärvisüsteemis. Kõige laialdasemalt on erinevates kudedes ekspresseeritud TIMP-2 ning kõige vähem on üldse TIMP-e maksas (Campbell jt., 1991).

TIMP-d omavad mitmeid MMP-dest sõltumatuid bioloogilisi funktsioone. Näiteks, TIMP-1-l on erütropoeesi aktiveerivad omadused (Gasson jt., 1985). Samuti on TIMP-1 võimeline indutseerima inimese keratinotsüütide kasvu (Bertaux jt., 1991). Samamoodi toimib ta ka paljudele teistele rakutüüpidele (Hayakawa jt., 1992).

Ka TIMP-2 omab erütropoeesi potentseerivat toimet (Stetler-Stevenson jt., 1992) ning aktiveerib mitogeene mitmetele erinevatel rakuliinidel (Hayakawa jt., 1994).

Huvitavalt on TIMP-1 leitud ka rakkude tuumadest (Zhao jt., 1998). TIMP-1 seondub MCF-7 rinnanäärme vähkkasvaja rakkudele ja paigutub tuuma. Samas vähendab TIMP-1, TIMP-2 ja TIMP-3 üleekspressioon mõnedes mudelites kasvajakude kasvu (Gomez jt., 1997; Edwards jt., 1996; Bian jt., 1996; Ahonen jt., 1998; Baker jt., 1999; Valente jt., 1998). TIMP-2 inhibeerib ka bFGF tingitud rakkude kasvu (Murphy jt., 1993) ja osaleb kusejuha punga metanefrilise mesenhüümi kasvu ja morfogeneesi pärssimises (Barash jt., 1995).

On näidatud ka seda, et TIMP-prokatepsiin L kompleks stimuleerib *in vitro*

steroidide geneesi roti testistes ja munasarjades (Boujrad jt., 1995).

2. Rakuväliste proteaaside regulatsioon ja roll neurobioloogias ja – patoloogistes protsessides

2.1. TIMP-d imetajate närvisüsteemis

Nii MMP-de kui ka plasminogeeni aktivatsiooni süsteemi kuuluvad rakuvälised proteaasid täidavad imetajate ontogeneesi käigus mitmeid olulisi rolle (Teesalu jt. 2002; Crocker jt., 2000). Need proteaasid on võimelised lisaks tavapärasele rakuvälise maatriksi lagundamisele ka töötleva bioaktiivseid molekule, mis lisab neile veelgi tähtsust paljudes bioloogilistes funktsioonides (Vu ja Werb 2000).

Arenevas hiire ajuks ekspresseerub kõige enam TIMP-4, millele järgnevad TIMP-2, TIMP-3 ja TIMP-1 (Leco jt., 1997; Young jt., 2002). TIMP-1 ekspresseerub mRNA tasemel kesknärvisüsteemis vaid väga vähesel määral (Vaillant jt., 1999).

TIMP-2 on ekspresseerub neuronites ja astrotsüütides kogu kesknärvisüsteemi ulatuses. Täpsemalt on TIMP-2 tugev ekspressioon detekteeritav suuraju korteksi sügavamates kihtides, haistesibula korteksis, ajutüve suurerakulistest neuronites, anterioorse haru motoneuronites ja väikeaju granulaarsetes neuronites (Pagenstecher jt., 1998; Vaillant jt., 1999; Muir jt., 2002).

TIMP-3 ekspresseerub täiskasvanud hiire ajuks talamuses, subventrikulaarses tsoonis ja haistesibula neuronites ja astrotsüütides (Jaworski ja Fager, 2000), kuid teda on leitud ka soonpõimikust ja *gyrus dentatus* neuronitest (Pagenstecher jt., 1998).

TIMP-4 ekspressiooni kesknärvisüsteemis pole küll palju uuritud, kuid on teada, et TIMP-4 ekspressiooni on pärsitud aju arteriovenoosides väärendites (arterite ja veenide vahel moodustuv veresoonte vahand; Hashimoto jt., 2003).

TIMP-2 ja TIMP-3 esinevad rikkalikult vastsündinu väikeajus (Vaillant jt., 1999). Embrüonaalsetes närvirakkudes on TIMP-3 detekteeritav juba arengu 14 päeval (E14). Hilisemas sünnieelses arengus avaldub TIMP-3 ainult subventrikulaarses alas ajutüve rakkude tuumades. Varases sünnijärgses arengus avaldub TIMP-3 rikkalikult väikeajus, suuraju koostes, talamuses ning ka aju parenhüümis (Jaworsky ja Fager, 2000). Kuna

TIMP-2 ja TIMP-3 ekspresseeruvad rikkalikult neuraalsetes eellasrakkudes, siis see lubab oletada, et nendel valkudel on oma roll neurogeneesis ja rakkude migratsioonis (Vaillant jt., 1999; Jaworski ja Fager, 2000). Mõnedes neist regioonidest ekspresseeruvad koos TIMP-dega ka mitmed metalloproteasid. Seetõttu arvatakse, et proteolüüs reguleerib rakulist adhesiooni, kasvufaktorite mobilisatsiooni ja neuronite kasvu (Chang ja Werb, 2001).

2.2. TIMP-d kasvajate bioloogias

Kasvajateke ehk tumorigenees koosneb paljudest erinevatest etappidest. Kasvajate pahaloomulise kulu olulisteks komponentideks on vähirakkude kontrollimatu proliferatsioon, angiogenees ning metastaseerumiseni viiv koebarjäärde ületamine ja rakuinvasioon. TIMP-d ja MMP-d on seotud kõikide nende protsessidega. MMP/TIMP tasakaal määrab ekstratsellulaarse maatriksi lagundamise või püsijäämise ja bioloogilised omadused. Aktiivsete MMP-de ülehulga tulemuseks on rakuvälise maatriksi lagundamine, mis viib kasvaja invasiooni ja siirete tekkimiseni (Hicks jt., 1984; Liotta jt., 1991; Tanaka jt., 1995).

MMP-sid ja TIMP-e on uuritud nii normaalsetes kui ka kasvajate kudedes (Yoshiji jt., 1996; Ree jt., 1997). TIMP-de ekspressiooni tase mõjutab kasvajate invasiooni ning MMP-de aktiivsust ja ekstratsellulaarse maatriksi seisundit (Visscher jt., 1994; Airola jt., 1999). TIMP-de MMP-sid inhibeeriv aktiivsus kasvaja levimisel on selgelt kinnitust leidnud nii *in vitro* kui ka *in vivo* katsetes. Nii TIMP-1 kui ka TIMP-2 pärssumist seostatakse kasvajate suurenenud invasiivsusega ning nende üleekspressiooni kasvajate kasvu aeglustumise ja siirete tekke vähendamisega erinevat tüüpi kasvajates (DeClerck jt., 1992; Albini jt., 1991; Khokha jt., 1989).

MMP-de üleproduktsiooni seos kasvaja levimisega on loonud erinevaid strateegiaid, mis aitaksid blokeerida MMP-de proteolüütilist aktiivsust. Püütakse leida uusi kasvajatevastaseid ravivõtteid, kasutatades ekstratsellulaarse maatriksi ensümaatilise lagundamise pärssimist. Uuringud MMP-de grupispetsiifiliste inhibiitoritega on näidanud, et oodatud kasvajavastase toimega kaasnevad tõsised

kõrvalmõjud ja seetõttu on hetkel prioriteediks pigem ühe kindla MMP suhtes spetsiifiliste, mitte aga grupispetsiifiliste molekulide väljatöötamine (Coussens jt., 2002; Overall ja Lopez-Otin, 2002). Sihtmärkidena püütakse kasutada just MMP-de transkriptsiooni-, aktivatsiooni- ja inhibitsioonimehhanisme, mis on nende ensüümide kolm põhilist endogeense regulatsiooni taset (Hicks jt., 1984; Liotta jt., 1991; Tanaka jt., 1995).

3. Töö eesmärgid

Käesoleva töö eesmärk on luua süstemaatiline iseloomustus TIMP-1, -2, -3, -4 ekspressiooni kohta normaalses inimese kesknärvisüsteemis. Selleks hinnati TIMP-de ekspressiooni inimese kesknärvisüsteemi 11-s olulisemas anatomsilises struktuuris, kasutades selleks immuuno-histokeemilist analüüsi, *in situ* hübridisatsiooni ja *Western blot* meetodit. Saaadud tulemuste kvantitatiivseks iseloomustamiseks tehti Q-PCR analüüs.

EKSPERIMENTAALNE OSA

4. Materjal ja meetodika

4.1. Kasutatud koed

Süstemaatiliseks TIMP 1-4 geeniekspressiooni analüüsiks suurel hulgal koeproovidel nii valgu kui ka mRNA tasemel loodi kudede mikrokiibid. Koekiipide valmistamiseks kasutati spetsiaalset seadet (Beecher Instr, USA), mille abil kanti 0,6 mm diameetriga ning kuni 7 mm pikkused koetsüdamikud parafiinsisestatud doonorplokkidest parafiinist retsipientplokki. Koekiibid valmistati normaalse kesknärvisüsteemi (seljaaju, tagaaju, keskaju, vaheaju, suuraju poolkerade, basaalganglioni, limbilise süsteemi ja 7 muu aju struktuuri; lisa 2-9) kuni 40 erinevast lokalisatsioonist neuropatoloogiliste lahangute käigus saadud materjalist. Koekiipidest valmistati 5 µm paksused koelõigud, millel viidi läbi immuuhistokeemilised reaktsioonid ning geeniekspressiooni analüüs *in situ* hübridiseerimise meetodit kasutades.

TIMP 1-4 geeniekspressiooni hindamiseks reaalaaja PCR ja *Western blot* meetodil uuringus kasutatud patoanatomiliste lahangute käigus kogutud inimese normaalsed pea- ja seljaaju koed saadi Tartu Ülikooli Kliinikumi koepangast. Tükid suurusega 0,2-0,5 g külmutati vedelas lämmastikus ning säilitati -84°C juures sügavkülmas.

4.1.1. *In situ* hübridisatsioon

4.1.1.1. RNA eraldamine kudedest

RNA eraldati koest TRIzol-iga (Chomczynski ja Sacchi, 1987) 0,2-0,5 grammine platsenta tükk purustati uhmri ja nua abil vedelas lämmastikus pulbriks. Pulbristatud koele lisati 3 ml TRIzol-i (Invitrogen) ning homogeniseeriti jääl hoides kuni suuremate osakeste kadumiseni (15-20 korda). Tsentrifuugiti Sorval SS-34 rootoriga 10000 g +4°C 10 minutit, et eemaldada rasvad ja teised mittelahustuvad materjalid. Supernatant kanti ettevaatlikult üle puhtasse tuubi. Proove inkubeeriti 5 minutit toatemperatuuril, et lasta nukleoproteiini kompleksil dissotseeruda. Lisati 0,6 ml kloroformi (Naxo), loksutati intensiivselt 15-20 sekundit ning inkubeeriti 2-3 minutit toatemperatuuril. Proove

tsentrifuugiti 12000 g juures +4°C 15 minutit. Ülemine vesifaas kanti üle uude tuubi. Supernatandile lisati 1,5 ml isopropanooli, segati vorteksil ja inkubeeriti 10 minutit toatemperatuuril. Proove tsentrifuugiti uuesti 12000 g juures +4°C 10 minutit, eemaldati supernatant. RNA sadet pesti 6 ml 75% etanooliga (lahjendatuna DEPC töödeldud vees), tsentrifuugiti 7500 g +4°C 5 minutit. Supernatant eemaldati ning sadet kuivatati toatemperatuuril umbes 10 minutit. RNA sade suspendeeriti üles 100 µl DEPC-ga töödeldud vees. RNA kvaliteeti hinnati 1% RNA geelil ja spektrofotomeetrial ($A_{260/280} < 1,6$).

4.1.1.2. RNA geeli elektroforees

0,8%-line RNA geel sisaldas 1,6 grammi agarooosi ja 170 ml destilleeritud vett, 20 ml 20X RNA puhvrit (MOPS 0.4M, Na atsetaat 80mM, EDTA 10mM) ja 40 ml formaldehüüdi.

RNA proovide ettevalmistamiseks kuumutati neid 10 minutit 62°C juures ning jahutati seejärel jääl. Foreesi jaoks kasutati 1X RNA puhvrit ning firma Biorad foreesivanni. Geelil elektroforeesiti ligikaudu 2 tundi 5 V/cm.

4.1.1.3. DNAasi töötlus

RNA proovide puhastamiseks DNA-st kasutati DNAasi töötlust. Reaktsioon viidi läbi 300 µl mahus, mis sisaldas 1/10 RNA proovi (punkt 4.1.1.1.), 1/10 DNAasi puhvrit (100mM Tris pH 7,5, 25 mM MgCl₂ ja 5mM CaCl₂) ja 1/100 DNAasi (Fermentas) ning ülejäänud mahus mQ vett (237 µl). Inkubeeriti 30 minutit 37°C. Lisati EDTA (Riedel-de Haën) lõppkontsentratsioonini 5mM ning kuumutati 5 minutit 75°C. Sadestamiseks lisati 6 µl 1M DTT-d, 30 µl 6M ammooniumatsetaati (Riedel-de Haën), 750 µl 99%-list etanooli ning inkubeeriti 1 h -80°C. Tsentrifuugiti tsentrifuugiga Eppendorfi Centrifuge 5415 C maksimumpööretel +4°C 25 minutit. Eemaldati supernatant ning sadet pesti 1 ml 75% etanoolis, segati vorteksil ning tsentrifuugiti maksimumpööretel +4°C juures 10 minutit. Eemaldati koheselt supernatant ning kuivatati sadet 10 minutit toatemperatuuril. Sade suspendeeriti üles 10 µl DEPC vees ning mõõdeti spektrofotomeetriga optilised tihedused lainepikkustel 260/280 ja 260/230 nm.

4.1.1.4. cDNA süntees

cDNA süntees viidi läbi Revert Aid T14 First Strand cDNA Synthesis Kit-ga (Fermentas; #K1622), kasutades oligo(dt)₁₈ praimerit ning RNA-d koguses 1-0,43 µg.

4.1.1.5. PCR

In situ hübridisatsiooni proovide sünteesiks vajalikke DNA järjestuste kloonimiseks disainiti praimerid internetipõhise programmi Primer3 abil ning telliti firmast TAG Copenhagen A/S. Kasutatud praimerid sisaldasid kloonimise hõlbustamiseks *KpnI* ja *SacI* saite.

Praimerite järjestused:

TIMP-1: 5'-ATAGGTACCGACACCAGAGAACCCACCAT-3`

5'- ATAGAGCTCTTGCAGGGGATGGATAAACA-3`

Amplikoni pikkus: 499 aluspaari

TIMP-2: 5'-ATAGGTACCTCCAAGGGTTTCGACTGGT-3`

5'-ATAGAGCTCGTGCTGGGAGCTCATGGT-3`

Amplikoni pikkus: 492 aluspaari

TIMP-3: 5'-ATAGGTACCAACTTTGGAGAGGCGAGCAG-3`

5'-ATAGAGCTCAGCAGGACTTGATCTTGCAG-3`

Amplikoni pikkus: 499 aluspaari

TIMP-4: 5'-ATAGGTACCAGTGCTTCCCCTCTGCTTC-3`

5'-ATAGAGCTCTTTCAGTGTCAGCAGGGTCT-3`

Amplikoni pikkus: 499 aluspaari

PCR-i reaktsioon viidi läbi 20 µl segus: 1X PCR-i puhver (Naxo), 1,5 mM MgCl₂ (Naxo), 0.2 mM dNTP (Fermentas), 0.2 uM praimerit, 0.2 U Taq polümeraas (Naxo), 2 µg cDNA, mQ vett.

PCR-i viidi läbi masinaga Mastercycler (Eppendorf) järgmistel tingimustel:

eeldenaturatsioon	98°C 2 minutit
denaturatsioon	96°C 30 sekundit
praimertite seostumine	54°C 30 sekundit
elongatsioon	72°C 1 minut
temperatuur säilitatakse	21°C

Tsükli arv oli 35.

PCR-i produktide pikkust kontrolliti agarosgeelelektroforeesil.

4.1.1.6. Agarosgeelelektroforees

1%-line agarosgeel sisaldas 1 g agarosi ja 100 ml 1X TAE puhvrit (Naxo) ning 10 µl etiidium bromiidi (10 mg/ml). DNA proovide geelile kandmiseks kasutati värvi 6X DNA Loading Dye Solution (Fermentas) ning suuruse markerina Fermentase GeneRuler 100bp DNA Ladder`it.

4.1.1.7. DNA sadestamine

PCR-i produkt sadestati lisades 1/10 mahtu naatriumatsetaati (Riedel-de Haën) ja 2,5 mahtu külma 99 % etanooli. Proove inkubeeriti 10 minutit -20°C ning tsentrifuugiti Eppendorf Centrifuge 5415 C maksimum pööretel 20 minutit 4°C juures. Supernatant eemaldati koheselt peale tsentrifuugimist ning sadet pesti 1 ml 70% etanooliga. Proove tsentrifuugiti uuesti maksimum pööretel 2 minutit 4°C juures, supernatant eemaldati ning sadet kuivatati 37°C juures 15 minutit. Sade lahustati vees.

4.1.1.8. Restriksioon

Sadestatud PCR-i produkti ja 1µg vektorit pBluescript II SK (+) (Fermentas) lõigati 1 h 37°C restriктаasidega *KpnI* ja *SacI* (Fermentas) 2x Yellow Tango Buffer-is (Fermentas).

Kloneerimisel saadud plasmide kontrolliti restriksioonanalüüsiga. Reaktsioon viidi läbi 20 µl mahus ning segu sisaldas 1/10 DNA-d, 1/10 kollast Tango 1X puhvrit (Fermentas), 1/40 restriктаasi *KpnI* (Fermentas) 1/40 restriктаasi *SacI* (Fermentas)

ning ülejäänud mahus mQ vett.

Restriktsioon toimus 37°C juures 1h ning saadud DNA bändid lahutati 1%-lisel agarosgeelil. DNA suuruse markerina kasutati 100bp DNA Ladder (Fermentas).

