

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

Arina Lavrits

**Trofoblasti rakuliini HTR-8/SVneo mikrovesiikulite ja eksosoomide sisenemine
endomeetriumi rakuliinide RL95-2 ja HEC-1A rakkudesse.**

Magistritöö
30 EAP
Rakubioloogia eriala

Juhendajad:
Sulev Ingerpuu, dotsent
Mariann Koel, M. Sc.

TARTU 2016

Trofoblasti rakuliini HTR-8/SVneo mikrovesiikulite ja eksosoomide sisenemine endomeetriumi rakuliinide RL95-2 ja HEC-1A rakkudesse.

Magistritöö

Arina Lavrits

Lühikokkuvõte. Nii retseptorse kui ka mitteretseptorse endomeetriumi kartsinoomi rakuliinide rakud võtavad sisse trofoblasti rakuliini HTR8/SVneo rakkudest pärit mikrovesiikuleid ja eksosoomi, kusjuures HEC-1A rakkudesse mikrovesiikulid sisenevad põhimõtteliselt makropinotsütoosi ja klatriin-vahendatud endotsütoosi teel. RL95-2 rakkude kohta ei saa praegu öelda, mis mehhanismi mikrovesiikulid kasutavad rakkudesse sisenemiseks. Kuid kuivõrd tegemist on kasvajaliste rakkudega, siis ei ole saadud tulemuste põhjal võimalik öelda, kas see kehtib ka normaalsete rakkude puhul. Edasises töös tuleb siiski arvestada, et normaalsete trofoblastide ja endomeetriumi rakkude kasvatamine on väga keeruline ning siiani puuduvad andmed kuivõrd efektiivselt toimub nendest rakkudest vesiikulite sekreteerimine.

CERCS teaduseriala: B200 Tsütoloogia, onkoloogia, kantseroloogia; B210 Histoloogia, tsütokeemia, histokeemia, koekultuurid

Märksõnad: endomeetrium, trofoblastid, mikrovesiikulid, eksosoomid, endotsütoos

The uptake of trophoblast cell line derived microvesicles and exosomes by endometrial cell line HEC-1A and RL95-2 cells.

Master' thesis

Arina Lavrits

Abstract. Both receptive (RL95-2) and non-receptive (HEC-1A) endometrial cells take up trophoblast cell line HTR-8/SVneo-derived microvesicles and exosomes. But since we used carcinoma cell lines we cannot assert that the same tendency applies to normal cells. At the same time HEC-1A cells internalize trophoblast-derived microvesicles via macropinocytosis and clathrin-mediated endocytosis. For RL95-2, we cannot determine what endocytosis pathway cells use for microvesicles' internalization. In further studies it is worth to take into account that cultivation of normal trophoblast and endometrial cells is very complicated and moreover, until now there is no data about the secretion of vesicles by these cells.

CERCS research specialization: B200 Tsütoloogia, onkoloogia, kantseroloogia; B210

Histoloogia, tsütokeemia, histokeemia, koekultuurid

Keywords: endometrium, trophoblasts, microvesicles, exosomes, endocytosis

SISUKORD

SISUKORD.....	4
KASUTATUD LÜHENDID.....	6
SISSEJUHATUS.....	7
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	8
1.1. Rakuvälised vesiikulid.....	8
1.1.1. Apoptoetilised kehad.....	9
1.1.2. Mikrovesiikulid.....	10
1.1.3. Eksosoomid.....	11
1.2. Platsenta.....	12
1.3. Endotsütoos.....	13
1.3.1. Fagotsütoos ja makropinotsütoos.....	13
1.3.2. Kaveoliin-vahendatud endotsütoos.....	14
1.3.3. Klatriin-vahendatud endotsütoos.....	16
2. EKSPERIMENTAALNE OSA.....	19
2.1. Töö eesmärgid.....	19
2.2. Materjalid ja meetodika.....	20
2.2.1. Endotsütoosi radade inhibiitorid.....	20
2.2.2. Kasutatud rakuliinid.....	20
2.2.3. Mikrovesiikulite ja eksosoomide eraldamine.....	21
2.2.4. Trofoblasti rakuliini HTR-8/SVneo rakkudest pärit mikrovesiikulite ja eksosoomide sissevõtmine endomeetriumi rakuliinide RL95-2 ja HEC-1A ning kopsukartsinoomi H1299 rakkude poolt.....	22
2.3. Tulemused.....	25
2.3.1. Trofoblasti rakuliini HTR-8/SVneo mikrovesiikulite ja eksosoomide sissevõtmine endomeetriumi rakuliinide RL95-2 ja HEC-1A rakkude poolt.....	25
2.3.2. Fluorestseeruvat märgist kandva antihega seotud polüstüreenkerakeste sissevõtmine endomeetriumi rakuliinide RL95-2 ja HEC-1A rakkude poolt.....	30
2.3.3. Trofoblasti rakuliini HTR-8/SVneo mikrovesiikulite sissevõtmine endotsütoosi inhibiitoritega mõjutatud endomeetriumi rakuliinide RL95-2 ja HEC-1A rakkudesse...	32
2.4. Arutelu.....	34
KOKKUVÕTE.....	39
SUMMARY.....	41
KASUTATUD KIRJANDUS.....	43

KASUTATUD VEEBIAADRESSID	54
LISAD	55
TÄNUSÕNAD	56
LIHTLITSENTS LÕPUTÖÖ REPRODUTSEERIMISEKS JA LÕPUTÖÖ ÜLDSUSELE KÄTTESAADAVAKS TEGEMISEKS	57

KASUTATUD LÜHENDID

- BSA – veise seerumi albumiin (ingl. k. *bovine serum albumin*)
- DAPI – 4',6-diamidino-2-fenüülindool
- EDTA – etüleendiamiintetraäädikhape (ingl. k. *ethylenediaminetetraacetic acid*)
- EGF – epidermaalne kasvufaktor (ingl. k. *epidermal growth factor*)
- EIPA – 5-(N-etüül-N-isopropüül)amüloriid (ing. k. *5-(N-ethyl-N-isopropyl)amiloride*)
- ER – tsütoplas mavõrgustik ehk endoplasmaatiline retiikulum (ingl. k. *endoplasmic reticulum*)
- FCS – veise loote seerum (ingl. k. *fetal calf serum*)
- GPCR – G-valguga seotud retseptor (ingl. k. *G-protein-coupled receptor*)
- hCG – inimese koorioni gonadotropiin (ingl. k. *human chorionic gonadotropin*)
- hPL – inimese platsenta laktogeen (ingl. k. *human placenta lactogene*)
- HDL – kõrge tihedusega lipoproteiin (ingl. k. *high density lipoprotein*)
- LDL – madala tihedusega lipoproteiin (ingl. k. *low density lipoprotein*)
- MMP – maatriks metalloproteaas (ingl. k. *matrix metalloproteinase*)
- MV – mikrovesiikulid
- PBS – fosfaadiga puhverdatud soolalahus (ingl. k. *phosphate buffered saline*)
- PDGF – trombotsüütide kasvufaktor (ingl. k. *platelet-derived growth factor*)
- ROCK – *Rho*-ga seotud proteiinkinaas I (ingl. k. *Rho-associated protein kinase I*)
- RTK – retseptor-türosiin-kinaas (ingl. k. *receptor tyrosine kinase*)