In situ hübridisatsiooni proovide sünteesimiseks lineariseeriti plasmiidid 600 µl mahus üleöö 37°C. Restriktsiooni segu koosnes 1/10 sinisest restriktsiooni puhvrast (Fermentas), 30 µg DNA, 60 U restriktaasi *KpnI* või *SacI* (Fermentas) ning mQ veest.

4.1.1.9. DNA eraldamine geelist

Restrikteeritud DNA eraldati TAE geelist komplektiga DNA Purification Kit From Agarose Gels and Solutions (Mo Bio Laboratories, Inc.) vastavalt tootja protokollile.

4.1.1.10. Ligeerimine

Geelist eraldatud inserti ligeeriti vektorisse pBleuscript II SK (+) (saadud M. Kivisaar) 2 h 25°C. 20µl ligeerimisseguga sisaldas 2 U T4 DNA ligaasi (Fermentas), 1µl ATP-d (Fermentas), 1X ligaasi puhvrit (Fermentas), 100 ng vektorit, 300 ng inserti ning mQ vett.

Töös kasutaud plasmiidid on esitatud tabelis 1.

Tabel 1. Töös kasutatud plasmiidid.

Plasmiid	Iseloomustus
pBluescript SK (+)	Kloneerimisvektor (Fermentas)
pSK TIMP-1	pBluescript SK (+) polükloorinmissaidi <i>KpnI</i> ja <i>SacI</i> restriktsioonisaitide vahele kloneeritud TIMP-1 cDNA järjestuse aluspaarid 76-575 (referentsjärjestus nr

	BC007097)
pSK TIMP-2	pBluescript SK (+) polükloorermisaidi <i>KpnI</i> ja <i>SacI</i> restriksioonisaitide vahele klooreritud TIMP-2 cDNA järjestuse aluspaarid 1007-1499 (referentsjärjestus nr NM_003255)
pSK TIMP-3	pBluescript SK (+) polükloorermisaidi <i>KpnI</i> ja <i>SacI</i> restriksioonisaitide vahele klooreritud TIMP-3 cDNA järjestuse aluspaarid 1139-1639 (referentsjärjestus nr NM_000362)
pSK TIMP-4	pBluescript SK (+) polükloorermisaidi <i>KpnI</i> ja <i>SacI</i> restriksioonisaitide vahele klooreritud TIMP-4 cDNA järjestuse aluspaarid 13-513 (referentsjärjestus nr NM_003256)

4.1.1.11. Kompetentide valmistamine

Kompetensete rakkude valmistamiseks kasutati *E. coli* tüve XL1-Blue (saadud P. Petersonilt). Baktoreid kasvatati üleöö 1ml Luria-Berthani (LB) söötmes (Naxo) 37°C loksutil. Järgmisel päeval külvati inokulum edasi 100 ml LB-söötmesse ning kasvatati kultuuri 37°C loksutil nii kaua kuni rakud on kasvanud tiheduseni $OD_{600}=0,6$. Rakud sadestati Sorvalli tsentrifuugiga 4°C juures 10 minutit kiirusega 2700 G (rootor SS-34) ning suspenderiti üles 10 ml 80mM $MgCl_2$ (Riedel-de Haën)-20mM $CaCl_2$ (Riedel-de Haën) lahuses ja hoiti jääl 15 minutit. Rakud sadestati uuesti Sorvalli tsentrifuugiga 4°C juures 10 minutit 2700 G juures (rootor SS-34). Rakud

suspendeeriti uuesti üles 2 ml 100 mM CaCl₂ (Riedel-de Haën) lahuses ja hoiti jääl 1 h. Lõpuks lisati rakkudele glütserooli (Riedel-de Haën) lõppmahuga 15% ning tõsteti 100 µl kaupa 1,5 või 2 ml katsutitesse. Rakud külmutati vedelas lämmastikus ning säilitati -70°C külmikus.

4.1.1.12. Transformatsioon

-70°C hoitud kompetendid pandi jääle sulama. Lisati 10 µl ligatsioonisegu DNA-d. Segu hoiti jääl 30 minutit. Rakke kuumutati („kuuma šokk”) 90 sekundit 42°C juures ning jahutati seejärel 1-2 minutit jääl. Lisati 800 µl LB söödet ning inkubeeriti 37°C 45 minutit. Seejärel fuugiti rakud põhja Eppendorfi fuugiga Centrifuge 5415 C5 minutit 6000 pööret/min. Rakud plaaditi LB söötmele, millele oli lisatud 100µg/ml ampitsilliini (Balkanpharma), 75µg/ml 5-bromo-4-kloro-3-indolül-beeta-D-galaktopüranosiidi (X-GAL) (Riedel-de Haën). Rakke inkubeeriti 37°C termostaadis ca 24 h.

4.1.1.13. DNA eraldamine rakkudest aluselise lüüsi meetodil

DNA eraldati rakkudest aluselise lüüsi meetodil (Sambrook ja Russel, 2001).

4.1.1.14. DNA eraldamine rakkudest suures mahus

DNA eraldamiseks suures mahus kasutati firma Qiagen komplekti Plasmid Midi Kit (25) ning eraldamine teostati vastavalt tootja protokollile.

4.1.1.15. DNA restriksioonijärgne puhastamine

In situ hübridisatsiooni proovide jaoks restrikteeritud DNA puhastati fenooltöötusega. Lisati 0,25 mahtu fenooli (Riedel-de Haën) ja 0,25 mahtu kloroformi (Naxo). Tsentrifuugiti maksimum pööretel 5 minutit. Vesifaas tõsteti uude katsutisse, lisati 0,5 mahtu kloroformi. Tsentrifuugiti uuesti maksimum pööretel 5 minutit. Kloroformiga puhastamist korrati veel kaks korda. DNA sadestati ja lahustati mQ vees.

4.1.1.16. *In situ* hübridisatsioon

In situ hübridisatsioon viidi läbi närvikoe kiipidel vastavalt artiklis Teesalu jt., 1996 toodud protokollile. Riboproovi sünteesi reaktsioon viidi läbi 15 µl segus: 1X transkriptsioonipuhvrit, 10 mM ATP, 10mM GTP, 10mM CTP, 30 U RNase inhibiitorist (Fermentas), 10mM DTT, 1 µg lineariseeritud plasmidi (table 1), 0,75 U RNA polümeraasi, 1,300 Ci/µmol 35S-UTP (GE Healthcare Bio-Sciences). Segu inkubeeriti 1 tund 37°C juures. Igale reaktsioonile lisati 0,5 µl DNase I (Fermentas) ning inkubeeriti veel 15 min 37°C juures. Lisati 15 µl pärmi tRNA segu, mis koosnes 0,3 µg tRNA ja veest. Seejärel lisati kohele 40 µl aluselist lahust A (80mM NaHCO₃, 120 mM Na₂CO₃, 10 mM DTT (Naxo)) ning inkubeeriti 1 tund 60 °C juures. Lisati 40 µl aluselist lahust B (0,2M Na atsetaat, 1% äädikhape, 10mM DTT). Proov puhastati seondumata nukleotiididest filtratsiooniga läbi Sephadex G-50 kolonni (Roche Biochemicals) tsentrifuugides 3 min 1000G. Proov sadestati 5mM DTT, 0,5M ammooniumatsetaadi ja 70% etanooli lisamisega. Inkubeeriti 1 tund -80 °C. Tsentrifuugiti 4 °C 20 min maksimum pööretel. Sadet pesti 75% etanooliga, kuivatati ruumitemperatuuril ja suspendeeriti üles 50 µl 20mM DTT/DEPC-ga töödeldud vees. Segati kokku hübridisatsiooni proov, mis koosnes 50000dpm 35S-UTP-ga märgistatud proovist, 50% formamiidist, 20mM TRIS-st (pH8,0), 5mM EDTA-st (pH=8,0), 1X Denhardt-st, 10mM DTT-st, 0,5 mg/ml pärmi tRNA-st, 10mM naatriumfosfaatpuhvrist (pH=7,5), 0,3M NaCl, 10% Na dekstraansulfaadist. Proov denatureeriti 80 °C 2 min, jahutati ning kanti deparahviniseeritud koekiibi slaididele. Proove inkubeeriti 58 °C 16-18 tundi niiskuskambris.

Slaidid pesti 0,5X SSC, 0,141% β-merkaptetanooli lahusega toatemperatuuril, inkubeeriti 30 min 65 °C 50% formamiid, 2X SSC, 0,141 β-merkaptetanooli lahuses. Pesti 2 tundi pesulahusega (0,5 M NaCl, 10mM TRIS, 5mM EDTA, 20 µg/ml RNase A). Inkubeeriti 30 min 65 °C 50% formamiid, 2X SSC, 0,141 β-merkaptetanooli lahuses. Pesti 2X SSC lahusega 15 min toatemperatuuril ning seejärel 0,1X SSC 15 min toatemperatuuril. Slaidid dehüdreeriti etanooliga (30%, 60%, 80%, 96%) ning kuivatati.

Mikrokiibi slaidid kaeti autoradiograafilise emulsiooniga (Amersham RPN40) täielikus pimeduses, pakiti karpidesse ning inkubeeriti 4 nädalat 4 °C juures.

Slaidid ilmutati kasutades Kodaki ilmutit D19 ja kinnitit (CAT 5221338) ning seejärel värviti toluidiinsinisega ja kaeti katteklaasiga.

Klaase analüüsiti mikroskoobiga Nikon Eclipse E400 pimeväljas. Tulemuste hindamisel kasutati prof. Andres Kulla abi. Fotografeerimiseks kasutati Olympus Camedia C3030 digitaalkaamerat.

4.1.2. Immuuno-histokeemilised uuringud koekiipidel.

Kudede mikrokiibid valmistati nagu kirjeldatud punktis 4.1. 6µm parahvini lõigud deparafiniseeriti. Immuuno-histokeemilised reaktsioonid viidi läbi nii manuaalselt kui ka automatiseeritult. Selleks inkubeeriti eelnevalt deparafiniseeritud koekiipide lõike primaarsete antikehadega 60 min. jooksul niiskuskambris toatemperatuuril. Negatiivseid kontroll-lõike inkubeeriti primaarse antikeha asemel mitteimmuunse hiireseerumiga. Pärast loputamist 0,5M TRIS/HCl-ga inkubeeriti lõike kitselt pärinevate hiire/küüliku vastaste biotinüleeritud immuunglobuliinidega 20 min., millele järgnes inkubatsioon StreptABComplex/HRP-ga 20 min jooksul. Pärast loputamist Tris-puhvril värviti lõike kromogeeniga 3,3'-diaminobensidiin (DAB), tuumad värviti hematoksüliiniga ning lõigud sulundati Entellan-i (Merck). Slaidide automatiseeritud värvimiseks kasutati masinat Dako Cytomation Autostainer Plus ning kitti Dako REAL EnVision Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse vastavalt tootja protokollidele. Slaidide töödeldi eelnevalt 3% vesinikperoksiidi lahusega 5 minutit, et blokeerida kudede endogeense peroksidaasi mõju. Kasutatud antikehade lahjendused olid TIMP-1 1:40 (Calbiochem; IM32L), TIMP-2 1:1000 (Calbiochem; IM11L), TIMP-3 1:1000 (Calbiochem; IM43L), TIMP-4 1:120 (AbCam).

4.2. Q-PCR

4.2.1. Töös kasutatud närvisüsteemi lokaliseerimised

Töös analüüsitud närvisüsteemi lokaliseerimised on esitatud tabelis 2.

Tabel 2. Töös analüüsitud närvisüsteemi lokaliseerimised.

nr	Lokaliseerimine (erinevatelt lahingutelt saadud kudede arv)
1	Seljaaju (3)
2	Väikeaju, ajukoor (3)
3	Talamus, vaheaju (3)
4	Hüpofüüs, vaheaju (3)
5	Frontaalsagar, hallaine (suuraju koor) (3)
6	Frontaalsagar, valgeaine (3)
7	Mandeluum (Amygdala) (3)
8	Hipokampus, limbiline süsteem (3)
9	Sabatuum (Nucleus caudatus) (3)
10	Soonpõimik (3)
11	Ajupõhimiku arterid (3)

4.2.2. RNA eraldamine kudedest ja cDNA süntees

RNA eraldamine, RNA geeli elektroforees, DNAasi töötlus ning cDNA süntees viidi läbi nagu kirjeldatud punktides 4.1.1.1.-4.1.1.4.

4.2.3. Praimerite disain

Kvantitatiivse PCR-I (Q-PCR) jaoks vajalikud praimerid disainiti programmiga Primer Express ning telliti firmast TAG Copenhagen A/S.

Praimerite järjestused:

TIMP-1: 5`-GCA GGA TGG ACT CTT GCA CAT-3`

5`-TTG CAG GGG ATG GAT AAA CA-3`

Amplikoni pikkus: 146 aluspaari

TIMP-2: 5`-TCA CCC TCT GTG ACT TCA TCG T-3`

5`-GGA GGA GAT GTA GCA CGG GA-3`

Amplikoni pikkus: 133 aluspaari

TIMP-3: 5`-CTG ACA GGT CGC GTC TAT GA-3`

5`-AGC AGG ACT TGA TCT TGC AG-3`

Amplikoni pikkus: 142 aluspaari

TIMP-4: 5`-AAG CTG GGT GCT GTT GCT-3`

5`-TTT CAG TGT CAG CAG GGT CTG-3`

Amplikoni pikkus: 179 aluspaari

HPRT: 5`-AGT CTG GCT TAT ATC CAA CAC TTC G-3`

5`-GAC TTT GCT TTC CTT GGT CAG G-3`

Amplikoni pikkus:100 aluspaari

4.2.4. Q-PCR

Kvantitatiivse PCR-i reaktsiooni läbiviimiseks kasutati firma ABGene kitti Absolute QPCR Green Rox Mix. Reaktsioon viidi läbi 10 µl segus: 5 µl SYBR Green segu, 200 nM mõlemat praimerit, 20 ng cDNA-d, vesi.

Reaktsioon viidi läbi firma Applied Biosystems seadmega 7900HT Fast Real-Time PCR System.

4.3. Western blot

Geeniekspressiooni analüüs valgu tasemel *Western blot* meetodil viidi läbi tabelis 2 loetletud inimese normaalsetel pea- ja seljaaju kudedel, mis saadi Tartu Ülikooli Kliinikumi koepangast. 0,2-0,5 g koele lisati 0,5 ml lüüsilahust (1mM EGTA (Sigma), 1 mM DTT (Sigma), 5mM HEPES (Sigma), 0,1% Triton X-100 (Sigma); pH 8,7 KOH-ga) ning uhmerdati peenemaks. Seejärel purustati ultraheliga (Bandelin Sonoplus) 15 sek 5 intervalli 40% tugevusega kaks korda. Hoiti jääl 1 tund, tsentrifuugiti Eppendorfi tsentrifuugis Centrifuge 5415 C 4000g 20 min jooksul 4°C juures. Supernatandi valgu kontsentratsioon mõõdeti kasutades firma Pierce toodet

BCA Protein Assay Kit.

Valgu geel valmistati vastavalt Laemmli meetodile (Ausubel jt., 2002), . separeeriva geeli kontsentratsioon oli 10% ja kontsentreeriva geeli kontsentratsioon 3,9%.

Geelile kanti 50µg valku, mis oli kokku segatud kolme erineva doonori proovidest (iga doonori valku 16,6 µg) ning lahjendati 1:1 2X SDS puhvris (1/4 mahtu 4X Tris-Cl/SDS pH 6.8, 20% glütserooli (Riedel-de-Haën), 4% SDS (Fluka), 0,2M ditiotreitol (Sigma), 0,001% broomfenoolsinist (Naxo)). Proove kuumutati 5 min 96°C juures ning kanti seejärel geelile. Molekulaarmassi määramiseks kasutati firma Fermentas Prestained Protein Molecular Weight Marker`it.

Valgu ülekandmiseks geelist filtrile kasutati firma Biorad masinat, kus valgud kanti geelilt PVDF membraanile (Millipore) kasutatades Semidry puhvrit (24 mM TRIS (AppliChem), 192 mM glütsiin (AppliChem), 20% metanool (Naxo)). Ülekanne toimus firma Bio-Rad laboratories masinaga Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell vastavalt valmistaja protokollile voolutugevuse 0,8mA/cm² 30 min kestel.

Peale ülekannet pesti membraani TTBS puhvris (100mM Tris (pH=7,5; AppliChem), 150mM NaCl, 0,1% Tween 20 (Naxo)). Valgu mittespetsiifiliste seondumiskohtade blokeerimiseks inkubeeriti üleöö loksutil Labnet Orbit LS 4°C juures 2,5% lõssipulbri TTBS lahuses. Primaarse antikehana kasutati firma Calbiochem TIMP-1 (1:10000), TIMP-2 (1:20000), TIMP-3 (1:20000) ja firma AbCam TIMP-4 (1:500) vastaseid antikehi, mis lahjendati 2,5% lõssitubri TTBS lahuses ning inkubeeriti 1 tund toatemperatuuril. Enne sekundaarse antikeha lisamist pesti membraani 3X10 minutit 2,5% lõssipulbri TTBS lahuses. Sekundaarse antikehana kasutati peroksüdaasiga konjugeeritud hire IgG vastast antikeha (lahjendusega 1:10000) 2,5% lõssipulbri TTBS lahuses, millega inkubeeriti 1 tund toatemperatuuril. Seejärel pesti membraani 3X15 minutit 2,5% lõssipulbri TTBS lahuses.

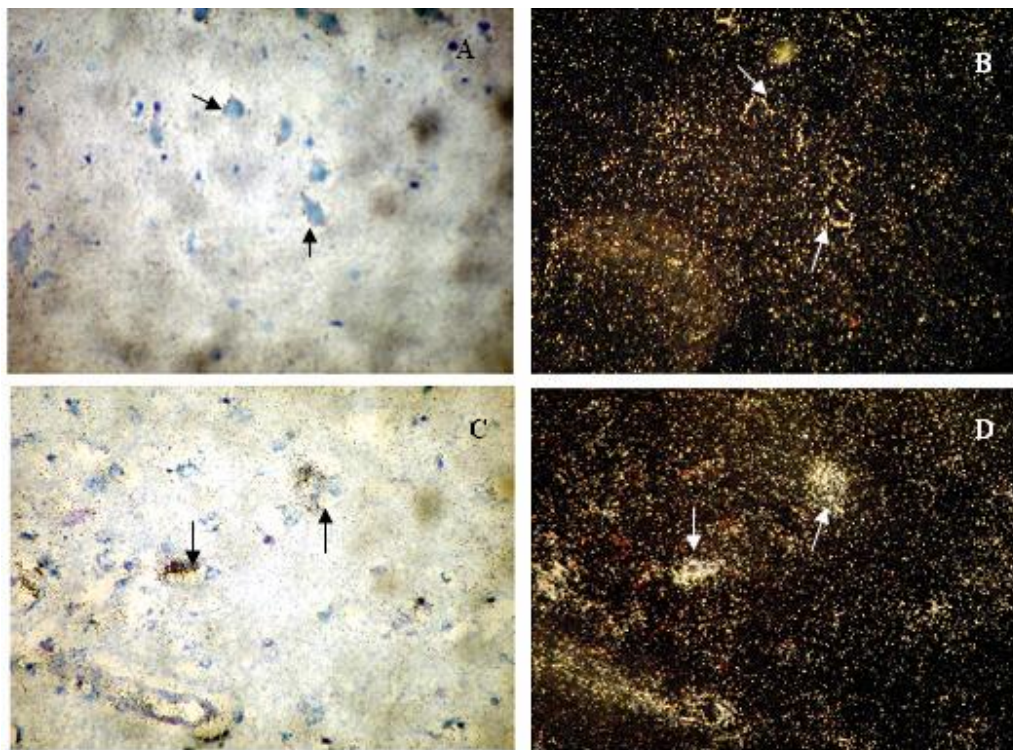
Signaalide detekteerimiseks kasutati firma GE Healthcare ECL Advance Western Blot Detection Kit`i ning röntgenfilmi (Fuji).

5. Tulemused

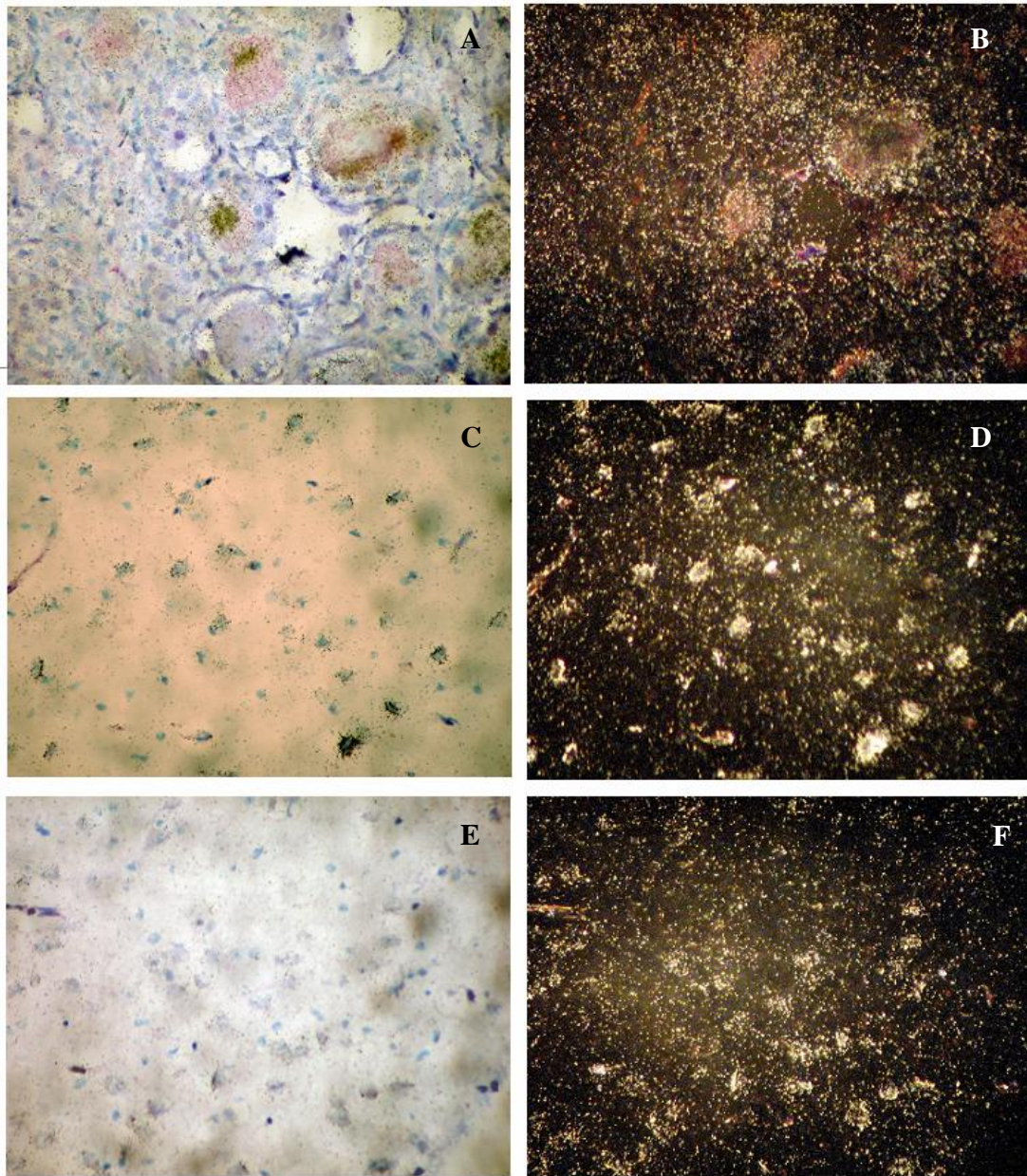
5.1. *In situ* hübridisatsioon

Kesknärvisüsteemis analüüsiti TIMP-de ekspressiooni kuuel erineval normaalse närvisüsteemi mikrokiibil. *In situ* hübridisatsiooni proovide sünteesimiseks kloonitati metalloproteasaaside inhibiitorite 500 bp cDNA-de järjestused plasmidi pBluescript SK (+) polükloorimissaiti KpnI ja SacI restriksioonisaitidesse. Kloonitud järjestusi kontrolliti sekveneerimisega, milleks kasutati firma GeneArt teenust.

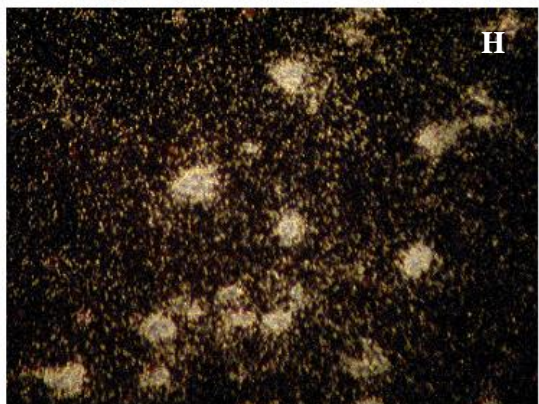
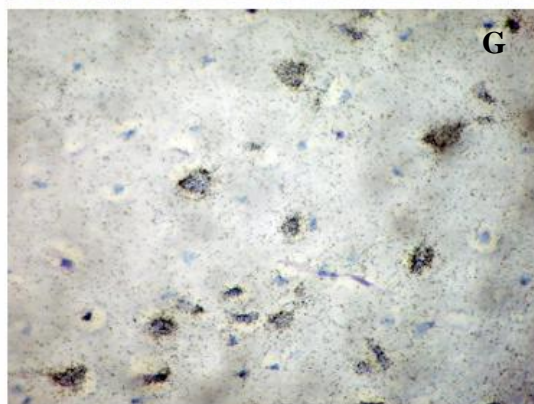
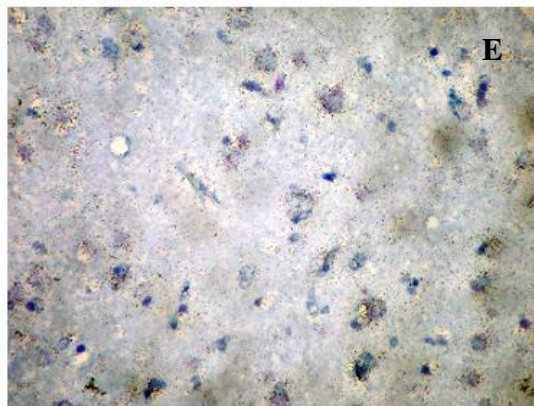
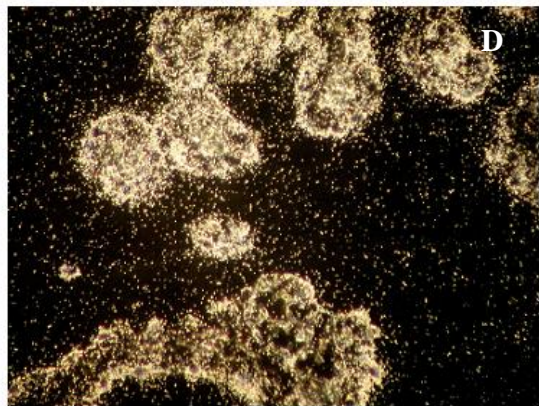
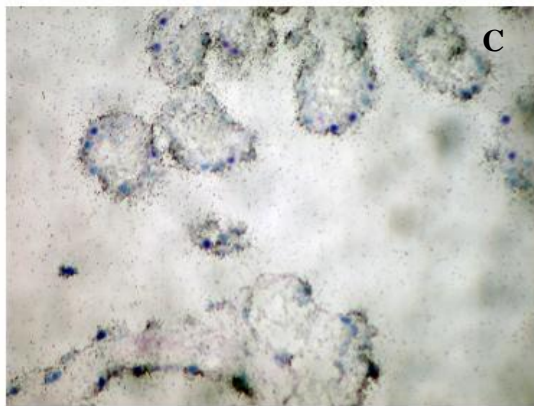
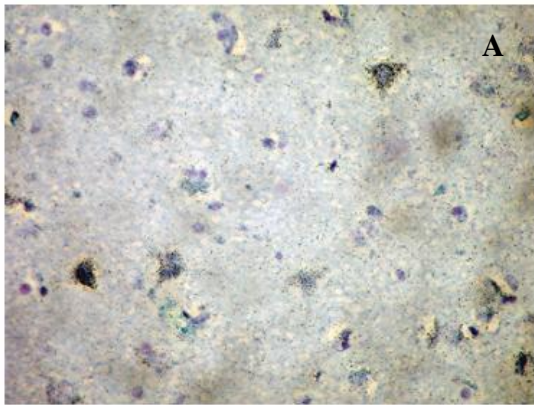
In situ hübridisatsiooni tulemuste hindamise tabelid on kokku võetud tabelites 4-7 (lisad 2-5) ning neid illustreerivad mikrofotod joonistel 4-7.



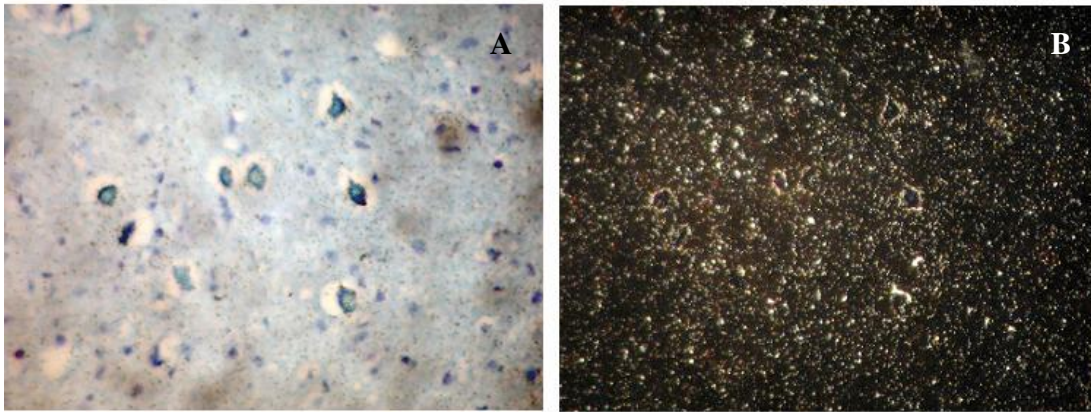
Joonis 4. TIMP-1 ekspressioon inimese kesknärvisüsteemi koekiipidel *in situ* hübridisatsiooni meetodil. Esitatud on pimevälja (B, D) ja traditsioonilised (A, C) mikrofotod. TIMP-1 ekspresseerub olivaartuumade (A, B) ja mustaine (C, D) neuronites. Suurendus x 400



Joonis 5. TIMP-2 ekspressioon inimese kesknärvisüsteemi koekiipidel *in situ* hübriidsatsiooni meetodil. Esitatud on pimevälja (B, D, F) ja traditsioonilised (A, C, E) mikroftod. TIMP-2 ekspresseerub dorsaalse juure spinaalganglioni (A, B), hipokampuse (C, D) ja ajusilla (E, F) neuronites. Suurendus x400



Joonis 6. TIMP-3 ekspressioon inimese kesknärvisüsteemi koekiipidel *in situ* hübriidsatsiooni meetodil. Esitatud on pimevälja (B, D, F, H) ja traditsioonilised (A, C, E, G) mikrofotod. TIMP-3 ekspresseerub mandeltuuma (A, B), soonpõimiku (C, D), oimusagara hallaine (E, F) ning taalamuse frontaalse mediaalse tuuma (G, H) neuronites. Suurendus x 400.

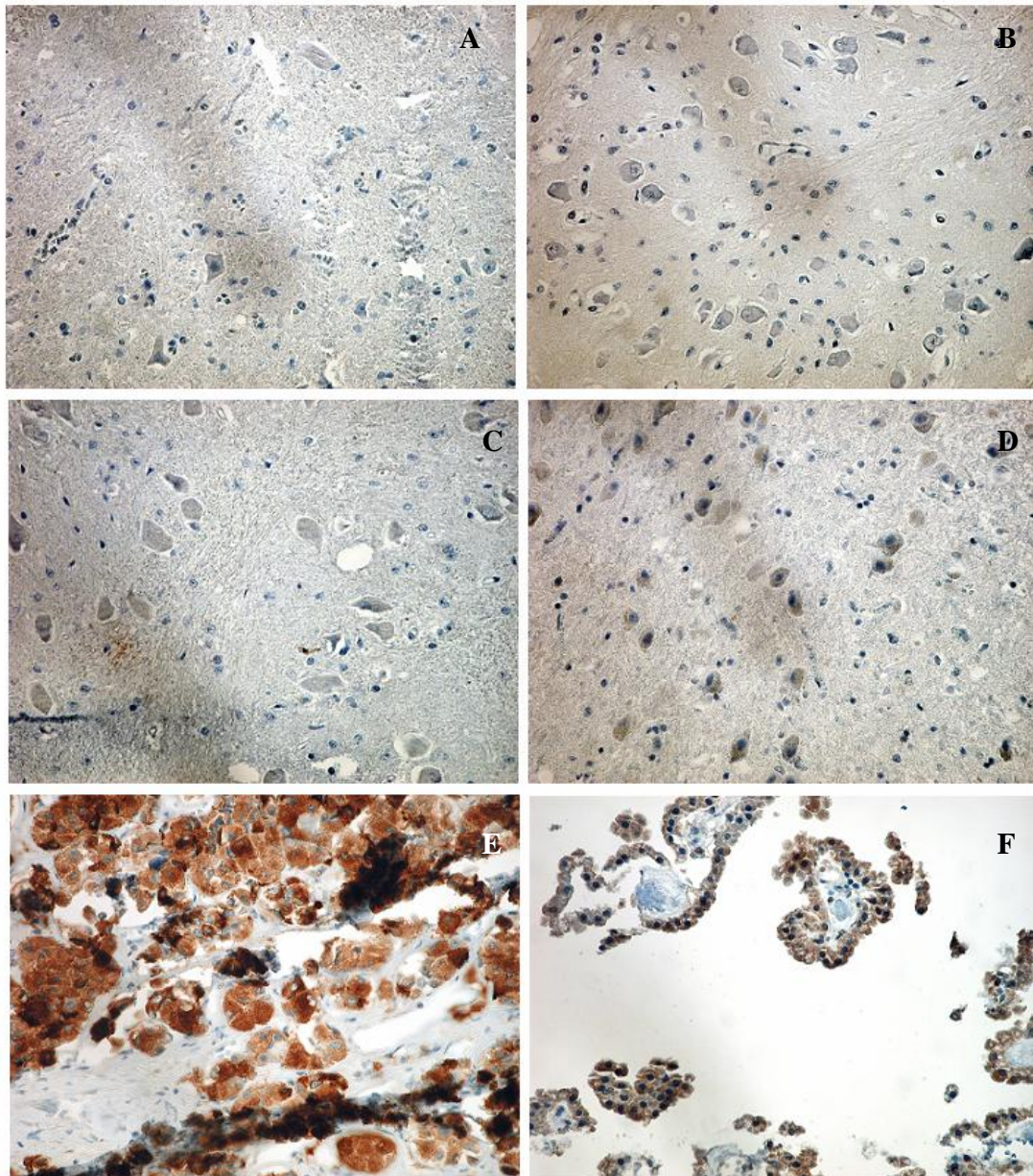


Joonis 7. TIMP-4 ekspressioon inimese kesknärvisüsteemi koekiipidel *in situ* hübriidsatsiooni meetodil. Esitatud on pimevälja (B) ja traditsioonilised (A) mikrofotod. TIMP-4 ekspresseerub olivaartuumade (A, B) neuronites. Suurendus x400