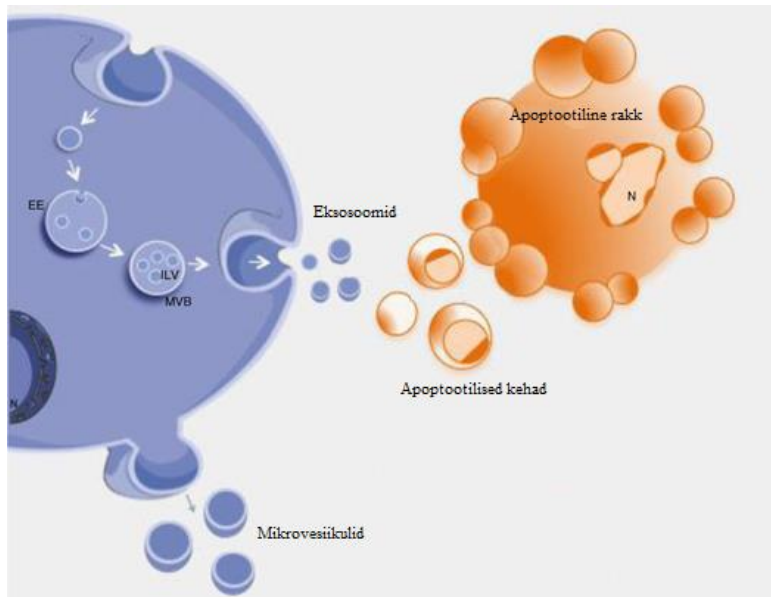
SISSEJUHATUS

Raseduse perioodil toimub väga tihe ja täpselt reguleeritud suhtlemine embrüo ja ema organismi vahel. Loooteepoolse platsenta trofoblastid sisenevad emakaseina ning seostuvad seal eri tüüpi rakkudega, milleks on näiteks makrofaagid, endomeetriumi strooma rakud, endomeetriumi epiteelirakud ning veresoone endoteeli rakud. Trofoblastid sekreteerivad maatriksmetalloproteaase (MMP), mille abil nad lagundavad rakuvälist maatriksit. Trofoblastid seostuvad endomeetriumi strooma rakkudega, käivitades signaaliradasid, mis muudavad rakkude geeniekspressiooni ning selle kaudu nende morfoloogiat ja metabolismi. On näidatud, et trofoblastid sekreteerivad valkude fragmente mille rolli tänaseni ei teata, kuid võib eeldada, et need (näiteks laminiinide fragmendid) käituvad kui signaalmolekulid. Lisaks sellele nii emaka kui ka embrüo rakud sekreteerivad ise suurel hulgal signaalmolekule (eelkõige hormone), mis ema verre sattudes mõjutavad kogu organismi metabolismi. Viimastel aastatel on selgunud, et väga olulisteks informatsiooni kandjateks on rakuvälised vesiikulid, milleks on eksosoomid ja mikrovesiikulid. Juba on teada eksosoomide miRNA-sid, mis muudavad sihtmärkrakkude geeniekspressiooni mustrit ning vaigistavad konkreetseid gene. Rakuvälise signaalide kaudu reguleeritakse embrüo implantatsiooni, näiteks suurendades rakkude adhesiivsust. Tänapäevaks on selgunud, et signaalide ülekande toimub ka vesiikulite kaudu, sest rakkude pinnale kinnitunud või neisse sisenenud eksosoomid ja mikrovesiikulid vallandavad rakkudes signaalide kaskaadi. Uurides vesiikulite kaudu toimuvaid signaalide ülekandeid, tuleb arvestada, et oluline osa nende kulgemise reguleerimises on ka vesiikulite rakku sisenemise viisidel. Tundes vesiikulite rakkudele kinnitumise ja sisenemise mehhanisme on võimalik täpsemalt jälgida vesiikulite poolt mõjutatud signaaliradasid ning hinnata vesiikulite toime füsioloogilisi tagajärgi. Selline teadmine võimaldaks paremini aru saada, kuidas toimub suhtlemine embrüo ja endomeetriumi vahel, mis on määrava tähtsusega implantatsioonil ja platsenta väljakujunemises.

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida, kas endomeetriumi ja trofoblasti rakkude vahel toimuv suhtluses osalevad trofoblastidest pärit eksosoomid ja mikrovesiikulid. Kuivõrd me kasutasime mudelina kasvajalist päritolu endomeetriimirakke, siis oli oluline uurida kas trofoblastidest pärit vesiikulid võiksid siseneda ka mingitesse teist koelist päritolu rakkudesse. Meid huvitas ka vastupidine võimalus, nimelt kas mõnest teisest koetüübist pärit rakkude vesiikulid sisenevad endomeetriimirakkudesse ning kui see nii on, kas sel juhul erineb see trofoblastide vesiikulite sisenemisest. Lisaks eelnevale huvitas meid, millise mehhanismi kaudu võiksid trofoblastidest pärit olevad mikrovesiikulid siseneda endomeetriumi rakkudesse.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Rakuvälised vesiikulid



Joonis 1. Rakuvälised vesiikulid. Rakud sekreteerivad väliskeskkonda kolme tüüpi vesiikuleid, milleks on apoptootilised kehad, mikrovesiikulid ja eksosoomid. EE – varane endosoom (ingl. k. *early endosome*); MVB – multivesikulaarne keha (ingl. k. *multivesicular body*); ILV – endosoomisisesed vesiikulid (ingl. k. *intraluminal vesicles*); N – tuum (ingl. k. *nucleus*). Modifitseeritud (Yáñez-Mó et al., 2015) järgi.

Viimaste aastate jooksul on leitud üha uusi tõendeid, et enamus normaalselt funktsioneerivaid pro- ja eukarüootide rakke sekreteerivad rakuvälisesse ruumi vähemalt kahte eri tüüpi vesiikuleid. Rahvusvaheline Rakuväliste Vesiikulite Ühing (ingl. k. *International Society for Extracellular Vesicles*) on seisukohal, et rakkude poolt sekreteeritud vesiikuleid tuleks nimetada „rakuvälisteks“ või siis „ekstratsellulaarseteks“ vesiikuliteks ning neid võib liigitada kolme põhitüüpi: apoptootilised kehad, mikrovesiikulid ja eksosoomid. Nende suurus, tekkemehhanism ja tihti ka sisaldised on erinevad. Tegelikult võib eristada veel ühte vesiikulite tüüpi, milleks on Golgi vesiikulid (Nawaz, Camussi et al., 2014; Nawaz, Fatima et al., 2014). Tsütoplasma võrgustikus sünteesitud valgud pakitakse vesiikulitesse, mis punguvad välja tema membraanist ning liikudes Golgi kompleksi membraanile ühinevad sellega (Schmid, 1997; Urbé et al., 1997). Valkude transport Golgi kompleksi erinevate osade vahel toimub tsisternide membraani väljapungumise tulemusena moodustunud transportvesiikulite abil (Bonnemaison et al., 2013). Mõnikord suunatakse *trans*-Golgi võrgustikust eraldunud piirkond

plasmamembraani juurde, kus ta sulab sellega kokku. Selle tulemusena vabanevad rakuvälisesse ruumi sekretoorseid valke sisaldavad transportvesiikulid (Nawaz, Camussi et al., 2014; Nawaz, Fatima et al., 2014).

Kõige suuremad vesiikulid, mida rakud väliskeskkonda eraldavad, on apoptootilised kehad. Nende diameeter on 1 – 4 μm (Hristov et al., 2004; Turiák et al., 2011; Turturici et al., 2014). Mikrovesiikulite suurus on vahemikus 80 – 1000 nm (Distler et al., 2005; György et al., 2011; Heijnen et al., 1999; Muralidharan-Chari et al., 2009; Trams et al., 1981; Turiák et al., 2011). Kõige väiksemad rakuvälised vesiikulid on eksosoomid, mille suurus varieerub 40-st kuni 150 nm-ni (Heijnen et al., 1999; Lobb et al., 2015; Muralidharan-Chari et al., 2009; Pan et al., 1985; Trams et al., 1981). Tekkemehhanismi poolest on mikrovesiikulid ja apoptootilised kehad väga sarnased, sest nad moodustuvad plasmamembraani väljapungumise tulemusena ja nende pinnal on eksponeeritud fosfatidüülseriin. Eraldiseisva vesiikulite rühma moodustavad eksosoomid, mis tekivad endosoomide või multivesikulaarsete kehade membraani sissepungumise tulemusena, kusjuures nende membraan on rikastunud kolesterooliga, samal ajal kui fosfatidüülseriini seal praktiliselt ei ole (Heijnen et al., 1999). Eksosoomid vabanevad rakuvälisesse keskkonda kui neid sisaldavate multivesikulaarsete kehade membraan sulab kokku plasmamembraaniga.

1.1.1. Apoptootilised kehad

Apoptoos on programmeeritud raku surm, mille käigus mitokondrid, tsütoplasmaõrgustik (Frank et al., 2001), Golgi kompleks (Lane et al., 2002), tsütoskelett (Taylor et al., 2008) ja rakutuum lagunevad ning DNA lõigatakse fragmentideks (Kerr et al., 1972). Apoptoosi käivitumisel aktiveeritakse kaspasid, mis kutsuvad esile Ca^{2+} -ioonide väljavoolu tsütoplasmaõrgustikust ning selle kontsentratsiooni tõusu raku sees. Ca^{2+} -ioonide toimel inhibeeritakse flippaas, mis transpordib fosfatidüülseriini ja fosfatidüületanolamiini plasmamembraani välisküljelt siseküljele ning aktiveeritakse skramblaas, mille tulemusena fosfatidüülseriin transporditakse sisepinnalt välispinnale (Balasubramanian et al., 2007). Tänapäevaks on teada, et fosfatidüülseriini eksponeerimine välispinnale ei ole põhjustatud mitte ainult ensüümide toimest, vaid ka lüsoosoomide membraanide ühinemisest plasmamembraaniga (Lee et al., 2013). Tegelikult kasutavad rakud lüsoosoomide membraanis tekkivate vigastuste parandamiseks. Kui plasmamembraan saab vigastada, siis tõuseb raku Ca^{2+} -ioonide kontsentratsioon, mille tulemusel transporditakse lüsoosoomid plasmamembraani lähedusse

(Mcneil ja Kirchhausen, 2005). Vigastamata raku puhul taastub Ca^{2+} -ioonide tase ning flipaas transpordib lüsoosoomi membraanist pärit fosfatidüülseriini plasmamembraani välispinnalt sisele. Apoptoosi korral säilib rakusisene Ca^{2+} -ioonide kõrge kontsentratsioon, mistõttu ei transpordita fosfatidüülseriini plasmamembraani sisele tagasi, vaid see jääb raku pinnale.

Enamus lagundamise protsesse on ka seotud kaspasididega. On teada, et peale proteaaside toimet muutuvad mõned valgud funktsionaalselt aktiivseks. Näiteks ROCK I valk aktiveerub kui temale toimivad kaspasid, mis aitab kaasa plasmamembraani all paiknevate müosiini ahelate fosforüleerimisele ja aktiinifilamentide kokkutõmbumisele. Tekkiv pingeline lükkab tsütosooli vastu plasmamembraani, tekitades suuri väljasopistumisi piirkondades, kus tsütoskelett on lagundatud (Taylor et al., 2008). Selle protsessi tulemusena laguneb terve rakk vesiikuliteks, mida nimetatakse apoptootilisteks kehadeks.

1.1.2. Mikrovesiikulid

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

Nii mikrovesiikulite tekkimisel kui ka apoptoosi käigus tõuseb rakusisene Ca^{2+} -ioonide kontsentratsioon, mis omakorda inhibeerib flipaasi ja aktiveerib skramblaasi. Selle tulemusena transporditakse fosfatidüülseriini plasmamembraani välispinnale, mis on väga oluline, sest negatiivse laengu kogunemine kutsub esile vesiikuli väljapungumise. Lisaks sellele leiti, et fosfatidüülseriini osaleb mesenhümaalsetest tüvirakkudest pärit mikrovesiikulite ja eksosoomide sissevõtmises HUVEC (ingl. k. *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) poolt (Wei et al., 2016).

Tänapäeval võib küll palju töid leida, kus räägitakse, et mikrovesiikulid sisenevad erinevatesse rakkudesse, kuid ei ole uuritud, mis sissevõtmise mehhanismiga mikrovesiikulid sattuvad rakkudesse.

1.1.3. Eksosoomid

Kui rakus toimub endotsütoos, siis sopistub plasmamembraan sisse, moodustades varajase endosoomi. Endosoomi küpsemise käigus selle sisemus hapestub ning tema membraan hakkab sisse sopistuma, mille tulemusena tekivad endosoomi luumenisse vesiikulid. Sellist hilist endosoomi, mille luumenis on vesiikulid, nimetatakse multivesikulaarseks kehaks. Kui multivesikulaarse keha membraan sulab kokku plasmamembraaniga, siis vabanevad luumenisesed vesiikulid rakuvälisesse ruumisse. Sellise tekkega vesiikuleid nimetatakse eksosoomideks.

Tänapäevani ei ole päris selge, millise mehhanismi kaudu toimub eksosoomide sisenemine sihtmärkrakkudesse. Nakase jt. (2015) on leidnud tõendeid, et see võiks toimuda makropinotsütoosi teel. Nad leidsid, et kui vähirakkude pinnal olevatele makropinotsütoosi aktiveerivatele retseptoritele kinnituvad ligandid, siis käivitatakse rakus aktiini ümberkorraldumine, tekivad plasmamembraani kurrud ning arenevad välja makropinosoomid. Tekkinud membraanikurdude abil haaratakse makropinosoomidesse plasmamembraanil või selle lähedases asuvad eksosoomid. Kas eksosoomide enda pinnal olevad molekulid võivad käituda sihtmärkrakkude pinnal olevate retseptorite suhtes kui ligandid, jääb ebaselgeks. Nakase jt. (2015) arvavad, et eksosoomide sisenemiseks sihtmärkrakkudesse on vaja nii makropinotsütoosi esilekutsuvate liganide kui ka eksosoomide pinnal olevate valkude seostumist rakupinna retseptoritega. Nad leiavad, et eksosoomide rakkudesse sisenemine klatriin- või kaveoliin-vahendatud endotsütoosi teel on tõenäoliselt väheefektiivne, kuivõrd eksosoomid on peaaegu sama suured (~100 nm) kui klatriin-kaetud lohud. Hiljuti näitasid Heusermann jt. (2016), et eksosoomid sisenevad sihtmärkrakkudesse ühekaupa, kusjuures nende terviklikkus säilib rakku sisenemisel ja ka rakkude sees kuni lüsoosoomidesse jõudmiseni. Veel enam, nad näitasid, et eksosoomid kinnituvad rakkude pinna filopoodidele ning liiguvad mööda neid kuni kohani, kust filopood väljub raku kehaosast. Arvatakse, et see piirkond ongi eksosoomide rakkudesse sisenemise koht (Schneider ja Simons, 2016). On näidatud, et mõnede rakutüüpide puhul sõltub eksosoomide sisenemine sihtmärkrakkudesse nende pinnal ekspresseeruvatest heparaansulfaat proteoglykaanidest (Christianson et al., 2013).

1.2. Platsenta

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

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

1.3. Endotsütoos

1.3.1. Fagotsütoos ja makropinotsütoos

Fagotsütoos avastati immuunsüsteemi rakkudes rohkem kui 100 aastat tagasi. Siis leiti, et rakud võtavad sisse patogeene ja apoptootilisi kehi. Tegelikult võetakse nii fagotsütoosi kui ka makropinotsütoosi puhul rakkudesse suuri osakesi ja vedeliku koguseid. Erinevalt makropinotsütoosist, mille puhul osa rakuvälisest materjalist satub rakku koos vedelikuga, on fagotsütoosi toimumiseks vaja retseptor-ligand sidet, mis käivitab plasmamembraani all paikneva tsütoskeleti ümberkorraldumise ja tekivad pseudopoodid, mis ümbritsevad rakuvälises keskkonnas olevaid osakesi. Retseptorid, mis vahendavad endotsüteeritavate osakeste seostumist on kõrge spetsiifikaga, võrreldes makropinotsütoosi retseptoritega, mis välistab seetõttu ebasobiva materjali fagotsütoosi. Tuleb rõhutada, et fagotsüteerivad rakud ei kasuta mõlemat mehhanismi (fagotsütoosi ja makropinotsütoosi) sama tüüpi materjali sissevõtmiseks. Näiteks makrofaagid võtavad eksosoomi sisse ainult fagotsütoosi teel (Feng et al., 2010).

Esmakordselt kirjeldas makropinotsütoosi Warren Lewis 1931. aastal, kui ta nägi makrofaagide pinnal kurde, mis sulgudes moodustasid rakusiseseid vesiikuleid – makropinosoomi. Vaatamata sellele, et makropinosoomi tekkele eelneb kindlasti plasmamembraani kurdumine, mis on põhjustatud aktiinifilamentide moodustumisest, ei lõpe kurdude membraani pinnalt väljasopistumine alati makropinosoomi tekkega (Li et al., 1997). Raku plasmamembraan asub pidevas dünaamilises seisundis, mis eeldab aktiinifilamentide pidevat ümberkorraldust. Seega plasmamembraani kurdumine, mis esineb erinevat tüüpi rakkude puhul, ei ole mingi erandlik

nähtus ja ei ole alati tingitud makropinotsütoosist. Fagosoomide kõrval on makropinosoomid kõige suuremad endotsüteerivad vesiikulid. Nende diameeter 0,2 – 10 µm (Kou et al., 2013; Swanson ja Yoshida, 2015) pakub rakkudele, kes ei ole fagotsütoosivõimelised alternatiivset võimalust suuremaid molekule sisse võtta.