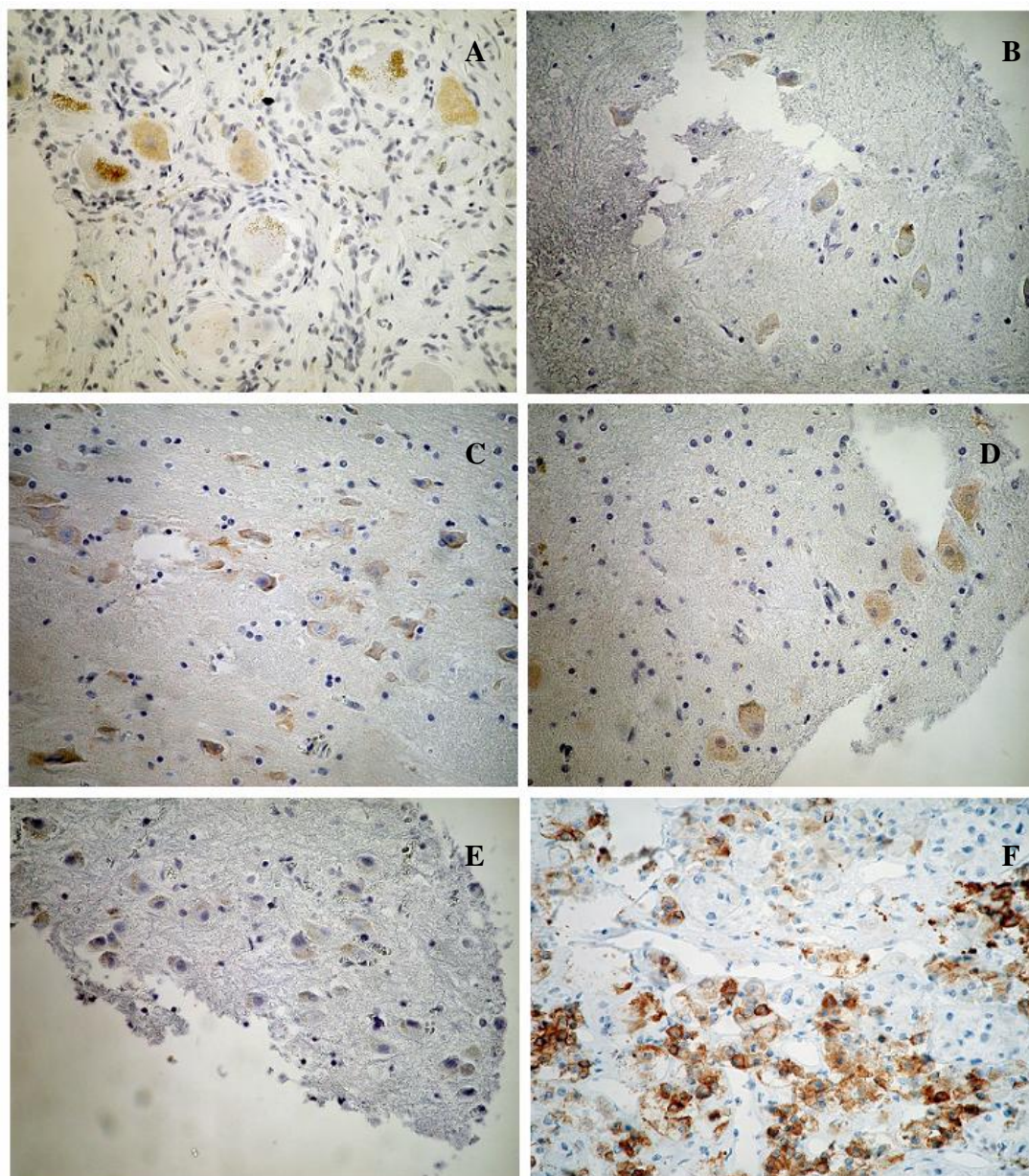
5.2. Immuunohistokeemiline-analüüs

TIMP-de ekspressiooni kesknärvisüsteemi kuuel mikrokiibil analüüsiti ka kasutades immuunohistokeemilist analüüsi. Immuunohistokeemilised reaktsioonid viidi läbi TIMP-1 (1:40; Calbiochem), TIMP-2 (1:1000; Calbiochem), TIMP-3 (1:1000; Calbiochem) ja TIMP-4 (1:120; AbCam) antikehadega ning hinnati järgnevalt: -, negatiivne; +, madal; ++, keskmine; +++, tugev.

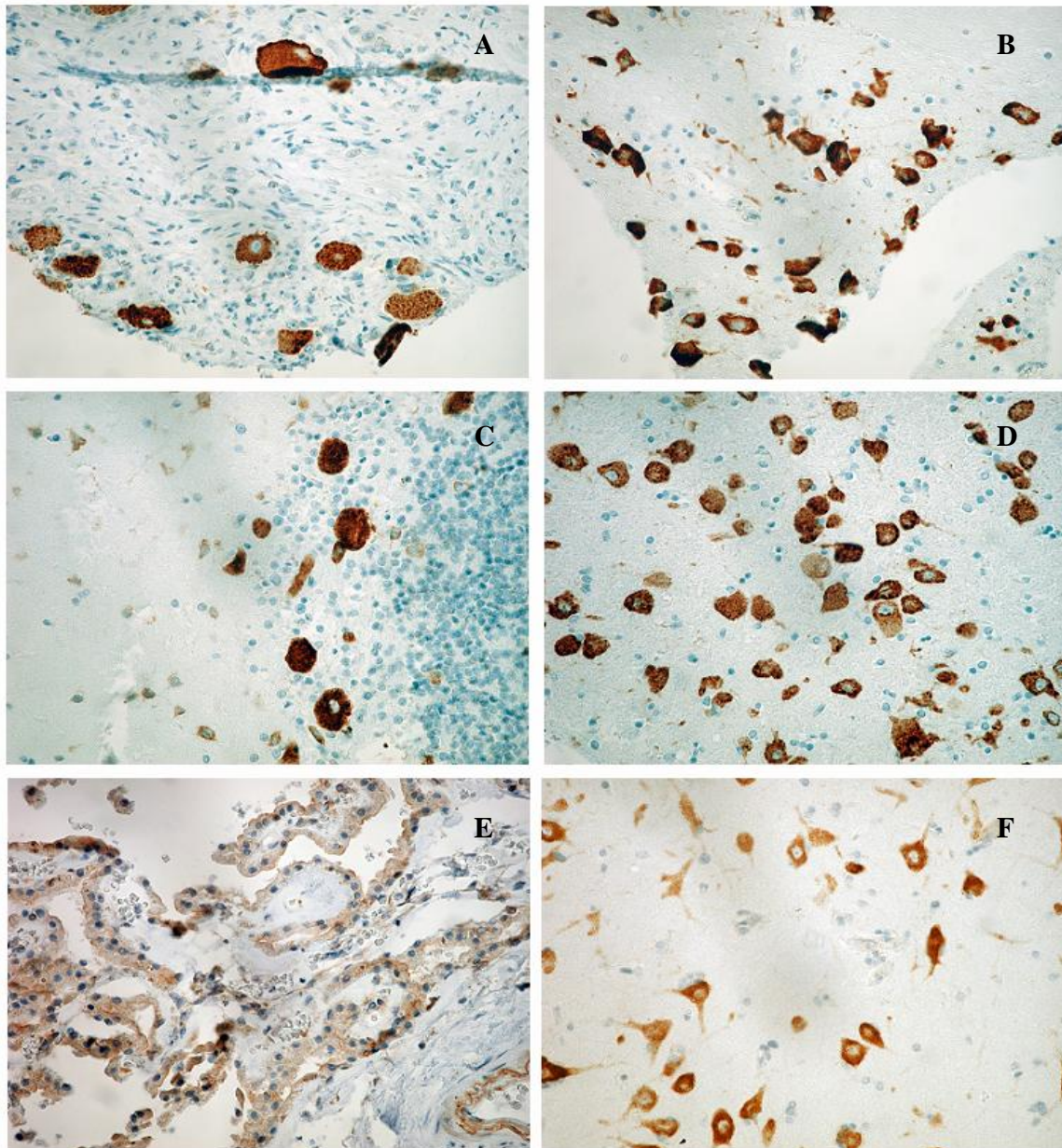
Immuunohistokeemilise uuringu tulemused on summeeritud tabelites 8-11 (lisa 6-9) ning neid illustreerivad mikrofotod on esitatud joonistel 8-11 .



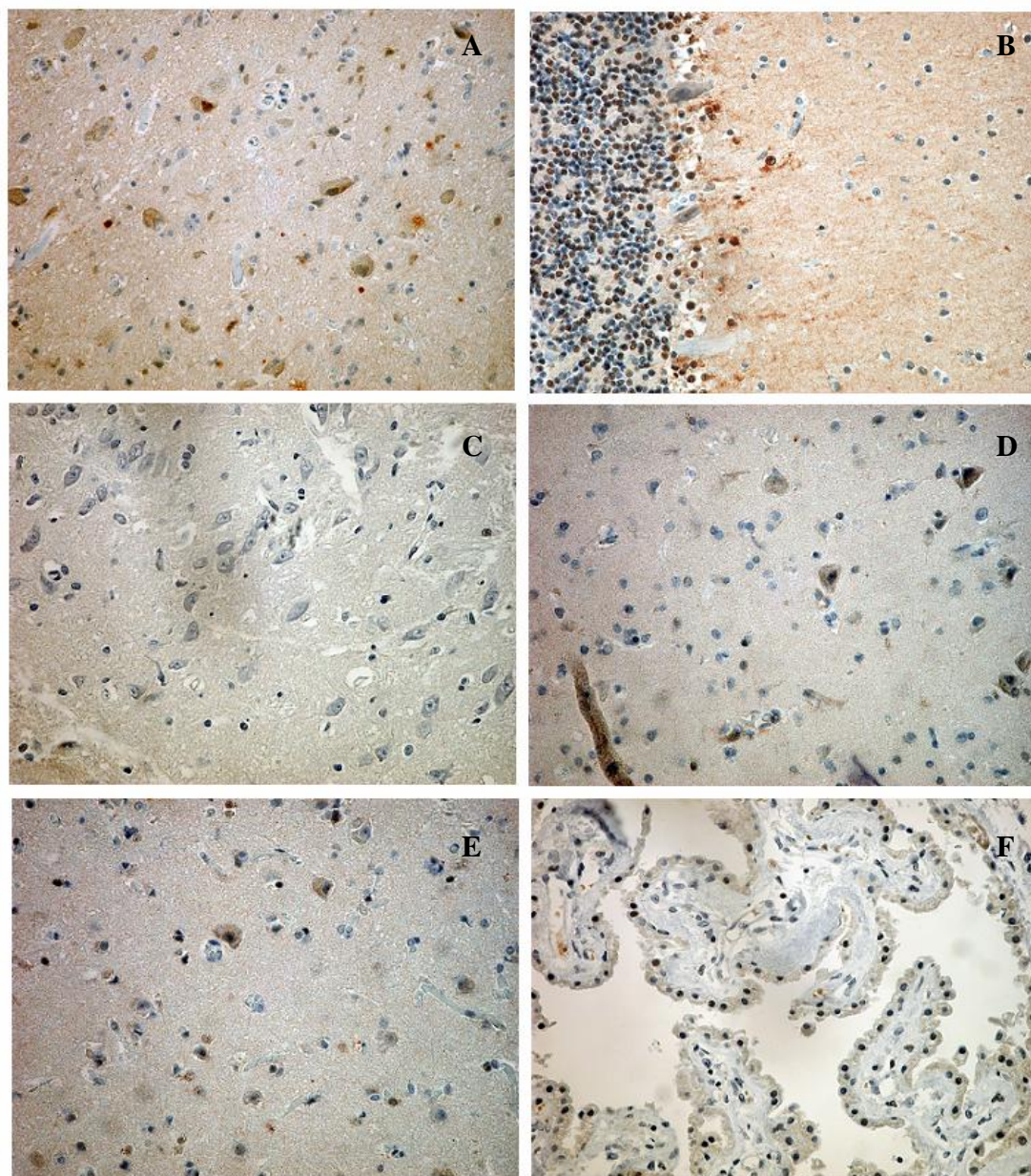
Joonis 8. TIMP-1 ekspressioon kesknärvisüsteemi koekiipidel. TIMP-1 oli detekteeritav seljaaju (A), piklikaju (B), olivaartuumade (C), lateraalse põlvtuuma (D) ja hüpofüüsi (E) neuronites ning ajukelme soonpõimiku (F) epiteeliaalsetes rakkudes. Suurendus x400.



Joonis 9. TIMP-2 ekspressioon kesknärvisüsteemi koekiipidel. TIMP-2 oli detekteeritav dorsaalse juure spinaalganglioni (A), olivaartumade (B), ajusilla (C), hammastuuma (D), lateraalse põlvtuuma ja (E) hüpfüüsi (F) neuronites. Suurendus x400.



Joonis 10. TIMP-3 ekspressioon kesknärvisüsteemi koekiipidel. TIMP-3 oli detekteeritav dorsaalse juure spinaalganglioni (A), ajusilla (B), lateraalse põlvtuuma (D) ning mandeltuuma (F) neuronites, soonpõimiku (E) epiteelis ning ka väikeaju (C) Purkinje rakkudes. Suurendus x400.



Joonis 11. TIMP-4 ekspressioon kesknärvisüsteemi koekiipidel. TIMP-3 oli detekteeritav ajusilla (A), väikeaju (B), lateraalse põlvtuuma (C), frontaalsagara hallaine (D), parietaalsagara hallaine (E) ning ajukelme soonpõimiku epiteelirakkudes (F) neuronites. Suurendus x400.

5.3. Western blot

Western blot analüüsil kasutati tabelis 2 loetletud kudesid. Ühe lokaliseerimise kolm erinevat proovi segati kokku võrdses koguses (16,6 µg). Igale rajale kanti kokku 50 µg valku. Primaarsete antikehadena kasutati TIMP-vastaseid polükloonaalseid antikehasid ning sekundaarse antikehadena peroksüdaasiga konjugeeritud hiire ja küüliku IgG-vastast antikeha.

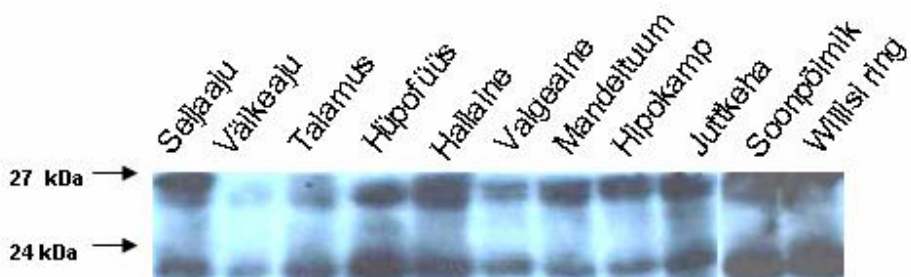
Western blot meetodi tulemused on esitatud joonistel 12-15.



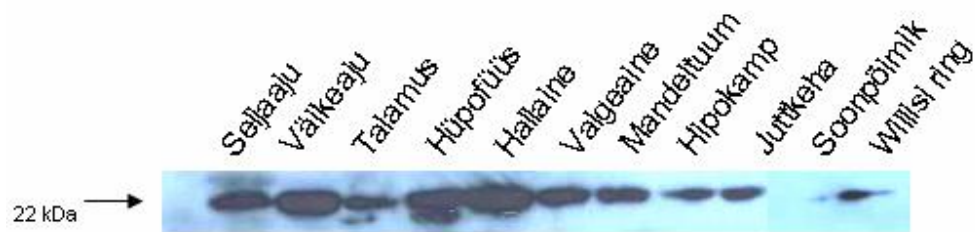
Joonis 12. TIMP-1 ekspressiooni analüüs Western blot meetodil.



Joonis 13. TIMP-2 ekspressiooni analüüs Western blot meetodil.



Joonis 14. TIMP-3 ekspressiooni analüüs Western blot meetodil.

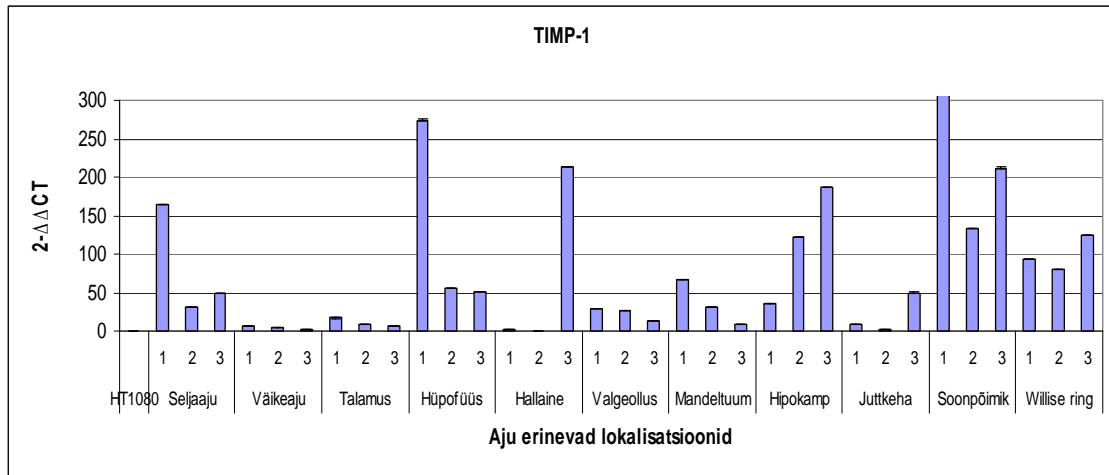


Joonis 15. TIMP-4 ekspressiooni analüüs *Western blot* meetodil.