Makropinotsütoos võib olla kas konstitutiivne või stimuleeritud. Konstitutiivse makropinotsütoosi korral moodustuvad makropinosoomid ilma, et rakkude pinnal olev retseptor seoks mingit ligandi. Näitena võib tuua luuüdi dendriittrakud, mis võivad makropinosoomisse võtta eksogeenset ovalbumiini ja eksponeerida seda raku plasmamembraanil pärast seostumist MHC klass I molekuliga (Norbury et al., 1997). Konstitutiivse makropinotsütoosi puhul ei saa selle protsessi võimendumist vältida. Niisiis konstitutiivset makropinotsütoosi ei pea stimuleerima, kuid võib võimendada. Kõige iseloomulikumaks võimendajaks on PMA (ingl. k. phorbol myristate acetate), mis stimuleerib makrofaagide makropinotsütoosi (Swanson, 1989) ja võimendab seda protsessi luuüdi dendriittrakkudes (Norbury et al., 1997). Stimuleeritud makropinotsütoosi toimumiseks on vaja stiimulit, nagu ütleb ka nimetus. Makropinotsütoosi stiimulite hulka võivad kuuluda kasvufaktorid, forbool estrid, seerumi valgud ja paljud teised ühendid. On näidatud, et EGF (ingl. k. epidermal growth factor) stimuleerib makropinotsütoosi A431 rakuliini rakkudes. Tulemusena retseptor koos ligandiga siseneb raku, võttes kaasa ka teisi molekule, näiteks, HRP (ingl. k. horse radish peroxidase) (Chinkers et al., 1979) või isegi eksosoomi (Nakase et al., 2015). Makropinotsütoosi lõppfaasis lagundatakse makropinosoomi sisaldised lüsoosoomis või transporditakse plasmamembraanile tagasi (Lim ja Gleeson, 2011b)

1.3.2. Kaveoliin-vahendatud endotsütoos

1955. aastal kui Yamada uuris sapipõie epiteelirakke, siis nägi ta rakkude pinnal lohkusid. Ta andis neile nime „caveolae“ (ingl. k. cave „koobas“) (Yamada, 1955). Kaveoolide kuju varieerub sõltuvalt raku tüübist, kusjuures nende diameeter jääb vahemikku 50 - 100 nm (Parton ja Simons, 2007; Peiro et al., 2000; Razani et al., 2002). Endoteelirakkude pinnal olevad kaveoolid on suletud struktuuriga, mille tõttu on molekulide difusioon nendesse raskendatud (Stan et al., 1997; Stan et al., 1999). Lihasrakkudes kujutavad kaveoolid endast liitkobaraid või pudelikujulisi lohkusid, mis osalevad lihasrakkude T-tuubulite moodustumises (Carozzi et al., 2001; Parton et al., 1997). Epiteelirakkudes on mõnedel kaveoolidel avatud struktuur, aga

esineb ka viinamarjakobarate sarnaseid kaveoole (Montesano et al., 1982; Rothberg et al., 1992).

Erinevalt klatriin-kaetud lohkudest, mis moodustuvad kohe plasmamembraani pinnal, tekivad kaveoliiniga kaetud lohud raku sees. Kaveoolide põhilisteks komponentideks on spetsiifilised lipiidised piirkonnad, mis pannakse trans-Golgi võrgustikus kokku ja transporditakse vesiikulite kaudu plasmamembraanile. Need piirkonnad koosnevad glükosfingolipiididest, sfingomüeliinist ja kolesteroolist (Simons ja Toomre, 2000). Põhiliseks siduvaks komponendiks neis piirkondades on kolesterool. Kõigepealt täidab see struktuurset funktsiooni, sidudes kõik komponendid kokku. Lisaks sellele osaleb kolesterool signaali ülekandes kuna ta seostub GPI-ankurdatud valkude ja kaveoliiniga. Teiseks oluliseks komponendiks on kaveoliin-1 (lihasrakkudes kaveoliin-3), mis moodustab kaveooli all valgulise platvormi. Kaveoliin-1 on transmembraanne valk, mis ühendab kõik kaveooli komponendid (Fra et al., 1995) ja on oluliseks adapter-valguks (Sargiacomo et al., 1993). Kolesterool eemaldatakse rakkude plasmamembraanidest pidevalt HDL (ingl. k. high density lipoprotein) apolipoproteiinide abil, mis on osa organismi kaitsemehhanismist (Oram ja Yokoyama, 1996). Kaveoliin-1 seob valmissünteesitud kolesterooli enda külge ja transpordib seda tsütoplasma võrgustikust otse plasmamembraanile (Smart et al., 1994, 1996). Lisaks kaveoliinile sisaldavad kaveoolid ka GPI-ankurdatud valke. GPI-ankurdatud valgud said oma nime tänu glükolipiidile glükosüülfosfatidüülinositolile, mis valkude modifitseerimise käigus pannakse C-terminuse külge ning mis võimaldab selle kaudu valkudel plasmamembraanile kinnituda. Koos kaveoliiniga kannavad GPI-ankurdatud valgud signaali retseptorilt tsütoplasmas olevatele teistele signaali ülekantavatele molekulidele (GTP siduvatele valkudele, anneksiin II-le, seriinkinaasidele) (Sargiacomo et al., 1993). Nagu eespool mainitud osalevad GPI-ankurdatud valgud ja kaveoliin signaali ülekandmises retseptorilt raku sisestele komponentidele. Seega tuleb rõhutada, et kaveoolid sisaldavad türosiin-kinaasirikaid piirkondi (R. G. Anderson, 1998). Näiteks, PDGF (ingl. k. platelet-derived growth factor) ja EGF (ingl. k. epidermal growth factor) seostuvad vastavate türosiin-kinaasi retseptoritega käivitades MAP signaali raja (Liu et al., 1996; Liu et al., 1997).

Lisaks signaali ülekandmisele osalevad kaveoolid endotsütoosis. Kaveoliin-vahendatud endotsütoosi puhul tuleb rääkida pototsütoosist ja transtotsütoosist. Pototsütoos on retseptor-vahendatud endotsütoos, kus kaveoolide poolt endotsüteeritakse molekule, nagu näiteks 5-metüültetraahüdrofolaadi pototsütoos. Kõigepealt seostuvad molekulid GPI-ankurdatud

retseptoritega kaveoolide pinnal. Kui seostunud ligandide kontsentratsioon tõuseb piisavalt kõrgeks, kaveoolid sulguvad ning nende sees pH langeb. Madal pH põhjustab ligandi vabanemise retseptori küljest ja see transporditakse tsütoplasmasse läbi spetsiaalse kanali. Edasi avaneb kaveool uuesti, et siduda uusi ligande (Anderson et al., 1992). Praegu arvatakse, et suletud kaveool vabaneb raku pinnalt ja laseb ligandi molekulid tsütoplasmasse. Uuriti ka potentsütoosi võimalikku osalemist viiruste sisenemisel rakkudesse. Selgus, et sarnaselt 5-metüültetraahüdrolaadiga siseneb ka simiani viirus 40 rakku kaveoolide kaudu. Ainuke erinevus on see, et kaveoolid ei vabasta viirusosakesi tsütoplasmasse. Need sulavad omavahel kokku moodustades torukujulisi kaveoliinivabu neutraalse pH-ga struktuure, mis liikudes mööda mikrotorukesi satuvad tsütoplasmavõrgustikku (Anderson et al., 1996; Pelkmans et al., 2001; Stang et al., 1997).

Transtsütoos kujutab endast kaveoolide transporti läbi raku. Ligand seob retseptori kaveooli pinnal ja edasi järgneb nende vesiikulite transport raku teisele poolele (Schnitzer, 1994). Transtsütoosi näitena võib tuua endoteelirakud, mida müoglobiini molekulid läbivad transportvesiikulite abil (Dvorak et al., 1996; Simionescu et al., 1973, 1975). Eriti tähelepanuväärne on see, et transpordi käigus võivad transportvesiikulid omavahel kokku sulada, moodustades viinamarjakobarakujulisi kogumeid, mis ulatuvad läbi raku ning tekitavad kanali (Dvorak et al., 1996).