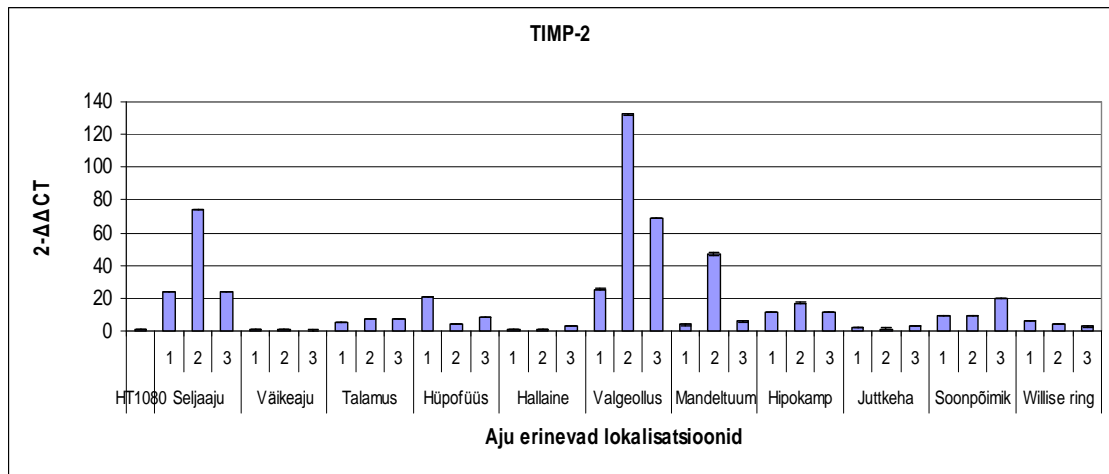
5.4. Q-PCR

In situ hübridisatsiooni, immuunohistokeemilise analüüsi ja *Western blot* meetodi kvantiitiivseks iseloomustamiseks viidi läbi kvantitatiivne PCR. Q-PCR-ga iseloomustati 11-ne aju erineva lokalisatsiooni (table 2) TIMP-1-4 ekspressiooni.

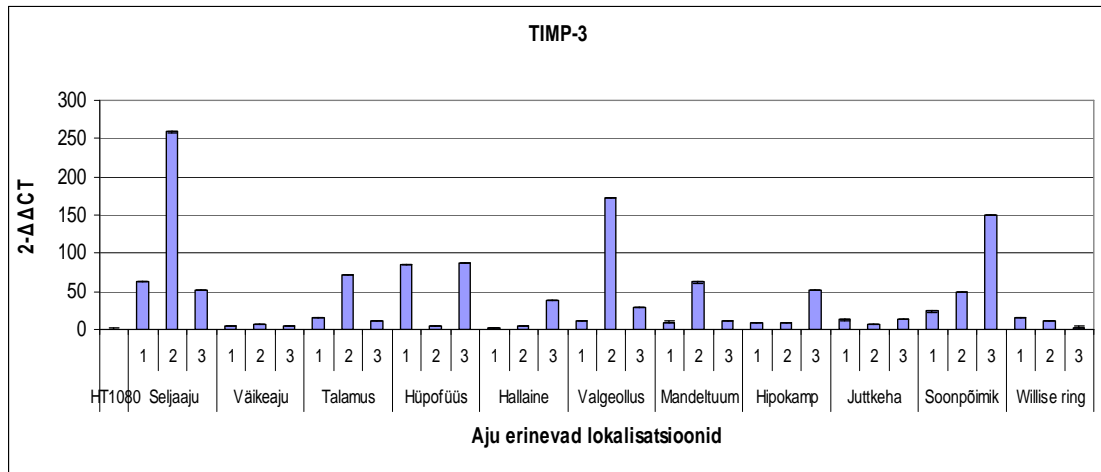
Q-PCR-i tulemuste analüüsiks kasutati $2^{-\Delta\Delta C_T}$ meetodit (Livak jt., 2001). TIMP-de ekspressiooni taseme hindamiseks normaliseeriti C_T väärtused koduhoidja HPRT (hüpoksantiin ribosüültransferaas) mRNA C_T väärtustega. Seejärel võrreldi TIMP-de ekspressioonitaset kesknärvisüsteemis igas doonoris eraldi, kasutades kalibraatorkoena fibrosarkoomi HT1080 rakke. Kõik Q-PCR katsed teostati triplikaatidena ning viga väljendati standardveana (Standard Error of Measurement, SEM). Q-PCR-i tulemused on esitatud joonistel 16-19. Joonistel esitatud väärtused väljendavad TIMP-de ekspressiooni taset võrreldes HT1080 rakkude ekspressiooni tasemega. Doonoritevahelised TIMP-de ekspressiooni erinevused võivad tuleneda indiviidide metabolismi varieeruvusest ning kesknärvisüsteemi plastilisusest.



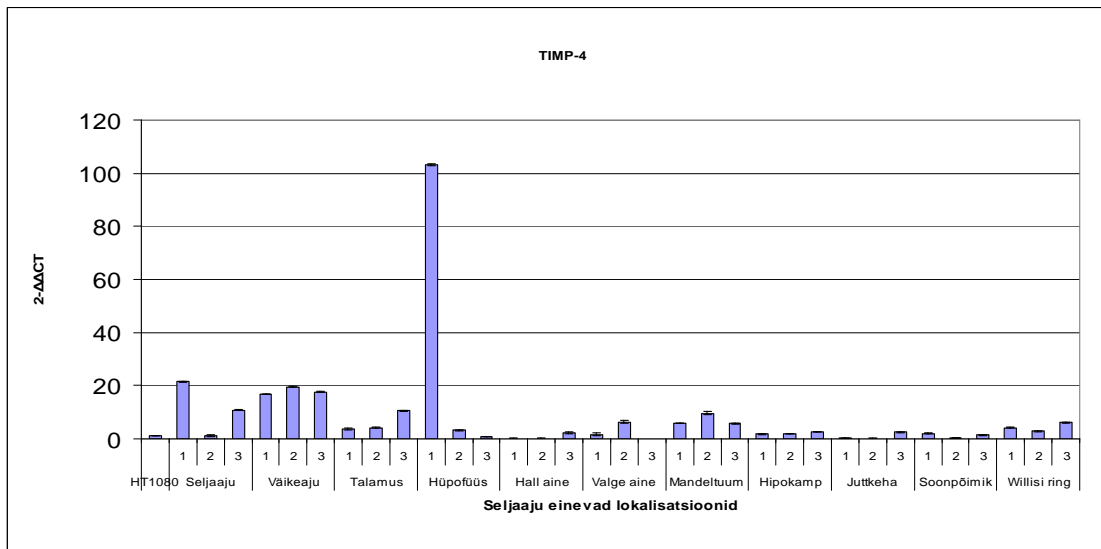
Joonis 16. TIMP-1 ekspressioon inimese kesknärvisüsteemi koe-ekstraktides. $2^{-\Delta\Delta C_T}$ väärtused iseloomustavad TIMP-1 ekspressiooni taset erinevates piirkondades ja struktuurides võrreldes ekspressiooniga HT1080 rakkudes. Katsed teostati tripliikaatidena ning viga väljendati SEM-na (standardviga).



Joonis 17. TIMP-2 ekspressioon inimese kesknärvisüsteemi koe-ekstraktides. $2^{-\Delta\Delta C_T}$ väärtused iseloomustavad TIMP-2 ekspressiooni taset erinevates piirkondades ja struktuurides võrreldes ekspressiooniga HT1080 rakkudes. Katsed teostati tripliikaatidena ning viga väljendati SEM-na (standardviga).



Joonis 18. TIMP-3 ekspressioon inimese kesknärvisüsteemi koe-ekstraktides. $2^{-\Delta\Delta C_T}$ väärtused iseloomustavad TIMP-3 ekspressiooni taset erinevates piirkondades ja struktuurides võrreldes ekspressiooniga HT1080 rakkudes. Katsed teostati tripliikaatidena ning viga väljendati SEM-na (standardviga).



Joonis 19. TIMP-4 ekspressioon inimese kesknärvisüsteemi koe-ekstraktides. $2^{-\Delta\Delta C_T}$ väärtused iseloomustavad TIMP-4 ekspressiooni taset erinevates piirkondades ja struktuurides võrreldes ekspressiooniga HT1080 rakkudes. Katsed teostati tripliikaatidena ning viga väljendati SEM-na (standardviga).

6. Arutelu

6.1 TIMP-1 ekspressioon kesknärvisüsteemis

TIMP-1 on kõiki MMP-sid inhibeeriv valk, mida peetakse kõige vähem ekspresseeritud TIMP-ks täiskasvanud roti kesknärvisüsteemis. Tema ekspressiooni peetakse madalaks kuni isegi allapoole detektsiooni piiri isegi tundliku RNase analüüsi (Pagenstecher jt., 1998) ja RT-PCR-ga (Young jt., 2002). Antud töös näidatakse TIMP-1 ekspressiooni normaalses inimese ajus *in situ* hübridisatsiooni, immuohistokeemilise analüüsi, *Western blot* meetodi ning ka Q-PCR-ga.

TIMP-1 ekspressiooni tulemused kesknärvisüsteemis on esitatud joonistel 4, 8, 12, 16 ja tabelites 4, 8.

Immuuno-histokeemilise uuringuga näidati TIMP-1 kõrget ekspressiooni hüpofüüsis (joonis 8), mida kasutati ka selle meetodi sisemiseks positiivseks kontrolliks. Antud meetod näitas kõrget ekspressiooni ka olivaartuumades (joonis 8), hammastuumas, seljaajus, väikeajus, taalamuses ja ka lateraalses põlvtuumas (lisa 6).

Western blot meetod näitas ekspressiooni taalamuses, hüpofüüsis, hallaines, mandeltuumas, hipokampuses ja juttkehas, mida osaliselt kinnitavad ka Q-PCR tulemused, kuid erinevusteks on taalamus, soonpõimik ja Willisi ring.

In situ hübridisatsioon näitas ekspressiooni väikeajus, olivaartuumades (joonis 4), hammastuumas, taalamuses, mis kinnitab immuuno-histokeemilise analüüsi tulemusi. Varasemalt on TIMP-1 ekspressiooni roti ajus näidatud väikeajus (Rathke-Hartlieb jt., 2000; Fager ja Jaworski, 2000) ning ka hipokampuses (Rivera jt., 2002).

6.2. TIMP-2 ekspressioon kesknärvisüsteemis

Roti ajus on TIMP-2 kõige enam ekspresseeritud TIMP (Fager ja Jaworski, 2000). TIMP-2 ekspressiooni on näidatud täiskasvanud roti aju neuronites ja astrotsüütides. TIMP-2 ekspresseerub aju poolkerade korteksi sügavamates kihtides, haistesibula korteksis, ajutüves, seljaaju motoneuronites ja väikeajus (Pagenstecher jt.; 1998, Vaillant

jt., 1999; Muir jt., 2002).

TIMP-2 ekspressiooni tulemused kesknärvisüsteemis on esitatud joonistel 5, 9, 13, 17 ja tabelites 5, 9.

TIMP-2 transkriptide hulga hindamisel *in situ* hübriidsatsiooni ja immuunohistokeemilise analüüsiga inimese kesknärvisüsteemi erinevates struktuurides ilmnes suhteliselt homogeenne ekspressioon. Jällegi ilmnes väga kõrge ekspressioon immuuno-histokeemilise ja ka *Western blot* analüüsiga hüpofüüsis, mida kasutati sisemise positiivse kontrollina (joonised 9 ja 13). Samuti täheldati kõrgemat ekspressiooni mandeltuumas ning ajusillas neuronites (joonised 5 ja 9). *In situ* hübriidsatsioon näitas TIMP-2 ekspressiooni ka suuraju korteksis, seljaajus ning ka väikeaju neuronites, mis läheb kokku kattub varem avaldatud andmetega roti kohta. Samas ei saa antud tulemuste põhjal öelda, et TIMP-2 oleks normaalses inimese kesknärvisüsteemis kõige rohkem ekspresseeritud.

6.3. TIMP-3 ekspressioon kesknärvisüsteemis

Fager ja Jaworski (2000) on näidanud, et TIMP-3 on kõige madalamal tasemel ekspresseeritud täiskasvanud roti aju, kuid siiski on leitud ekspressiooni neokorteksist (Gardner ja Ghorpade, 2003), taalamusest, haistesibulast (Jaworski ja Fager, 2000), ajutüves (Rathke-Hartlieb jt., 2000). Tugevat ekspressiooni on näidatud ka soonpõimikus, sakilises ajukurrus ning väikeaju Purkinje rakkudes (Pagenstecher jt., 1998).

TIMP-3 ekspressiooni tulemused kesknärvisüsteemis on esitatud joonistel 6, 10, 14, 18 ja tabelites 6, 10.

Antud töös oli TIMP-3 kõige laialdasemalt ekspresseeritud TIMP normaalses inimese kesknärvisüsteemis. Immuuno-histokeemiline analüüs ja *in situ* hübriidsatsioon näitasid ekspressiooni peaaegu kõigis mikrokiibi lokalisatsioonides, paljudes lokalisatsioonides võis ekspressiooni lugeda isegi väga tugevaks. Samuti näitas *Western blot* meetod laialdast ekspressiooni. Q-PCR kinnitab saadud tulemusi.

Antud töö põhjal ekspresseerub TIMP-3 kõige rohkem ajusilla neuronites, väikeaju Purkinje rakkudes, taalamuses, punatuumas, mandeltuumas, lateraalses

põlvtuumas neuronites, soonpõimiku epiteelis, hüpofüüsis ning ka seljaajus neuronites (joonised 6 ja 10). Seega viitavad meie tulemused TIMP-3 ekspressioon inimese närvisüsteemis võib oluliselt erineda TIMP-3 ekspressioonist täiskasvanud roti ajus (Fager ja jaworski, 2000).

TIMP-3 kõrge ekspressiooni põhjal inimese kesknärvisüsteemis võib oletada, et TIMP-3 mängib tähtsat rolli inimese närvisüsteemi füsioloogias. Antud fakti kinnitab ka see, et TIMP-3 *knockout* hiire fenotüüp on letaalne (Leco jt., 2001).

6.4. TIMP-4 ekspressioon kesknärvisüsteemis

TIMP-4 ekspressiooni ajus on väga vähe uuritud. TIMP-4 mRNA on leitud roti väikeajust, suurajust aja ajutüvest (Rathke-Hartlieb jt., 2000; Fager ja Jaworski, 2000; Rahkonen jt., 2002).

TIMP-4 ekspressiooni tulemused kesknärvisüsteemis on esitatud joonistel 7, 11, 15, 19 ja tabelites 7, 11.

TIMP-4 ekspressioon oli kõige kõrgem hüpofüüsis, mida kinnitavad nii immuuno-histokeemilise uuringu, *Western blot* analüüsi ja ka Q-PCR tulemused. TIMP-4 esines veel ajusillas, väikeajus, taalamuses, sabatumas, saaresagaras, mustaines ning punatumas neuronites (joonis 11). Saadud tulemused sarnanevad roti aju TIMP-4 ekspressioonimustriga.

6.5. TIMP-d inimese normaalses kesknärvisüsteemis

Esitatud tulemustest lähtub, et TIMP-d ekspresseeruvad täiskasvanud inimese kesknärvisüsteemis paljudes erinevates struktuurides. Antud töös näidati TIMP-de ekspressiooni eelkõige neuronites, kuigi varem on nende ekspressiooni näidatud ka teistes gliaalse rea rakkudes (Pagenstecher jt., 1998; Vaillant jt., 1999; Rivera jt., 2002), mis antud tööst välja ei tule. Võimalik on TIMP-de liigispetsiifiline regulatsioon.

Liigispetsiifilisi erinevusi proteolüütiliste süsteemide molekulide ekspressioonil on kirjeldatud geneetiliselt lähedases hiires ja rotis (Liu jt., 1996) ning poleks üllatav kui TIMP-de regulatsioon inimese ja närilise ajus oleks erinev.

Antud töö tulemustest lähtub, et kõige laialdasemalt ekspresseeritud TIMP normaalses inimese kesknärvisüsteemis on TIMP-3. Meie töö dokumenteerib TIMP-3 laialdase ekspressiooni transkriptide ja valgu tasemel kõikjal kesknärvisüsteemi neuronites, eriti kõrge ekspressiooniga taalamuses, hippokampuses ja väikeajus. Kuna TIMP-3 *knockout* fenotüüp on letaalne (Leco jt., 2001), siis võib järeldada, et TIMP-3 on tähtis roll ka inimese füsioloogias. Neid andmeid kokku võttes võib oletada, et eelkõige just TIMP-3-1 on tähtis roll inimese närvisüsteemi füsioloogias. Ekspressiooni tasemelt järgneb TIMP-3-le TIMP-2, mis ekspresseerub paljudes erinevates närvisüsteemi piirkondades (taalamus, ajusild, hüpofüüs). TIMP-1 ja TIMP-4 ekspresseeruvad inimese närvisüsteemis nendest juba oluliselt madalamal tasemel.

Fager ja Jaworski (2000) artiklis on näidatud, et kõige madalamal tasemel ekspresseeritud TIMP roti kesknärvisüsteemis on TIMP-3. Seega ilmneb selge erinevus immuuno-histokeemilise, *in situ* hübriidsatsiooni ja *Western blot* analüüsiga näriliste ja inimese TIMP-de ekspressioonimustrite vahel. Eelkõige on inimese närvisüsteemis ekspresseeritud TIMP-3, mida näriliste ajus leidub vähe. Samas, on näriliste ajus tugevalt ekspresseeritud TIMP-2, mis meie andmetel on aga inimese närvisüsteemis nõrgalt ekspresseeritud ega oma seetõttu ilmselt samaväärset tähtsust kui näriliste ajus.

Töö peamiseks tulemuseks on närvisüsteemi füsioloogias ja haiguslikes protsessides tähtsat rolli mängivate TIMP-de ekspressiooni kaardistamine normaalses inimese kesknärvisüsteemi 11 erinevas lokaliseerimises. Normaalne närvisüsteem on nii funktsionaalselt kui ka morfoloogiliselt muutuv süsteem, milles teatud tingimustes ekspresseeruvad ka MMP-d, mis peavad saama tasakaalustatud vastavate TIMP-de ekspressiooniga (Yong jt., 1999). Võimalus on ka, et väike osa neuroneid vahetatakse pidevalt neuraalsete tüvirakkude arvel ja pidevalt toimuva neurogeneesi alusel välja, seega võivad nii MMP-d kui ka nende inhibiitorid TIMP-d osaleda normaalse küpse närvisüsteemi plastilisuse tagamisel (Crocker jt., 2004). Andmed viitavad TIMP-de tähtsusele normaalse närvisüsteemi füsioloogias ja tõenäoliselt ka närvisüsteemi plastilisuse tagamisel. Sellega on esmakordselt süsteemselt analüüsitud TIMP-de

ekspressiooni kogu kesknärvisüsteemis. Seniilmunud kirjanduses puuduvad andmed TIMP-de ekspressiooni analoogse süsteemse käsitluse kohta inimese närvisüsteemis.