Senini ei ole näidatud kaveoolide kokkusulamist endosoomide või lüsoosoomidega, mis on enamuse endotsütoosiradade iseloomulikuks tunnuseks.

1.3.3. Klatriin-vahendatud endotsütoos

Klatriin-vahendatud endotsütoos sai oma nime valgu klatriin järgi, mis soodustab endotsüteeritava vesiikuli teket, moodustades selle pinnal võrgustiku. Klatriini lohku diameeter varieerub sõltuvalt organismi liigist ja rakkude tüübist. Kõige väiksemad klatriini lohud on taimederakkudes ja pärmides (35 – 60 nm) (Dhonukshe et al., 2007; Smaczynska-de Rooij et al., 2010) ning kõige suuremad imetajate rakkudes (70 – 200 nm) (Cheng et al., 2007; Ehrlich et al., 2004).

Endotsütoosi esimeses etapis määratakse endotsüteerimise koht plasmamembraanis, kuhu transporditakse abivalgud. Selleks kohaks on tavaliselt mingi transmembraanne retseptor

(Henne et al., 2010). Tulevasele endotsütoosi kohale transporditakse kõigepealt F-BAR domääni sisaldavad FCHo1 ja 2 valgud. Need valgud painutavad plasmamembraani, moodustades selle pinnal lohu ning seovad teisi klatriini lohu ehitamises osalevaid valke – eps15 ja intersektiini (Henne et al., 2010). Lohu tekkes osaleb samuti selline valk nagu SGIP- α , mis seondub eps15 valguga (Stimpson et al., 2009). Järgmisena transporditakse plasmamembranile AP2 valk, mille põhiliseks ülesandeks on siduda endotsüteeritavat molekuli. AP2 seostub transmembraanse retseptoriga kas otseselt valgu tsütoplasmaatilises osas paiknevate motiivide kaudu või sidudes adaptervalke, mis seostuvad omakorda endotsüteeriva molekuliga (Kelly et al., 2008). AP2 koos teiste adaptervalkudega viivad läbi endotsütoosi olulist etappi – nad sorteerivad endotsütoosi minevaid molekule (Traub, 2009). Lisaks sorteerimisele täidab AP2 ka struktuurset funktsiooni, kuna ta osaleb vesiikulite moodustumises ning on leitud, et ainult abivalgude kogunemisest plasmamembraani pinnale ei piisa küpse vesiikuli moodustumiseks (Boucrot et al., 2010; Motley et al., 2003). Peale endotsüteeritavate molekulide väljasortimist moodustub lohu pinnale klatriinivõrgustik, mis soodustab membraani kõverdamist ja seega vesiikuli tekkimist (Hinrichsen et al., 2006). Klatriinvalgud seotakse lohu pinnale AP2 ja adaptervalkude poolt ning nad aitavad vesiikuli sissepungumisele kaasa. Tuleb rõhutada, et lisaks klatriinile katavad lohku ka teised membraani painutavad valgud, millel on tavaliselt BAR-domään (Frost et al., 2008; Henne et al., 2007; Peter et al., 2004). Seega klatriini võrgustik stabiliseerib moodustuva vesiikuli kumerust, kuid seda ei saa pidada põhiliseks painutavaks jõuks. Mõnedel juhtudel klatriinimolekulid moodustavad lameda võrgustiku, mis ei soodusta membraani kumerdumist (Saffarian et al., 2009). Vesiikuli moodustumise viimaseks etapiks on dünaamiini seondumine. See ensüüm seotakse moodustuva vesiikuli kaela piirkonda adaptervalkude poolt ning ta viib läbi GTP hüdrolyüüsi ja lõhustab membraani (Bashkurov et al., 2008; Roux, Uyhazi, Frost, & De Camilli, 2006; Sweitzer & Hinshaw, 1998). Peale vesiikulite moodustumist klatriinkate dissotsieerub ning vesiikul sulab kokku endosoomiga (Schlossman et al., 1984).

Klatriin-vahendatud endotsütoos võib olla kas stimuleeritud või konstitutiivne. Stimuleeritud endotsütoosi puhul retseptori seondumine ligandiga käivitab selle rakku sisenemise, samal ajal kui konstitutiivselt endotsüteeritud retseptor võib siseneda rakku ka ligandiga seondumata. Retseptor-türosiin-kinaasi (ingl. k. receptor tyrosine kinase, RTK) ja G-valguga seotud retseptorid (ingl. k. G-protein-coupled receptor, GPCR) on klassikalised stimuleeritud endotsütoosi raja esindajad. Peale seda kui retseptor on ligandiga seondunud, toimub kas retseptori dimerisatsioon (RTK puhul) (Dawson et al., 2005) või selle konformatsiooniline

muutumine (GPCR) (Tsukamoto ja Farrens, 2013). Konstitutiivse endotsütoosi näitena võib tuua transferiini ja LDL (ingl. k. low density lipoprotein) retseptorid. Need valgud sisaldavad motiive, mis käivitavad retseptorite aktiivse endotsütoosi (Anderson et al., 1977; Motley et al., 2003; Spencer et al., 1990).

Klatriin-vahendatud endotsütoosil on kaks põhilist ülesannet: korjata rakku väliskeskkonnas olevaid vajalikke metaboliite (kolesterooli, rauda) ja läbi retseptor-ligand seondumise kanda rakku üle signaale, mis muudavad selle homeostaasi, kasvu ning diferentseerumist. Kui rääkida signaaliradade reguleerimisest, siis rakud püüavad ka signaale välja lülitada. Selleks nad eemaldavad vastavat retseptorit raku pinnalt endotsütoosi teel, nagu näiteks on Wnt ligandi sidumine Frizzled retseptori külge. Wnt ligandi kontsentratsiooni gradient rakuvälises ruumis tagab embrüo normaalse arengu, kusjuures selle hoidmiseks endotsüteerivad rakud liigsed retseptorid (Yu et al., 2007).

,

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1. Töö eesmärgid

Käesoleva töö eesmärgiks oli esiteks uurida, kas trofoblasti rakuliini HTR-8/SVneo rakkudest pärit mikrovesiikulid ja eksosoomid sisenevad retseptoorse endomeetriumi rakuliini RL95-2 ja mitteretseptoorse endomeetriumi rakuliini HEC-1A rakkudesse. Teiseks, me tahtsime selgitada, kas retseptoorse (RL95-2 rakud) ja mitteretseptoorse (HEC-1A rakud) endomeetriumi rakud erinevad mikrovesiikulite ja eksosoomide sissevõtmise taseme poolest. Kolmandaks me soovisime selgitada, millise mehhanismi kaudu toimub mikrovesiikulite ja eksosoomide sisenemine endomeetriumi rakkudesse.

Nende eesmärkide saavutamiseks viisime läbi järgmised katsed:

1. Eraldasime HTR-8/SVneo rakkude poolt sekreteeritud mikrovesiikulid ja eksosoomid kasvukeskkonnast.
2. Inkubeerisime endomeetriumi rakuliinide rakke trofoblasti mikrovesiikulite ja eksosoomidega erineva ajavahemike jooksul.
3. Uurisime, millise efektiivsega sisenevad kopsukartsinoomi H1299 mikrovesiikulid RL95-2 ja HEC-1A rakkudesse, võrreldes HTR-8/SVneo mikrovesiikulitega. Meid huvitas, kas endomeetriumi rakkudele seostuvad ja neisse sisenevad ainult trofoblasti rakkudest pärit vesiikulid või on tegemist mittespetsiifilise protsessiga.
4. Me mõjutasime endomeetriumi rakke erinevate endotsütoosi pärssivate inhibiitoritega, et leida, millise mehhanismi kaudu toimub mikrovesiikulite rakkudesse sisenemine.

2.2. Materjalid ja meetodika

2.2.1. Endotsütoosi radade inhibiitorid

Inhibiitor	Firma, riik	Inhibeeritav endotsütoosi rada	Algkontsentratsioon	Lahjendus
EIPA (ingl. k. 5-(<i>N</i> -Ethyl- <i>N</i> -isopropyl)amiloride)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, USA	Makropinotsütoos	100 mM	1:1000
Kloorpromasiin (ingl. k. chlorpromazine)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, USA	Klatriin-vahendatud endotsütoos	10 mM	1:1000
Nistatiin (ing. k. nystatin)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, USA	Kaveoliin-vahendatud endotsütoos	50 mM	1:1000

2.2.2. Kasutatud rakuliinid

Selle töö läbiviimisel kasutati inimese esimese trimestri trofoblastide rakuliini HTR-8/SVneo, inimese endomeetriumi kartsinoomi rakuliine RL95-2 ja HEC-1A ning inimese kopsukartsinoomi rakuliini H1299.

HTR-8/SVneo ja H1299 rakuliine kasvatati keskkonnas, milles oli 90% RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute medium*) (Capricorn Scientific GmbH, Saksamaa) söödet ja 10% loote veise seerumit (ingl. k. *foetal calf serum*, FCS) (PAN Biotech GmbH, Saksamaa) ning millele lisati 100 µg/ml streptomüsiini ja 100 U/ml penitsilliini. RL95-2 rakuliini kasvatati keskkonnas, milles oli 90% DMEM:F12 (*Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12*) söödet (Gibco, USA) 10% loote veise seerumit ning 100 µg/ml streptomüsiini ja 100 U/ml penitsilliini. Sellesse kasvukeskkonda lisati ka 5 µg/ml insuliini. HEC-1A rakke kasvatati keskkonnas, milles oli 90% McCoy's 5A söödet, 10% loote veise seerumit ning 100 µg/ml streptomüsiini ja 100 U/ml penitsilliini. Kõiki rakuliine kasvatati 5% CO₂ juuresolekul veeauruga küllastatud atmosfääris temperatuuril 37°C. Enne ümberkülvamist pesti rakke steriilse 1×PBS-ga ning eemaldati plastikult 0,05%-lise trüpsiini ja 0,02%-lise EDTA lahusega 1×PBS-s (Naxo OÜ, Eesti). Seejärel inhibeeriti trüpsiini toime seerumit sisaldava söötmega, mida võeti trüpsiini lahusega võrdses mahus. Rakud sadestati tsentrifuugides (tsentrifuug

4K15C, Sigma) 350 g ja 20°C juures 5 min jooksul. Pärast seda külvati rakud Petri tassidesse ja kasvatati 2-3 päeva, kuni saavutati 80-100%-line konfluentsus.

2.2.3. Mikrovesiikulite ja eksosoomide eraldamine

Selleks, et sadestada H1299 ja HTR-8/SVneo rakkude poolt kasvukeskkonda sekreteeritud mikrovesiikuleid ja eksosoomi, kasutati ultratsentrifuugimist (Théry et al., 2006). Selle meetodi põhimõte on selles, et erineva suuruse ja tihedusega struktuurid sadenevad erineva tsentrifugaaljõuga. Mida suuremad ja tihedamad on vesiikulid, seda väiksemat jõudu tuleb rakendada (van der Pol et al., 2012). Eksosoomide diameetri varieeruvus on 40-150 nm (>100 nm eksosoomid moodustavad väikse osa kogu populatsioonist) (Heijnen et al., 1999; Muralidharan-Chari et al., 2009; Lobb et al., 2015). Kõige väiksemate mikrovesiikulite diameeter on 80 nm ja kõige suuremate - 1 µm (Heijnen et al., 1999; Distler et al., 2005; György et al., 2011; Muralidharan-Chari et al., 2009; Turiák et al., 2011). Seega võivad suuremad eksosoomid sadeneda koos mikrovesiikulitega ja vastupidi, väiksemad mikrovesiikulid koos eksosoomidega. Rakkudele kantav sööde ultratsentrifuugiti alati 1 tund 100000×g ja 4°C juures, selleks et eemaldada loote veise seerumis sisalduvad vesiikulid (ultratsentrifuug L8-M, rootor 45Ti, Beckman, USA). Peale tsentrifuugimist sööde filtreeriti (filtri poori läbimõõt 0,2 µm; Corning, USA). Rakke kasvatati 24 tundi, misjärel eemaldati neilt kasvukeskkond, mida tsentrifuugiti 2000×g (tsentrifuug 4K15C, Sigma) ja 4°C juures 20 min jooksul apoptootiliste kehade ning rakkude tükikeste eemaldamiseks (Théry et al., 2006; Turiák et al., 2011). Seejärel ultratsentrifuugiti supernatanti 1 tund 10000×g ja 4°C juures (ultratsentrifuug L8-M, rootor 45Ti, Beckman, USA) mikrovesiikulite eraldamiseks. Selleks, et eemaldada mikrovesiikulitelt söötme valke, lahustati sadenenud materjal 1×PBS-s ja ultratsentrifuugiti 10 min 16000×g (tsentrifuug 5415R, Eppendorf, Saksamaa) ja 4°C juures. Mikrovesiikulite sade lahustati 1×PBS-s ning säilitati -80°C juures.

Eksosoomide eraldamiseks ultratsentrifuugiti mikrovesiikulite sademelt eemaldatud supernatanti 100000×g ja 4°C juures (ultratsentrifuug L8-M, rootor 45Ti, Beckman, USA) 1 tunni jooksul. Sadenenud materjal suspendeeriti ja filtreeriti (filtri poori läbimõõt 0,22 µm; Sartorius Stedim Biotech GmbH, Germany) ning ultratsentrifuugiti 100000×g ja 4°C juures (ultratsentrifuug L8-M, rootor Sw41Ti, Beckman, USA) 1 tunni jooksul. Sadenenud eksosoomid lahustati 1×PBS-s ja säilitati -80°C juures.

Vahetult enne külmutamist mõõdeti mikrovesiikulite ja eksosoomide hulka spektrofotomeetriselt (NanoDrop 1000 Spectrophotometer; Thermo Scientific, USA).

2.2.4. Trofoblasti rakuliini HTR-8/SVneo rakkudest pärit mikrovesiikulite ja eksosoomide sissevõtmine endomeetriumi rakuliinide RL95-2 ja HEC-1A ning kopsukartsinoomi H1299 rakkude poolt.

2.2.4.1. Latekskerakeste märgistamine.

Selleks, et tuvastada, kas endomeetriumi rakuliinide HEC-1A ja RL95-2 rakud võiksid osakesi fagotsüteerida, inkubeeriti neid polüstüreenkerakestega (Spherotech Inc) (Desjardins ja Griffiths, 2003; Feng et al., 2010; Seyrantepe et al., 2010).

Me kasutasime polüstüreenkerakesi diameetriga 0,6 µm ja 0,07 µm, mis märgistati Alexa Fluor 488-ga seotud küüliku immunoglobuliinide vastase kana polükloonaalse antikehaga (Thermo Fisher Scientific, USA) (lahjendus vastavalt 1:11 ja 1:14). Polüstüreenkerakeste märgistamine viidi läbi vastavalt tootja firma poolt esitatud protokollile (Spherotech Inc).

Polüstüreenkerakesi inkubeeriti antikeha lahuses pimedas 1 tund 37°C juures (Majeed et al., 2001). Peale inkubeerimist sadestati polüstüreenkerakesed 10000×g juures 5-10 min jooksul, aspireeriti supernatant ja lahjendati 1×PBS-is. Märgistatud polüstüreenkerakesed säilitati 1×PBS-s 4°C juures 1-4 päeva.

2.2.4.2. Mikrovesiikulite ja eksosoomide märgistamine.

Nii mikrovesiikuleid kui ka eksosoomide märgistati FM 1-43 (N-(3-trietüülammooniumpropüül)-4-(4-dibutüülamiino)stürüül)püridiinium dibromiid) värviga (Molecular Probes, USA).

Mikrovesiikulid ja eksosoomid lahjendati 1×PBS-is, kuhu lisati FM 1-43 värvi (lahjendus 1:1000) ja inkubeeriti jääl pimedas 5 min. Peale seda sadestati mikrovesiikulid 16000×g (tsentrifuug 5415R, Eppendorf, Saksamaa) ja 4°C juures 10 min jooksul ning sade lahustati 1×PBS-is. Eksosoomid sadestati 1 tund 100000×g (tsentrifuug Optima MAX-XP, Beckman Coulter, USA) ja 4°C juures ning sade lahustati 1×PBS-is.

2.2.4.3. Mikrovesiikulite ja eksosoomide sissevõtmine retsipientrakkude poolt.

Lisaks endomeetriumi rakuliinidele kasutasime ka rakuliini H1299 rakke, selleks et uurida, kas ja kui efektiivselt võiksid teist koelist päritolu (s.o. kopsukartsinoomi rakud) trofoblasti rakkudest eraldunud mikrovesiikuleid ja eksosoomide sisse võtta.