6.6. Järeldused

1. Erinevad TIMP-d ekspresseeruvad erineva intensiivsusega inimese närvisüsteemis.
2. Kõige tugevamalt ja ulatuslikumalt levinud TIMP inimese normaalses närvisüsteemis immuuno-histokeemilise analüüsi, *in situ* hübridisatsiooni ja *Western blot* meetodi alusel on TIMP-3.
3. Kõige nõrgemini on ekspresseeritud immuuno-histokeemilise analüüsi, *in situ* hübridisatsiooni alusel TIMP-1 ja TIMP-4.
4. Esineb oluline erinevus TIMP-de ekspressioonis inimese ja näriliste närvisüsteemis, seega pole närilistel läbi viidud eksperimentaalsete tööde tulemused üheselt ekstrapoleeritavad inimesele; seega on oluline uurida just inimeselt saadud haigulikult muutunud kudesid.

KOKKUVÕTE

Analüüsime MMP-de koetüüpi inhibiitorite ekspressiooni normaalses närvisüsteemis koguti projekti raames koematerjali 6 kohtumeditiinilise ja patoanatomilise lahangu käigus eemaldatud normaalse kesknärvisüsteemi 40 erinevast piirkonnast (neokorteks, valgeaine traktid, basaaltuumad, striatum, limbiline süsteem, ajutüvi, väikeaju, hüpofüüs, epifüüs, seljaaju hall- ja valgeaine). Sellest materjalist valmistatud koekiipidel analüüsisime *in situ* hübriidiseerimise ja immunohistokeemia abil TIMP 1-4 ekspressiooni. Lisaks hinnati külmutatud koeproovidest valmistatud ekstraktides TIMP 1-4 esinemist nii mRNA kui valgu tasandil aju erinevates piirkondades. Töö peamiseks tulemuseks on närvisüsteemi füsioloogias ja haiguslikes protsessides tähtsat rolli mängivate TIMP-de ekspressiooni kaardistamine. Meie töö dokumenteerib TIMP-3 laialdase ekspressiooni transkriptide ja valgu tasemel kõikjal kesknärvisüsteemi neuronites, eriti kõrge ekspressiooniga taalamuses, hippokampuses ja väikeajus. Meie andmed viitavad TIMP-de tähtsusele normaalse närvisüsteemi füsioloogias ja tõenäoliselt ka närvisüsteemi plastilisuse tagamisel. Sellega on esmakordselt süsteemselt analüüsitud TIMP-de ekspressiooni kogu kesknärvisüsteemis. Seniilmunud kirjanduses puuduvad andmed TIMP-de ekspressiooni analoogse süsteemse käsitluse kohta inimese närvisüsteemis.

Meie andmed näitavad:

- selget erinevust TIMP-de ekspressioonis näriliste ja inimese vahel;
- et tuleb olla ettevaatlik katseloomadel saadud eksperimentaalsete tulemuste ülekandmisel inimesele;
- on oluline uurida eeskätt patsientidelt saadud materjale tegemaks järeltõlget nende faktorite osalemise kohta erinevates patoloogilistes tingimustes (muuhulgas ka kasvajas) inimesel;

SUMMARY

Expression profiling of inhibitors of metalloproteases in the normal human central nervous system

Extracellular proteolysis machinery and the MMP/TIMP system in particular are increasingly recognized to play important roles in various physiological and pathological processes in the central nervous system (CNS). Much of the data on the involvement of TIMPs in neurophysiology and -pathology have been derived from studies on experimental animals. The aim of current work was to perform a systematic characterization of the expression of TIMP-1, 2, -3 and -4, in the normal human CNS. Brain and spinal cord samples from 11 anatomic locations covering all the major brain regions were collected of donors with no neurological disease. Tissues were embedded in paraffin and tissue arrays were constructed. A set of 11 localizations was snap-frozen for RNA extraction. Expression profiling of TIMPs was performed by in situ hybridization, immunohistochemistry, western blot and qPCR assays.

Immunohisto-chemistry and in situ hybridization assays demonstrated that expression of TIMPs in normal adult CNS are located in different cell types and structures. The most abundantly expressed TIMP in the human normal central nervous system was TIMP-3 what is in contradiction with the knowledge that in the murin brain the most expressed is TIMP-2. The most intense signal was observed in highly vascularized choroid plexus and in the endothelial cells of circle of Willis. In addition to neuronal expression, TIMP-3 transcripts were present at high levels in epithelial cells of choroid plexus and in a subpopulation of microvascular endothelial cells. TIMP-2 was the second most abundantly

expressed TIMP in the human central nervous system. In all of the TIMPs high expression was observed in hypophysis, what was also used as positive control.

Our work establishes expression map of the TIMPs in the normal human CNS. Our data should be useful for future studies addressing TIMPs and MMPs in neurological diseases.

KASUTATUD KIRJANDUS

Ahonen M jt. High level expression of tissue inhibitors of metalloproteinases-1,-2 and -3 in melanoma cells achieved by adenovirus mediated gene transfer. *Adv Exp Med Biol.* 1998;451:69-72.

Ahonen M jt. Adenovirus-mediated gene delivery of tissue inhibitor of metalloproteinase-3 inhibits invasion and induces apoptosis in melanoma cells. *Cancer Res* 1998;58:2310-5

Airola K jt. Expression of collagenases-1 and -3 and their inhibitors TIMP-1 and -3 correlates with the level of invasion in malignant melanomas. *Br J Cancer.* 1999 Mai;80(5-6):733-43.

Albini A jt. Tumor cell invasion inhibited by TIMP-2. *J Natl Cancer Inst.* 1991 Juuni 5;83(11):775-9.

Amour A jt. TNF-alpha converting enzyme (TACE) is inhibited by TIMP-3. *FEBS Lett.* 1998 Sept 11;435(1):39-44.

Ausubel FM jt. Short protocols in molecular biology. 5th edition. John Wiley & Sons, Inc. 2002.

Baker AH jt. Inhibition of invasion and induction of apoptotic cell death of cancer cell lines by overexpression of TIMP-3. *Br J Cancer.* 1999 Märts;79(9-10):1347-55.

Baker AH jt. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci.* 2002 Okt 1;115(Pt 19):3719-27.

Barasch J jt. Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 stimulates mesenchymal growth and regulates epithelial branching during morphogenesis of the rat metanephros. *J Clin Invest.* 1999 Mai;103(9):1299-307.

Beattie GJ jt. Phase I study of intraperitoneal metalloproteinase inhibitor BB94 in patients with malignant ascites. *Clin Cancer Res* 1998; 4:1899-902.

Bertaux B jt. Growth stimulation of human keratinocytes by tissue inhibitor of metalloproteinases. *J Invest Dermatol.* 1991 Okt;97(4):679-85.

Bian J jt. Suppression of in vivo tumor growth and induction of suspension cell death by tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-3. *Carcinogenesis.* 1996 Sept;17(9):1805-11.

Betz M jt. 1.8-A crystal structure of the catalytic domain of human neutrophil collagenase (matrix metalloproteinase-8) complexed with a peptidomimetic hydroxamate primed-side inhibitor with a distinct selectivity profile. *Eur J Biochem.* 1997 Jul 1;247(1):356-63

Bian J jt. Suppression of in vivo tumor growth and induction of suspension cell death by tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (TIMP-3). *Carcinogenesis* 1996;17:1805-11

Bode W, Huber R. Crystal structure analysis and refinement of two variants of trigonal trypsinogen: trigonal trypsin and PEG (polyethylene glycol) trypsinogen and their comparison with orthorhombic trypsin and trigonal trypsinogen. *EBS Lett.* 1978 Juuni 15;90(2):265-9.

Bord S jt. Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1) distribution in normal

- and pathological human bone. *Bone*. 1999 Märts;24(3):229-35.
- Boujrad N jt.** Identification of a stimulator of steroid hormone synthesis isolated from testis. *Science*. 1995 Juuni 16;268(5217):1609-12.
- Brew K jt** Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta*. 2000 Märts 7;1477(1-2):267-83.
- Brown PD.** Clinical suties with matrix metalloproteinase inhibitors. *APMIS* 1999; 107: 174-80
- Brown PD.** Matrix metalloproteinase inhibitors. *Brest Cancer Res Treat* 1998;52:125-36
- Butler GS jt.** Membrane-type-2 matrix metalloproteinase can initiate the processing of progelatinase A and is regulated by the tissue inhibitors of metalloproteinases. *Eur J Biochem*. 1997 Märts 1;244(2):653-7.
- Campbell CE jt.** Identification of a serum- and phorbol ester-responsive element in the murine tissue inhibitor of metalloproteinase gene. *J Biol Chem*. 1991 Apr 15;266(11):7199-206.
- Caterina J jt.** Murine TIMP-2 gene-targeted mutation. *Ann N Y Acad Sci*. 1999 Juuni 30;878:528-30.
- Cawston T jt.** The regulation of MMPs and TIMPs in cartilage turnover. *Ann N Y Acad Sci*. 1999 Jun 30;878:120-9.
- Celiker MY jt.** Inhibition of Wilms' tumor growth by intramuscular administration of tissue inhibitor of metalloproteinases-4 plasmid DNA. *Oncogene*. 2001 Juuli19;20(32):4337-43.
- Chang C, Werb Z.** The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends Cell Biol*. 2001 Nov;11(11):S37-43.
- Chapman HA jt.** Emerging roles for cysteine proteases in human biology. *Annu Rev Physiol*. 1997;59:63-88.
- Chirivi RG jt.** Inhibition of the metastatic spread and growth of B 16-BL6 murine melanoma by a synthetic matrix metelloproteinase inhibitor. *Int J Cancer* 58:460-464, 1994
- Corcoran ML Stetler-Stevenson WG.** Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 stimulates fibroblast proliferation via a cAMP-dependent mechanism. *J Biol Chem*. 1995 Juuni 2;270(22):13453-9.
- Coussens LM jt.** Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science*. 2002 Märts 29;295(5564):2387-92.
- Coussens LM jt.** Models for gain-of-function and loss-of-function of MMPs. Transgenic and gene targeted mice. *Methods Mol Biol*. 2001;151:149-79.
- Crocker SJ jt.** The TIMPs tango with MMPs and more in the central nervous system. *J Neurosci Res*. 2004 Jaan 1;75(1):1-11.
- Dano K jt.** Plasminogen activators, tissue degradation, and cancer. *Adv Cancer Res*. 1985;44:139-266.
- D`Armiento JM jt.** Myocardial overexpression of collagenase in the transgenic mouse produces left ventricular hypertrophy and hypercontractility. *Circulation* 1997; 96(8S):I520
- DeClerck YA jt.** Inhibition of invasion and metastasis in cells transfected with an inhibitor of metalloproteinases. *Cancer Res*. 1992 Veebr 1;52(3):701-8

Delmas PD. Bisphosphonates in the treatment of bone diseases. *N Engl J Med.* 1996 Dec 12;335(24):1836-7.

Denis LJ jt. Matrix metalloproteinase inhibitors: present achievement and future prospects. *Invest New Drug* 1997;15:61-75

De Wever O. Mareel M. Role of tissue stroma in cancer cell invasion. *J Pathol.* 2003 Juuli;200(4):429-47.

Dickinson DP. Cysteine peptidases of mammals: their biological roles and potential effects in the oral cavity and other tissues in health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002;13(3):238-75.

Edwards DR jt. The roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in tissue remodelling and cell growth. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 1996 Märts;20 Suppl 3:S9-15.

Ellis V, Murphy G. Cellular strategies for proteolytic targeting during migration and invasion. *FEBS Lett.* 2001 Sept 28;506(1):1-5.

Ellis V jt. Inhibition of receptor-bound urokinase by plasminogen-activator inhibitors. *J Biol Chem.* 1990 Juuni 15;265(17):9904-8.

Fager N, Jaworski DM. Differential spatial distribution and temporal regulation of tissue inhibitor of metalloproteinase mRNA expression during rat central nervous system development. *Mech Dev.* 2000 Nov;98(1-2):105-9.

Fata JE jt. Accelerated apoptosis in the Timp-3-deficient mammary gland. *J Clin Invest.* 2001 Sept;108(6):831-41. jt

Fife RS jt. Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by doxycycline in cultured human osteosarcoma cells. *J Lab Clin Med.* 1997 Nov;130(5):530-4

Garcia-Touchard A jt. Extracellular Proteases in Atherosclerosis and Restenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005 Märts 31.

Gardner J, Ghorpade A. Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1: the TIMPed balance of matrix metalloproteinases in the central nervous system. *J Neurosci Res.* 2003 Dets 15;74(6):801-6.

Gasson JC jt. Molecular characterization and expression of the gene encoding human erythroid-potentiating activity. *Nature.* 1985 Juuni 27-Juuli 3;315(6022):768-71.

Gomez DE jt. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol.* 1997 Okt;74(2):111-22.

Gomis-Ruth FX jt. Mechanism of inhibition of the human matrix metalloproteinase stromelysin-1 by TIMP-1. *Nature.* 1997 Sept 4;389(6646):77-81.

Greenwald RA jt. In vitro sensitivity of the three mammalian collagenases to tetracycline inhibition: relationship to bone and cartilage degradation. *Bone.* 1998 Jan;22(1):33-8

Gross JL jt. Increased capillary endothelial cell protease activity in response to angiogenic stimuli in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983 Mai;80(9):2623-7.

Hashimoto T jt. Abnormal expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in brain arteriovenous malformations. *Stroke.* 2003 Apr;34(4):925-31. Epub 2003 Märts 20.

Hayakawa T jt. Cell growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2). *J Cell Sci.* 1994 Sept;107 (Pt 9):2373-9.

- Hayakawa T jt.** Growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) for a wide range of cells. A possible new growth factor in serum. *FEBS Lett.* 1992 *Veebr* 17;298(1):29-32.
- Hicks NJ jt.** A fibrosarcoma model derived from mouse embryo cells: growth properties and secretion of collagenase and metalloproteinase inhibitor (TIMP) by tumour cell lines. *Int J Cancer.* 1984 *Juuni* 15;33(6):835-44.
- Hidalgo M jt.** Development of Matrix Metalloproteinase Inhibitors in Cancer Therapy. *J Natl Cancer Inst.* 2001 *Feb* 7;93(3):178-93
- Hortobagyi GN jt.** Efficacy of pamidronate in reducing skeletal complications in patients with breast cancer and lytic bone metastases. Protocol 19 Aredia Breast Cancer Study Group. *N Engl J Med.* 1996 *Dec* 12;335(24):1785-91
- Itoh T jt.** Reduced angiogenesis and tumor progression in gelatinase A-deficient mice. *Cancer Res.* 1998.5.1048-1051
- Jaworski DM, Fager N.** Regulation of tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (Timp-3) mRNA expression during rat CNS development. *J Neurosci Res.* 2000 *Aug* 15;61(4):396-408.
- Jaworski J jt.** Neuronal excitation-driven and AP-1-dependent activation of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 gene expression in rodent hippocampus. *J Biol Chem.* 1999 *Okt* 1;274(40):28106-12.
- Kai HS jt.** Utilization of a novel recombinant myoglobin fusion protein expression system to characterize the tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-4 and TIMP-2 C-terminal domain and tails by mutagenesis. The importance of acidic residues in binding the MMP-2 hemopexin C-domain. *J Biol Chem.* 2002 *Dets* 13;277(50):48696-707.
- Kashiwagi M jt.** TIMP-3 is a potent inhibitor of aggrecanase 1 (ADAM-TS4) and aggrecanase 2 (ADAM-TS5). *J Biol Chem.* 2001 *Apr* 20;276(16):12501-4.
- Khokha R jt.** Antisense RNA-induced reduction in murine TIMP levels confers oncogenicity on Swiss 3T3 cells. *Science.* 1989 *Veebr* 17;243(4893):947-50.
- Khuth ST jt.** Morbillivirus infection of the mouse central nervous system induces region-specific upregulation of MMPs and TIMPs correlated to inflammatory cytokine expression. *J Virol.* 2001 *Sept*;75(17):8268-82.
- Kojima W jt.** The metzincins- topological and sequential relations between the astacins, adamlysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. *Protein Sci.* 4,823-740.
- Lah TT, Kos J.** Cysteine proteinases in cancer progression and their clinical relevance for prognosis. *Biol Chem.* 1998 *Veebr*;379(2):125-30.
- Lambert E jt.** TIMPs as multifacial proteins. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2004 *Märts*;49(3):187-98.
- Leco KJ jt.** Murine tissue inhibitor of metalloproteinases-4 (Timp-4): cDNA isolation and expression in adult mouse tissues. *FEBS Lett.* 1997 *Jaan* 20;401(2-3):213-7.
- Leco KJ jt.** Spontaneous air space enlargement in the lungs of mice lacking tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3). *J Clin Invest.* 2001 *Sept*;108(6):817-29.
- Lijnen HR.** Plasmin and matrix metalloproteinases in vascular remodeling. *Thromb Haemost.* 2001 *Jul*;86(1):324-33.