HEC-1A, RL95-2 ja H1299 rakud külvati 24-kannulistesse plaatidesse ja kasvatati 48 tundi. Immunoflorestentsmikroskoopia jaoks külvati rakud 24-kannulise plaadi põhja asetatud 12 mm läbimõõduga klaasidele (Paul Marienfeld GmbH ja Co. KG, Saksamaa) arvestusega 4000 – 4500 HEC-1A või H1299 rakku kannu kohta. RL95-2 rakud külvati arvestusega 7000 – 7500 rakku kannu kohta. Kahe päeva möödumisel pesti rakke steriilse 1×PBS-ga. Seejärel kanti sihtmärkrakkudele uus sööde, millesse lisati FM 1-43 värviga märgistatud mikrovesiikulid või eksosoomid, mille kontsentratsiooniks söötmes arvestati 100 ug/ml. Rakke inkubeeriti mikrovesiikuleid või eksosoomide sisaldavas keskkonnas 1, 2 ja 4 tundi 37°C juures. Tuumad toodi nähtavale inkubeerides rakke Hoechst värvi lahuses (lahjendus 1:1000) 30 min jooksul 37°C juures. Peale inkubeerimist eemaldati sööde ning rakke pesti steriilse 1×PBS-ga. Rakkude plasmamembraani märgistamiseks kasutati PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Mini Kit for General Cell Membrane Labeling (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, USA) komplekti. Kõigepealt pesti rakke 2 korda steriilse 1×PBS-ga ja lisati neile PKH26 värvile mõeldud C lahusti (Diluent C). Värvilahuse valmistamiseks lahjendati PKH26 värv C lahustis (1:500) ja segati korralikult. Seejärel lisati värvilahus rakkudel olevale C lahustile (suhe 1:1) ja inkubeeriti 2 min pimedas toatemperatuuril. Värvumise peatamiseks lisati rakkudele sama maht 1% BSA-d. Liigse värvi eemaldamiseks pesti rakke 4 – 5 korda seerumit sisaldava söötmega, sest seerumi valgud ja lipiidid seovad tugevalt värvi. Lõpuks valmistati mikroskopeerimiseks vajalikud preparaadid, kusjuures ei kasutatud sulundussegu, vaid steriilset 1×PBS-i ning analüüsiti kohe konfokaalmikroskoobiga Olympus FluoView TM FV1000. Saadud kujutiste töötlemiseks kasutati arvutiprogrammi Imaris (Bitplane, Šveits).

Läbivoolutsütöfluorimeetra jaoks külvati HEC-1A ja H1299 rakud 24-kannulisesse plaadisse arvestusega 7000 – 7500 rakku kannu kohta. RL95-2 rakud külvati arvestusega 10000 – 12000 rakku kannu kohta. Peale mikrovesiikulite või eksosoomidega inkubeerimist eemaldati sööde ning pesti rakke steriilse 1×PBS-ga. Selleks et kõrvaldada rakkude külge kleepunud mikrovesiikuleid ja eksosoomide ei eemaldatud rakke plastikult mitte EDTA, vaid trüpsiini abil

(Feng et al., 2010). Trüpsiini toime inhibeeriti seerumit sisaldava söötmega, mida võeti trüpsiini lahusega võrdses mahus. Seejärel sadestati rakud 350×g ja 4°C juures 5 min jooksul, aspireeriti supernatant ja rakkude sade lahustati 1×PBS-is.

2.2.4.4. Retsipientrakkude töötlemine endotsütoosi inhibiitoritega.

Selleks, et tuvastada, millise endotsütoosi mehhanismi abil meie poolt kasutatud rakud mikrovesiikuleid sisse võtavad, kasutati erinevate endotsütoosi radade inhibiitoreid.

Läbivoolutsütofluorimeetra jaoks külvati HEC-1A ja H1299 rakud 24-kannulisesse plaadisse arvestusega 7000 – 7500 rakku kannu kohta. RL95-2 rakud külvati arvestusega 10000 – 12000 rakku kannu kohta. Kahe päeva pärast pesti rakke steriilse 1×PBS-ga ning viidi uude söötmesse, kuhu olid eelnevalt lisatud vastavad endotsütoosi inhibiitorid ja inkubeeriti 30 min. Pool tundi hiljem lisati rakkudele mikrovesiikulid ning inkubeeriti 4 tundi. Peale inkubeerimist pesti rakke steriilse 1×PBS-ga ning eemaldati plastikult trüpsiiniga. Seejärel sadestati rakud 350×g ja 4°C juures 5 min jooksul, aspireeriti supernatant ning rakkude sade lahustati 1×PBS-is.

2.3. Tulemused

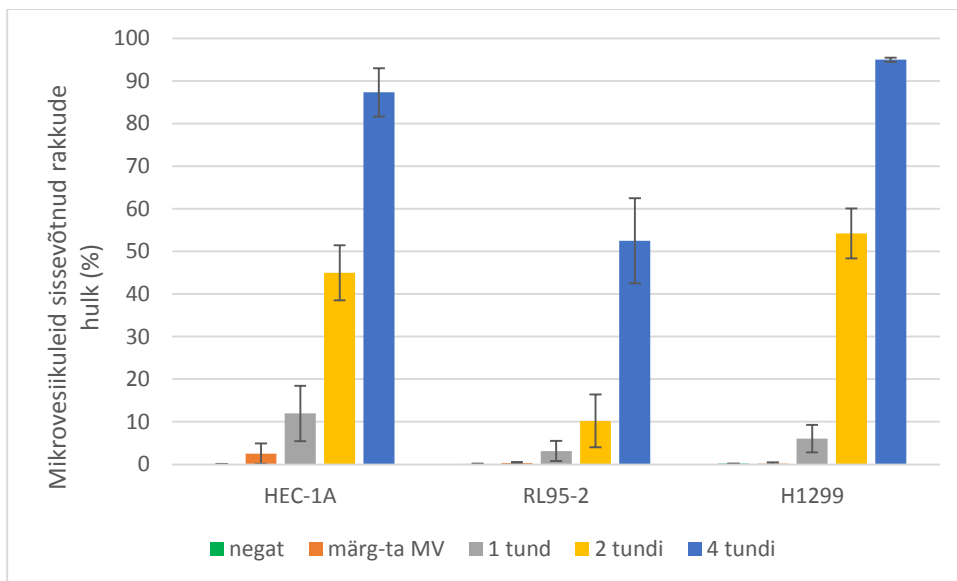
2.3.1. Trofoblasti rakuliini HTR-8/SVneo mikrovesiikulite ja eksosoomide sissevõtmine endomeetriumi rakuliinide RL95-2 ja HEC-1A rakkude poolt.

Selle töö eesmärgiks oli teada saada, kas inimese endomeetriumi rakud võtavad sisse trofoblasti rakkudest pärit mikrovesiikuleid ja eksosoomide. Me kasutasime inimese trofoblastide rakuliini HTR-8/SVneo kasvukeskkonnast eraldatud vesiikuleid. Endomeetriumi rakkude mudelina kasutasime rakuliine RL95-2 ja HEC-1A. Selleks, et kindlaks teha, kas trofoblastide rakkudest pärit vesiikulid sisenevad ainult endomeetriumi rakkudesse või neid võetakse sisse ka teist tüüpi rakkudesse, uurisime vesiikulite sisenemist kopsukartsinoomi rakuliini H1299 rakkudesse. Meid huvitas veel küsimus, kas trofoblasti rakuliini rakkudest pärit vesiikulite sissevõtmise intensiivsus on retseptoorse (RL95-2 rakuliin) ja mitteretseptoorse (HEC-1A rakuliin) endomeetriumi rakkude puhul sama või erinev. Trofoblastidest pärit vesiikulid märgistati fluorestseeruva värviga FM 1-43. RL95-2 ja HEC-1A rakuliinide rakke inkubeeriti märgistatud mikrovesiikulitega erinevate ajavahemike jooksul. Vesikulite sisenemist endomeetriumi rakkudesse hinnati läbivoolu tsütofluorimeetri abil ning analüüsiti ka kasutades konfokaalmikroskoopiat.