- Liotta LA jt.** Cancer invasion and metastasis: positive and negative regulatory elements. *Cancer Invest.* 1991;9(5):543-51.
- Liu K jt.** Coordinated expression of tissue-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1 during corpus luteum formation and luteolysis in the adult pseudopregnant rat. *Endocrinology.* 1996 Mai; 137(5):2126-32.
- Livak KJ, Schmittgen TD.** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001 Dets;25(4):402-8.
- Lokeshaw BL.** MMP inhibition in prostate cancer. *Ann N Y Acad Sci* 1999;878:271-89
- Lorenzl S jt.** Expression of MMP-2, MMP-9, and MMP-1 and their endogenous counterregulators TIMP-1 and TIMP-2 in postmortem brain tissue of Parkinson's disease. *Exp Neurol.* 2002 Nov;178(1):13-20.
- Macaulay VM jt.** Phase I study of intrapleural batimastat (BB-94), a matrix metalloproteinase inhibitor, in the treatment of malignant pleural effusions. *Clin Cancer Res.* 1999 Mar;5(3):513-20
- Mak TW jt.** Androgen-dependent fibrinolytic activity in a murine mammary carcinoma (Shionogi SC-115 cells) in vitro. *Cell.* 1976 Veebr;7(2):223-6.
- Millar AW jt.** Results of single and repeat dose studies of the oral matrix metalloproteinase inhibitor marimastat in healthy male volunteers. *Br J Clin Pharmacol.* 1998 Jan;45(1):21-6.
- Morgunova E jt.** Structure of human pro-matrix metalloproteinase-2: activation mechanism revealed. *Science.* 1999 Juuni 4;284(5420):1667-70.
- Muir EM jt.** Matrix metalloproteases and their inhibitors are produced by overlapping populations of activated astrocytes. *Brain Res Mol Brain Res.* 2002 Apr 30;100(1-2):103-1
- Murate T jt.** The production of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in megakaryopoiesis: possible role of platelet- and megakaryocyte-derived TIMPs in bone marrow fibrosis. *Br J Haematol.* 1997 Okt;99(1):181-9.
- Murphy AN jt.** Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 inhibits bFGF-induced human microvascular endothelial cell proliferation. *J Cell Physiol.* 1993 Nov;157(2):351-8.
- Murphy G, Knauper V.** Relating matrix metalloproteinase structure to function: why the "hemopexin" domain? *Matrix Biol.* 1997 Märts;15(8-9):511-8.
- Nagase H.** Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem.* 1997 Mar-Apr;378(3-4):151-60.
- Nagase H, Woessner JF.** Matrix metalloproteinases. 1999. *J Biol Chem.* 274:21491-21494.
- Nedivi E jt.** Numerous candidate plasticity-related genes revealed by differential cDNA cloning. *Nature.* 1993 Juuni 24;363(6431):718-22.
- Newton SS jt.** Gene profile of electroconvulsive seizures: induction of neurotrophic and angiogenic factors. *J Neurosci.* 2003 Nov 26;23(34):10841-51.
- Nielsen BS jt.** Collagenase-3 expression in breast myofibroblasts as a molecular marker of transition of ductal carcinoma in situ lesions to invasive ductal carcinomas. *Cancer Res.* 2001 Okt 1;61(19):7091-100.

- Nielsen LS jt.** A 55,000-60,000 Mr receptor protein for urokinase-type plasminogen activator. Identification in human tumor cell lines and partial purification. *J Biol Chem.* 1988 Veebr 15;263(5):2358-63.
- Nothnick WB.** Disruption of the tissue inhibitor of metalloproteinase-1 gene results in altered reproductive cyclicity and uterine morphology in reproductive-age female mice. *Biol Reprod.* 2000 Sept;63(3):905-12.
- Nothnick WB.** Reduction in reproductive lifespan of tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1)-deficient female mice. *Reproduction.* 2001 Dets;122(6):923-7.
- Osiewicz K.** Hyper-resistance to infection in TIMP-1-deficient mice is neutrophil dependent but not immune cell autonomous. *Ann N Y Acad Sci.* 1999 Juuni 30;878:494-6.
- Ossowski L, Reich E.** Antibodies to plasminogen activator inhibit human tumor metastasis. *Cell.* 1983 Dets;35(3 Pt 2):611-9.
- Overall CM.** Molecular determinants of metalloproteinase substrate specificity: matrix metalloproteinase substrate binding domains, molecules, and exosites. *Mol Biotechnol.* 2002;22:15-86.
- Pagenstecher A jt.** Differential expression of matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase genes in the mouse central nervous system in normal and inflammatory states. *Am J Pathol.* 1998 Märts;152(3):729-41.
- Parks WC and Mecham RP.** Matrix metakoproteinases. 1998. Academic Press, San Diego.
- Pei D jt.** Cysteine array matrix metalloproteinase (CA-MMP)/MMP-23 is a type II transmembrane matrix metalloproteinase regulated by a single cleavage for both secretion and activation. *J Biol Chem.* 2000 Okt 27;275(43):33988-97.
- Puente XS jt.** Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nat Rev Genet.* 2003 Juuli;4(7):544-58.
- Rahkonen OP jt.** Characterization of the murine Timp4 gene, localization within intron 5 of the synapsin 2 gene and tissue distribution of the mRNA. *Biochim Biophys Acta.* 2002 Aug 19;1577(1):45-52.
- Rathke-Hartlieb S jt.** Elevated expression of membrane type 1 metalloproteinase (MT1-MMP) in reactive astrocytes following neurodegeneration in mouse central nervous system. *FEBS Lett.* 2000 Sept 22;481(3):227-34.
- Ree AH jt.** High levels of messenger RNAs for tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1 and TIMP-2) in primary breast carcinomas are associated with development of distant metastases. *Clin Cancer Res.* 1997 Sept;3(9):1623-8.
- Rivera S jt.** Gelatinase B and TIMP-1 are regulated in a cell- and time-dependent manner in association with neuronal death and glial reactivity after global forebrain ischemia. *Eur J Neurosci.* 2002 Jaan;15(1):19-32.
- Rivera S jt.** Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) is differentially induced in neurons and astrocytes after seizures: evidence for developmental, immediate early gene, and lesion response. *J Neurosci.* 1997 Juuni 1;17(11):4223-35.
- Rudolph-Owen LA jt.** Overexpression of the matrix metalloproteinase matrilysin results

in premature mammary gland differentiation and male infertility. *Mol Biol Cell* 1998;9:421-435.

Ryan ME jt. Matrix metalloproteinases and their inhibition in periodontal treatment. *Curr Opin Periodontol.* 1996;3:85-96. Review.

Sambrook J, Russel DW. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* 3rd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Schafer BM jt. Plasminogen activation in healing human wounds. *Am J Pathol.* 1994 Jun;144(6):1269-80. Sloane BF jt. The malignant phenotype and cysteine proteinases.

Biomed Biochim Acta. 1991;50(4-6):549-54.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987 Apr;162(1):156-9.

Seftor RE jt. Chemically modified tetracyclines inhibit human melanoma cell invasion and metastasis. *Clin Exp Metastasis.* 1998 Apr;16(3):217-25

Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2001;17:463-516.

Stetler-Stevenson WG jt. Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) has erythroid-potentiating activity. *FEBS Lett.* 1992 Jaan 20;296(2):231-4.

Stocker W jt. The metzincins--topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralyins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. *Protein Sci.* 1995 Mai;4(5):823-40.

Strickland S jt. Plasminogen activator in early embryogenesis: enzyme production by trophoblast and parietal endoderm. *Cell.* 1976 Okt;9(2):231-40.

Strongin AY jt. Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. *J Biol Chem.* 1995 Märts 10;270(10):5331-8.

Sympson CJ jt. Targeted expression of stromelysin-1 mammary gland provides evidence for a role of proteinases in branching morphogenesis and the requirement for an intact basement membrane for tissue-specific gene expression. *J Cell Biol* 1994; 125:681-693.

Szymocha R jt. Astrocytic alterations induced by HTLV type 1-infected T lymphocytes: a role for Tax-1 and tumor necrosis factor alpha. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2000 Nov 1;16(16):1723-9.

Tanaka K jt. Cyclic AMP-regulated synthesis of the tissue inhibitors of metalloproteinases suppresses the invasive potential of the human fibrosarcoma cell line HT1080. *Cancer Res.* 1995 Juuli 1;55(13):2927-35.

Teesalu T jt. Tissue plasminogen activator and neuroserpin are widely expressed in the human central nervous system. *Thromb Haemost.* 2004 Aug;920(2):358-68.

Teesalu T jt. Tissue plasminogen activator as a key effector in neurobiology and neuropathology. *Biochem Soc Trans.* 2002 Apr;30(2):183-9

Teesalu T jt. Coordinated induction of extracellular proteolysis systems during experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *Am J Pathol.* 2001 Dets; 159(6):2227-37.

Teesalu T jt. Expression of matrix metalloproteinases during murine chorioallantoic placenta maturation. *Dev Dyn.* 1999 Märts; 214(3):248-58

Teesalu T jt. Expression and function of the urokinase type plasminogen activator during mouse hemochorial placental development. *Dev Dyn.* 1998 Sept;213(1):27-38.

Teesalu T jt. Embryo implantation in mouse: fetomaternal coordination in the pattern of expression of uPA, uPAR, PAI-1 and alpha 2MR/LRP genes. *Mech Dev.* 1996 Mai;56(1-2):103-16.

Thomas G. Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002 Okt;3(10):753-66.

Turk B jt. Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. *Biochim Biophys Acta.* 2000 Märts 7;1477(1-2):98-111.

Vaillant C jt. Spatiotemporal expression patterns of metalloproteinases and their inhibitors in the postnatal developing rat cerebellum. *J Neurosci.* 1999 Juuni 15;19(12):4994-5004.

Valente P jt. TIMP-2 over-expression reduces invasion and angiogenesis and protects B16F10 melanoma cells from apoptosis. *Int J Cancer.* 1998 Jaan 19;75(2):246-53.

Van Wart HE, Birkedal-Hansen H. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 Juuli;87(14):5578-82.

Velasco G jt. Cloning and characterization of human MMP-23, a new matrix metalloproteinase predominantly expressed in reproductive tissues and lacking conserved domains in other family members. *J Biol Chem.* 1999 Veebr 19;274(8):4570-6.

Visscher DW jt. Enhanced expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) in the stroma of breast carcinomas correlates with tumor recurrence. *Int J Cancer.* 1994 Nov 1;59(3):339-44.

Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function and biochemistry. *Circ Res.* 2003 Mai2;92(8):827-39.

von Gertten C jt. Increases in matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 mRNA after cerebral contusion and depolarisation. *J Neurosci Res.* 2003 Sept 15;73(6):803-10.

Vu TH, Werb Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev.* 2000 Sept 1;14(17):2123-33.

Waisman DM. Plasminogen: Structure, Activation, and Regulation. *Plasminogen Activators: Structure and Function.* 2003, Kluwer Academic/ Plenum Publishers, New York.

Wallace JA jt. Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 is associated with neuronal death in reperfusion injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2002 Nov;22(11):1303-10.

Wang Z jt. TIMP-2 is required for efficient activation of proMMP-2 in vivo. *J Biol Chem.* 2000 Aug 25;275(34):26411-5.

Watson SA jt. Therapeutic affect of the matrix metalloproteinase inhibitor batimastat, in a human colorectal cancer ascites model. *Brit J Cancer* 74: 1354-1358, 1996

Weber BH jt. Mutations in the tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP3) in patients with Sorsby's fundus dystrophy. *Nat Genet.* 1994 Dets;8(4):352-6.

Welgus HG jt. Human alveolar macrophages produce a fibroblast-like collagenase and collagenase inhibitor. *J Clin Invest.* 1985 Juul;76(1):219-24.

Werb, Z. ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell*. 1997 Nov 14;91(4):439-42.

Westermarck J, Kahari VM. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J*. 1999 May;13(8):781-92.

Wetzel M jt. Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 and matrix metalloproteinase-3 regulate neuronal sensitivity to doxorubicin-induced apoptosis. *Eur J Neurosci*. 2003 Sept;18(5):1050-60.

Woessner JF. The matrix metalloproteinase family in Parks WC, Mecham RP, edc. *Matrix Metalloproteinases*. San Diego, Calif: Academic Press; 1998:1-13.

Wojtowicz-Praga SM jt. Phase I trial of Marimastat, a novel matrix metalloproteinase inhibitor, administered orally to patients with advanced lung cancer. *J Clin Oncol*. 1998 Jun;16(6):2150-6.

Wojtowicz-Praga SM jt. Matrix metalloproteinase inhibitors. *Invest New Drug* 1997;15:61-75

Wojtowicz-Praga S jt. Phase I trial of a novel matrix metalloproteinase inhibitor batimastat (BB-94) in patients with advanced cancer. *Invest New Drugs*. 1996;14(2):193-202.

Yong VW. The potential use of MMP inhibitors to treat CNS disease. *Exp. Opin. Invest. Drugs* 8, 255-268 (1999)

Yong VW jt. Matrix metalloproteinases and diseases of the CNS. *Trends Neurosci*. 1998 Feb;21(2):75-80.

Yoshiji H jt. Enhanced RNA expression of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in human breast cancer. *Int J Cancer*. 1996 Apr 22;69(2):131-4.

Young DA jt. Identification of an initiator-like element essential for the expression of the tissue inhibitor of metalloproteinases-4 (Timp-4) gene. *Biochem J* 364:89-99.2002.

Yu WH jt. TIMP-3 binds to sulfated glycosaminoglycans of the extracellular matrix. *J Biol Chem*. 2000 Okt 6;275(40):31226-32.

Zhao WQ jt. Cell cycle-associated accumulation of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in the nuclei of human gingival fibroblasts. *J Cell Sci*. 1998 May;111 (Pt 9):1147-53.

Zucker S jt. Membrane type-matrix metalloproteinases (MT-MMP). *Curr Top Dev Biol*. 2003;54:1-74. **Beattie GJ jt.** Phase I study of intraperitoneal metalloproteinase inhibitor BB94 in patients with malignant ascites. *Clin Cancer Res*. 1998 Aug;4(8):1899-902.

LISA 1.

Tabel 3. MMP-dega seotud bioloogilised aktiivsused roti organismis (Visse ja Nagase, 2003 järgi)

Bioloogiline efekt	Vastutav MMP
Keratinotsüütide migratsioon ja re-epitelisatsioon	MMP-1
Osteoblastide aktivatsioon	MMP-13
Neuriitide väljakasv	MMP-2
Adipotsüütide differentseerumine	MMP-7
Rakkude migratsioon	MMP-1, -2, -3
Rakkude migratsioon	MT1-MMP
Rinnanäärme epiteeli rakkude apoptoos	MMP-3
Rinnanäärme epiteeli alveolaari näärmestruktuuride moodustumine	MMP-3
Epiteliaal-mesenhümaalne konversioon	MMP-3
Mesenhümaalsete rakkude diferentseerumine	MMP-2
Vereliistakute agregatsioon	MMP-1
Angiostatiinisarnaste fragmentide genereerimine	MMP-3, -7, -9, -12
Endostatiinisarnaste fragmentide genereerimine	MMP-d
Suurenenud kollageenaasne afiinsus	MMP-2, -3, -7, -9, -13
Neeru tubulogenees	MT1-MMP
bFGF-I vabastamine	MMP-3, -13
Suurenenud IGF-i kättesaadavus ja rakkude jagunemine	MMP-1, -2, -3 MMP-d MMP-11
VEGF-i aktivatsioon	MMP-d
Epiteliaalsete rakkude migratsioon	MMP-2, MT1-MMP
Amnioni epiteliaalsete rakkude apoptoos	Kollageenaas
Eelpõletikuline Põletikueelne seisund	MMP-1, -3, -9
Kasvaja rakkude vastupanu ? kas resistentsus keemiaravile?	MMP-9

Põletikuvastane toime	MMP-1, -2, -9
Põletikuvastane toime	MMP-1, -2, -3, -13, -14
TGF- β suurenenud kättesaadavus	MMP-2, -3, -7
Rakkude agregatsiooni vähenemine ja rakkude invasiivsuse ooni suurenemine tõus	MMP-3 MMP-7
Rakkude adhesiooni ja levimise migratsiooni vähenemine pärssimine	MT1-MMP MT2-MMP MT3-MMP
Fas retseptor-vahendatud apoptoos	MMP-7
Vähenenud IL-2 vastus immuunprotsessides	MMP-9

LISA 2.

Tabel 4. TIMP-1 ekspressiooni analüüs *in situ* hübriidsatsiooni meetodil normaalses inimese kesknärvisüsteemis. Värvingut hinnati järgnevalt: -, negatiivne; +, madal; ++, keskmine; +++, tugev.

Kiibi kood	11102/5/2	CNS180-5	KM8-5	KM5-5
Seljaaju				
Seljaaju	-	-	-	-
Dorsaalsarve neuronid				-
Tagaaju				
Piklikaju, neuronid	-	-	-	-
Olivaartuumad	-	+/-		-
Ajusild	-	-	-	-
Väikeaju				
Purkinje rakud	-	-	-	-
Sisemine granulaarkiht	-	+	+/-	-
Hammastuum	+	+	-	-
Keskaju				
Mustaine	-	+		-
Punatum	-	-	-	-
Eesaju				
Vaheaju				
Taalamus, ventraalne lateraalne tuum	-			-
Taalamus, anterioorne tuum	-			
Taalamus, dorsaalne lateraalne tuum	-	-		
Taalamus, mediaalne tuum	-	+		-
Taalamus, lateraalne posterioorne tuum	-	-		
Mammilaarkehad	-			-
Lateraalne põlvatum	-			-
Suuraju poolkerad				
Frontaalsagar, hallaine	-	+	-	-
Frontaalsagar, valgeaine	-			
Oimusagar, hallaine	-	-	-	-
Parietaalsagar, hallaine	-	-	-	-
Kuklasagar, hallaine	-	-	-	-
Saaresagar (<i>insula</i>)	-	+	-	-
Basaalganglionid				
Sabatuum	-	+	-	-
Koorik (<i>putamen</i>)	-	-	-	-

Kahkjaskaha (<i>globus pallidus</i>), mediaalne	-	-	-	-
Limbiline süsteem				
Hipokampuse neuronid	-	-	-	-
Sakiline ajukurd	-	-	-	-
Parahipokampaalne ajukoor	-	-	-	-
Mandeltuum	-	+/-	+/-	-
Teised				
Mõhnkeha (<i>Corpus callosum</i>)	-	-	-	-
Sisemine kapsel (<i>Capsula interna</i>)	-	-	-	-
Soonpõimik	-		-	
Käbikeha	-			
Hüpopfüüs	-	-	-	
Aju põhimiku arterid (C. Willis)	-			
Ajukelme	-			

LISA 3.

Tabel 5. TIMP-2 ekspressiooni analüüs *in situ* hübriidsatsiooni meetodil normaalses inimese kesknärvisüsteemis. Värvingut hinnati järgnevalt: -, negatiivne; +, madal; ++, keskmine; +++, tugev.

Kiibi kood	M-1	11102/5/2	180-5	1292/5/1	KM8-5	KM5-5
Seljaaju						
Seljaaju		-	-		-	-
Dorsaalsarve neuronid				+++		++
Tagaaju						
Piklikaju, neuronid		-	-	+	+/-	+/-
Olivaartuumad		-	-	+		-
Ajusild	-	-	-	+/+++	++/++++	-
Väikeaju						
Purkinje rakud	-	-	-	-	+	-
Sisemine granulaarkiht	-	+/-	-	+/-	+	+/-
Hammastuum		-	-	-	-	+/+++
Keskaju						
Mustaine		+/-	-	+		-
Punatum		+/-	-	-	+	-
Eesaju						
Vaheaaju						
Taalamus, ventraalne lateraalne tuum		+++		+		-
Taalamus, anterioorne tuum		++		++		+/-
Taalamus, dorsaalne lateraalne tuum		+	-	++		
Taalamus, mediaalne tuum	-	++	-	+	++	+/-
Taalamus, lateraalne posterioorne tuum		+	-	+		
Mammilaarkehad		+	-	+/+++		-
Lateraalne põlvatum		+		-		
Suuraju poolkerad						
Frontaalsagar, hallaine	-	+	-	+	++/++++	-
Frontaalsagar, valgeaine	-	-		-		
Oimusagar, hallaine	-	+	-	+	++	+/-
Parietaalsagar, hallaine	-	+	-	+/-	++	-
Kuklasagar, hallaine		+	-	-	+	-
Saarsagar (<i>insula</i>)		++	-	+	++	+/-
Basaalganglionid						
Sabatum	-	+	-	+	++	-
Koorik (<i>putamen</i>)		+	-	-	+	-

Kahkjaskesha (<i>globus pallidus</i>), mediaalne		-	-	-	++	-
Limbiline süsteem						
Hipokampuse neuronid			-	-		-
Sakiline ajukurd			-	-		-
Parahipokampaalne ajukoor	-	+	-	+	+/-	-
Mandeltuum	-	+	-	+/-	++	+/-
Teised						
Mõhnkeha (<i>Corpus callosum</i>)	-	-	-	-	-	-
Sisemine kapsel (<i>Capsula interna</i>)	-	-	-	-	-	-
Soonpõimik		-		+	+	
Käbikeha		-		-		
Hüpopfüüs		-	-	+	+/-	
Aju põhimiku arterid (C. Willis)		-		-		
Ajukelme		-		+		

LISA 4.

Tabel 6. TIMP-3 ekspressiooni analüüs *in situ* hübriidsatsiooni meetodil normaalses inimese kesknärvisüsteemis. Värvingut hinnati järgnevalt: -, negatiivne; +, madal; ++, keskmine; +++, tugev.

Kiibi kood	M-1	180-5	1292/ 5/1	KM8-5	KM5-5
Seljaaju					
Seljaaju			+	+ /+++	-
Dorsaalsarve neuronid					++ /++++
Tagaaju					
Piklikaju, neuronid		+/-	+/-	+++	+/-
Olivaartuumad		++	+/-		++
Ajusild	-	++ /++++	++	++	++
Väikeaju					
Purkinje rakud	+	+	+/-	+++	+
Sisemine granulaarkiht	+/-	+	+/-	+ /+++	+ /+++
Hammastuum		+	-	-	+ /+++
Keskaju					
Mustaine		++	+/-		+
Punatum		+	-	++	-
Eesaju					
Vaheaju					
Taalamus, ventraalne lateraalne tuum		-	+		+
Taalamus, anterioorne tuum			+		+/-
Taalamus, dorsaalne lateraalne tuum			-		
Taalamus, mediaalne tuum	+/-	+/-	-	+++	-
Taalamus, lateraalne posterioorne tuum		+/-	+		
Mammilaarkehad		+	+/-		-
Lateraalne põlvtuum			-	+++	+ /+++
Suuraju poolkerad					
Frontaalsagar, hallaine	+/-	+	+	+++	+/-
Frontaalsagar, valgeaine	-		-		
Oimusagar, hallaine	++ /++++	-	-	+++	++ /++++
Parietaalsagar, hallaine	-	+/-	+/-	+++	++ /++++
Kuklasagar, hallaine		+	-	++ /++++	+/-
Saaresagar (<i>insula</i>)		+	+/-	++ /++++	-
Basaalganglionid					

Sabatum	+/-	+	+/-	+++	+++/>+++
Koorik (<i>putamen</i>)		++	+	++	+
Kahkjaskesha (<i>globus pallidus</i>), mediaalne		+	-	+++/>++++	+/-
Limbiline süsteem					
Hipokampuse neuronid		+	+	++	
Sakiline ajukurd		-	-	-	
Parahipokampaalne ajukoor	+/-	+	+/-	+/+++	+/-
Mandeltuum	+/+++	++	++	+++	+/-
Teised					
Mõhnkeha (<i>Corpus callosum</i>)	-	-	-	-	-
Sisemine kapsel (<i>Capsula interna</i>)	-	-	-	-	-
Soonpõimik			++	++	
Käbikeha			-		
Hüpopüüs		+/+++	-	+++	
Aju põhimiku arterid (C. Willis)		++	-		
Ajukelme		+++/>++++	++		

LISA 5.

Tabel 7. TIMP-4 ekspressiooni analüüs *in situ* hübriidsatsiooni meetodil normaalses inimese kesknärvisüsteemis. Värvingut hinnati järgnevalt: -, negatiivne; +, madal; ++, keskmine; +++, tugev.

Kiibi kood	180-5	KM8-5	KM5-5
Seljaaju			
Seljaaju		-	-
Dorsaalsarve neuronid			
Tagaaju			
Piklikaju, neuronid	-	-	-
Olivaartuumad	-		-
Ajusild	+/-	-	-
Väikeaju			
Purkinje rakud	+	-	+/-
Sisemine granulaarkiht	-	+/-	+
Hammastuum	-	-	-
Keskaju			
Mustaine	+/-		+
Punatum	-	+	-
Eesaju			
Vaheaaju			
Taalamus, ventraalne lateraalne tuum			-
Taalamus, anterioorne tuum			-
Taalamus, dorsaalne lateraalne tuum	-		
Taalamus, mediaalne tuum	-	-	-
Taalamus, lateraalne posterioorne tuum	-		
Mammilaarkehad	-		-
Lateraalne põlvituum		-	-
Suuraju poolkerad			
Frontaalsagar, hallaine	-	-	-
Frontaalsagar, valgeaine			
Oimusagar, hallaine	-	-	-
Parietaalsagar, hallaine	-	-	-
Kuklasagar, hallaine	-	-	-
Saaresagar (<i>insula</i>)	+/-	-	-
Basaalganglionid			
Sabatuum	+/-	-	-
Koorik (<i>putamen</i>)	-	-	-

Kahkjaskesha (<i>globus pallidus</i>), mediaalne	-	-	-
Limiline süsteem			
Hipokampuse neuronid	-	-	-
Sakiline ajukurd	-	-	-
Parahipokampaalne ajukoor	-	-	-
Mandeltuum	-	-	-
Teised			
Mõhnkeha (<i>Corpus callosum</i>)	-	-	-
Sisemine kapsel (<i>Capsula interna</i>)	-	-	-
Soonpõimik		+	
Käbikeha			
Hüpopfüüs	-	-	
Aju põhimiku arterid (C. Willis)	-		
Ajukelme	-		

LISA 6.

Tabel 8. TIMP-1 ekspressiooni analüüs immuunohistokeemilise analüüsi meetodil normaalses inimese kesknärvisüsteemis. Värvingut hinnati järgnevalt: -, negatiivne; +, madal; ++, keskmine; +++, tugev.

Kiibi kood	M-1	KM9-5	CNS180-5	1292/5/1	KM8-5	KM5-5
Seljaaju						
Seljaaju		-	+/-	+/-	-	+/-
Dorsaa sarve neuronid				+		+
Tagaaju						
Piklikaju, neuronid		+	-	+	+/-	-
Olivaartuumad			+	-		+
Ajusild	-	-	+	+	-	-
Väikeaju	-	-	-	-	-	-
Purkinje rakud	-	-	-	-	+/-	+/-
Sisemine granulaarkiht	-	-	-	-	-	-
Hammastuum		-	++	-		-
Keskaju						
Mustaine		-	-	-		-
Punatum		-		-	-	-
Eesaju						
Vaheaju						
Taalamus, ventraalne lateraalne tuum				-		+/-
Taalamus, anterioorne tuum				+/-		+/-
Taalamus, dorsaalne lateraalne tuum		-	-	-		
Taalamus, mediaalne tuum	+/-	+		+	-	-
Taalamus, lateraalne posterioorne tuum				-		
Mammilaarkehad			+++	-		-
Lateraalne põlv tuum		-		+	+/-	+
Suuraju poolkerad						
Frontaalsagar, hallaine	-	-	-	-	-	-
Frontaalsagar, valgeaine	-			-		
Oimusagar, hallaine	-	-	-	-	-	-
Parietaalsagar, hallaine	-	-	+/-	-	-	-
Kuklasagar, hallaine		-	-	-	-	-
Saarsagar (<i>insula</i>)		-	-	-	-	-
Basaalganglionid						
Sabatuum	-	-	-	-	-	-

Koorik (<i>putamen</i>)		-	-	-	-	-
Kahkjaskesha (<i>globus pallidus</i>), mediaalne		-	-	-	-	-
Limbiline süsteem						
Hipokampuse neuronid Sakiline ajukurd		-		-	-	-
Parahipokampaalne ajukoor	-		-	+/-	-	-
Mandeltuum	-		-	-	-	-
Teised						
Mõhnkeha (<i>Corpus callosum</i>)	-	-	-	+/-	-	-
Sisemine kapsel (<i>Capsula interna</i>)	-	-	-	-	-	-
Soonpõimik				+		
Käbikeha				-		
Hüpopfüüs		+++	+++	+++	+++	
Aju põhimiku arterid (C. Willis)				-		
Ajukelme		++			-	

LISA 7.

Tabel 9. TIMP-2 ekspressiooni analüüs immuunohistokeemilise analüüsi meetodil normaalses inimese kesknärvisüsteemis. Värvingut hinnati järgnevalt: -, negatiivne; +, madal; ++, keskmine; +++, tugev.

Kiibi kood	M-1	KM9-5	CNS180-5	1292/5/1	KM8-5	KM5-5
Seljaaju						
Seljaaju		-	-	-	-	-
Dorsaalsarve neuronid				-		+
Tagaaju						
Piklikaju, neuronid		-	-	-	-	-
Olivaartuumad			+	-		-
Ajusild	-	-	+	+	+	+
Väikeaju	-	-	-	-	-	-
Purkinje rakud	-	-	-	-	-	-
Sisemine granulaarkiht	-	-	-	-	-	-
Hammastuum		-	+	-	-	+
Keskaju						
Mustaine		-	+	-		-
Punatum		-	-	-	-	-
Eesaju						
Vaheaju						
Taalamus, ventraalne lateraalne tuum			-	+		-
Taalamus, anterioorne tuum				+		-
Taalamus, dorsaalne lateraalne tuum		-	-	-		
Taalamus, mediaalne tuum	-	-	-	+	-	-
Taalamus, lateraalne posterioorne tuum				-		
Mammilaarkehad			++	-		-
Lateraalne põlvtuum		-		+	-	-
Suuraju poolkerad						
Frontaalsagar, hallaine	-	-	-	-	-	-
Frontaalsagar, valgeaine	-			-		
Oimusagar, hallaine	-	-	-	-	-	-
Parietaalsagar, hallaine	-	-	-	-	-	-
Kuklasagar, hallaine		-	-	-	-	-
Saarsagar (<i>insula</i>)		-	-	-	-	-
Basaalganglionid						
Sabatuum	-	-		-	-	-

Koorik (<i>putamen</i>)		-	-	-	-	-
Kahkjaskesha (<i>globus pallidus</i>), mediaalne		-	-	-	-	-
Limbiline süsteem						
Hipokampuse neuronid Sakiline ajukurd		-	-	-	-	-
Parahipokampaalne ajukoor	-		-	-	-	-
Mandeltuum	-		-	-	-	-
Teised						
Mõhnkeha (<i>Corpus callosum</i>)	-	-	-	-	-	-
Sisemine kapsel (<i>Capsula interna</i>)	-	-	-	-	-	-
Soonpõimik				-		
Käbikeha						
Hüpopfüüs		+++	+++	+++	+++	
Aju põhimiku arterid (C. Willis)				-		
Ajukelme		-			-	

LISA 8.

Tabel 10. TIMP-3 ekspressiooni analüüs immuunohistokeemilise analüüsi meetodil normaalses inimese kesknärvisüsteemis. Värvingut hinnati järgnevalt: -, negatiivne; +, madal; ++, keskmine; +++, tugev.

Kiibi kood	M-1	KM9-5	CNS180-5	1292/5/1	KM8-5	KM5-5
Seljaaju						
Seljaaju		++	+++	+++	-	
Dorsaalsarve neuronid				+++		
Tagaaju						
Piklikaju, neuronid		+++	-	++/+++	-	
Olivaartuumad			++	++++		
Ajusild	++	+++	+	++/+++	+	+++
Väikeaju						
Purkinje rakud	+++	+++	+	+++	+++	+++
Sisemine granulaarkiht	-	-	+	-	-	-
Hammastuum		+++		-	-	++
Keskaju						
Mustaine		+++	-	++		+++
Punatum		+++	-	+++	+	++
Eesaju						
Vaheaju						
Taalamus, ventraalne lateraalne tuum			-	+++		+++
Taalamus, anterioorne tuum				++		++
Taalamus, dorsaalne lateraalne tuum		+++	-	+++		
Taalamus, mediaalne tuum	++	++/+++	-	++	++	++
Taalamus, lateraalne posterioorne tuum				++		
Mammilaarkehad			++	+++		++/+++
Lateraalne põlvtuum		+		+++	++	+++
Suuraju poolkerad						
Frontaalsagar, hallaine	+++	++/+++	-	+	++	+++
Frontaalsagar, valgeaine	-			-		
Oimusagar, hallaine	++	+++	-	++/+++	+/-	+++
Parietaalsagar, hallaine	+++	+++	+/-	+++	+	+++
Kuklasagar, hallaine		++	-	+	++	+/-

Saaresagar (<i>insula</i>)		+	+/-	++	+	++
Basaalganglionid						
Sabatuum	++	+	+	+	+/-	+/-
Koorik (<i>putamen</i>)		++	+/-	+	+/-	+
Kahkjaskaheha (<i>globus pallidus</i>), mediaalne		++	+/-	++	+	++
Limbiline süsteem						
Hipokampuse neuronid		+++	-	+++	+/-	-
Sakiline ajukurd		++	++			
Parahipokampaalne ajukoor	+		+	++		
Mandeltuum	+++		+	++/+++	+/>+++	++
Teised						
Mõhnkeha (<i>Corpus callosum</i>)	-	-	-	-	++	-
Sisemine kapsel (<i>Capsula interna</i>)	++	++	-	-	+/-	-
Soonpõimik				++		
Käbikeha						
Hüpopfüüs		++	+/>+++	++	+	
Aju põhimiku arterid (C. Willis)				++		
Ajukelme		++			-	

LISA 9.

Tabel 11. TIMP-4 ekspressiooni analüüs immuunohistokeemilise analüüsi meetodil normaalses inimese kesknärvisüsteemis. Värvingut hinnati järgnevalt: -, negatiivne; +, madal; ++, keskmine; +++, tugev.

Kiibi kood	M-1	KM9-5	CNS180-5	1292/5/1	KM8-5	KM5-5
Seljaaju						
Seljaaju		-	-	-	-	
Dorsaalsarve neuronid				-		
Tagaaju						
Piklikaju, neuronid		-	-	+/-	+/-	
Olivaartuumad			+	-		
Ajusild	-	+/-	+	+	-	-
Väikeaju						
Purkinje rakud	-	-	-	-	-	+/-
Sisemine granulaarkiht	-	-	+	-	-	+
Hammastuum		-	-	+	-	-
Keskaju						
Mustaine		-	-	-		-
Punatum		-	-	-	-	-
Eesaju						
Vaheaju						
Talamus, ventraalne lateraalne tuum			-	+/-		-
Talamus, anterioorne tuum				+/-		+/-
Talamus, dorsaalne lateraalne tuum		-	-	-		
Talamus, mediaalne tuum	+/-	-	-	+	-	-
Talamus, lateraalne posterioorne tuum				+/-		
Mammilaarkehad			-	-		-
Lateraalne põlvatum		-		+/-	+/-	-
Suuraju poolkerad						
Frontaalsagar, hallaine	-	+/-	-	+	-	+/-
Frontaalsagar, valgeaine	-			-		
Oimusagar, hallaine	-	+/-	-	-	-	+/-
Parietaalsagar, hallaine	-	-	-	+	-	+
Kuklasagar, hallaine		-	-	+/-	-	+/-
Saarsagar (<i>insula</i>)		-	+	-	-	+
Basaalganglionid						

Sabatuum	-	-	+/-	-	-	-
Koorik (<i>putamen</i>)		-	-	-	-	+
Kahkjaskesha (<i>globus pallidus</i>), mediaalne		-	-	+	-	+/-
Limbiline süsteem						
Hipokambi neuronid		-	-	-	-	++
Sakiline ajukurd		-	-	-	-	-
Parahipokampaalne ajukoor	-		-	-	-	-
Mandeltuum	-		+	-	-	-
Teised						
Mõhnkeha (<i>Corpus callosum</i>)	-	-	-	-	-	+
Sisemine kapsel (<i>Capsula interna</i>)	-	-	-	+/-	-	+/-
Soonpõimik				-		
Käbikeha						
Hüpopfüüs		+/+++	+	+	+/-	
Aju põhimiku arterid (C. Willis)				-		
Ajukelme		+				