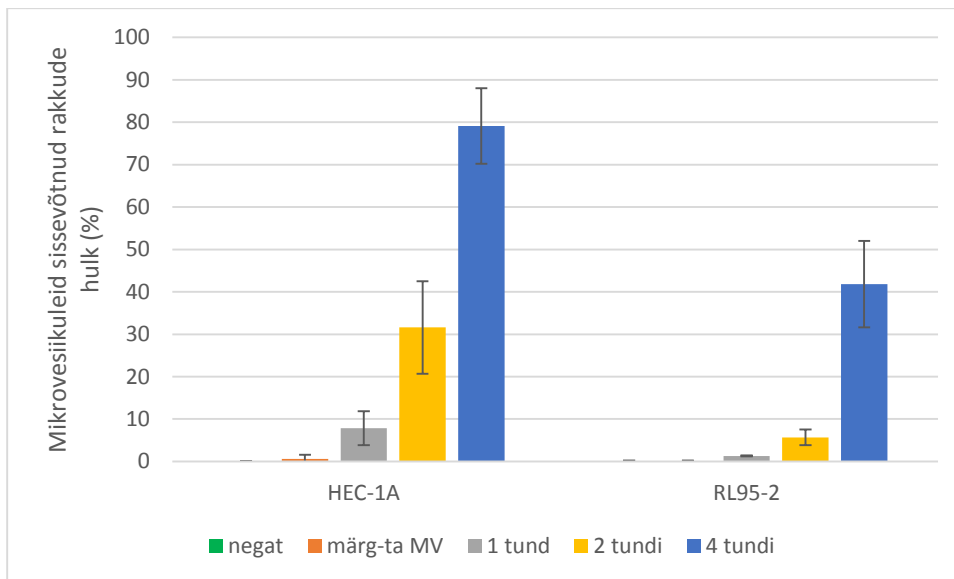
2.3.1.1. HTR-8/SVneo rakkudest pärit mikrovesiikulite sissevõtmine endomeetriumi rakuliinide RL95-2 ja HEC-1A ning kopsukartsinoomi rakuliini H1299 rakkude poolt.

RL95-2, HEC-1A ja H1299 rakke inkubeeriti märgistatud mikrovesiikulitega 1, 2 ja 4 tunni jooksul. Tulemused näitavad, et mikrovesiikulite sisenemine nii endomeetriumi kui ka kopsukartsinoomi rakkudesse oli seda suurem, mida pikem oli inkubatsiooniaeg (Joonis 2). Selgus, et 4 tunni jooksul olid mikrovesiikulid sisenenud 87% mitteretseptoorse endomeetriumi HEC-1A rakkudest, samal ajal kui retseptoorse endomeetriumi rakuliini RL95-2 rakkudest ainult 53% sisaldasid mikrovesiikuleid. Seega sisenes mitteretseptoorse endomeetriumi rakkudesse 1,6 korda rohkem mikrovesiikuleid kui retseptoorsetesse rakkudesse. Kõige enam sisenes mikrovesiikuleid kopsukartsinoomi rakuliini H1299 rakkudesse, sest 4 tunni pärast oli positiivsete rakkude protsent 95.

Me püüdsime selgitada kas trofoblastidest pärit mikrovesiikulite sisenemine endomeetriumi RL95-2 ja HEC-1A rakkudesse võiks olla spetsiifiline protsess, kuivõrd embrüo implanteerumise käigus puutuvad need rakud tihedalt kokku. Me inkubeerisime kõnealuseid endomeetriumi rakuliine H1299 rakkudest pärit märgistatud mikrovesiikulitega (Joonis 3). Ilmnes, et H1299 rakkudest eraldunud mikrovesiikuleid võtsid sisse 79% HEC-1A ja 41% RL95-2 rakkudest. Kui võrrelda omavahel trofoblasti (Joonis 2) ja kopsukartsinoomi (Joonis 2) mikrovesiikuleid sissevõtnud endomeetriumi rakkude hulka, siis võib näha, et trofoblastide mikrovesiikulite sissevõtmine on 10% efektiivsem.



Joonis 2. HTR-8/SVneo rakkudest pärit mikrovesiikulite sissevõtmine endomeetriumi rakuliinide RL95-2 ja HEC-1A ning kopsukartsinoomi rakuliini H1299 rakkude poolt. Mikrovesiikulid märgistati lipiidide värviga FM 1-43 ning analüüs teostati läbivoolu tsütofluorimeetri abil. Y-teljel on mikrovesiikuleid sissevõtnud rakkude hulk protsentides kogu populatsioonist. Roheline: rakud, mida mikrovesiikulitega ei mõjutatud; punane: rakud, mida inkubeeriti märgistamata mikrovesiikulitega 4 tunni jooksul; hall, kollane ja sinine: rakud, mida inkubeeriti märgistatud mikrovesiikulitega vastavalt 1, 2 ja 4 tunni jooksul. Katse on tehtud kolmes korduses.



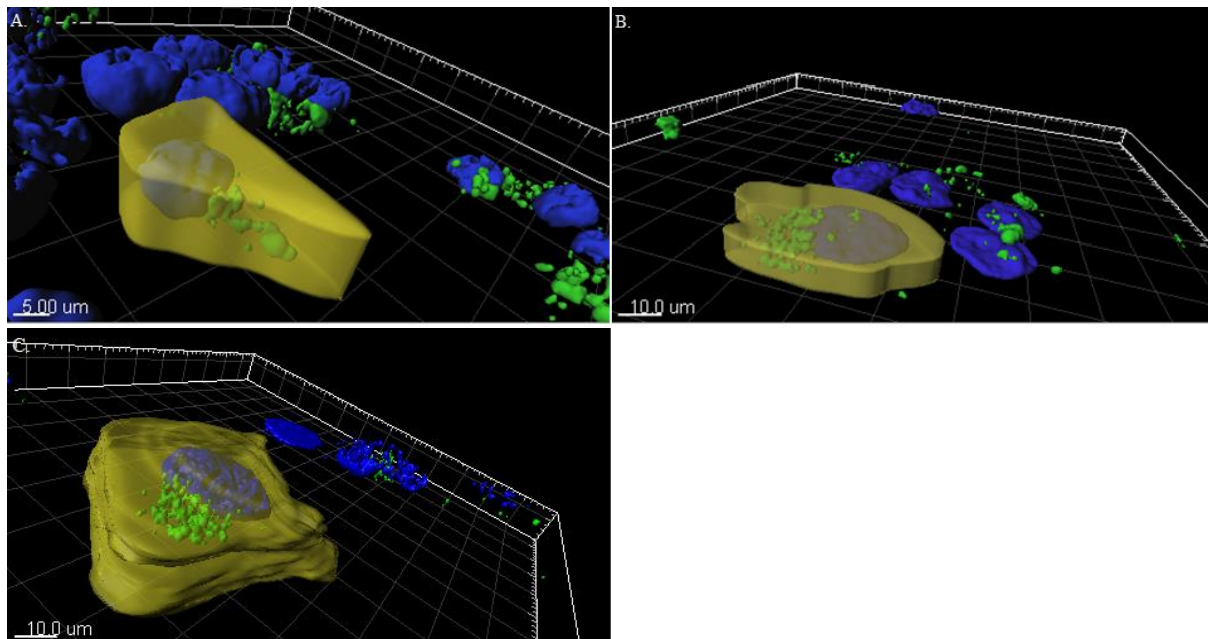
Joonis 3. H1299 rakkudest pärit mikrovesiikulite sissevõtmine endomeetriumi rakuliinide RL95-2 ja HEC-1A rakkude poolt. Mikrovesiikulid märgistati lipiidide värviga FM 1-43 ning analüüs teostati läbivoolu tsütofluorimeetri abil. Y-teljel on mikrovesiikuleid sissevõtnud rakkude hulk protsentides kogu populatsioonist. Roheline: rakud, mida mikrovesiikulitega ei mõjutatud; punane: rakud, mida inkubeeriti märgistamata mikrovesiikulitega 4 tunni jooksul; hall, kollane ja sinine: rakud, mida inkubeeriti märgistatud mikrovesiikulitega vastavalt 1, 2 ja 4 tunni jooksul. Katse on tehtud kolmes korduses.

2.3.1.2. Trofoblasti rakkudest pärit mikrovesiikulite endomeetriumi rakuliinide RL95-2 ja HEC-1A ning kopsukartsinoomi rakuliini H1299 rakkudesse sissevõtmise tuvastamine immunofluorestsents mikroskoopia abil.

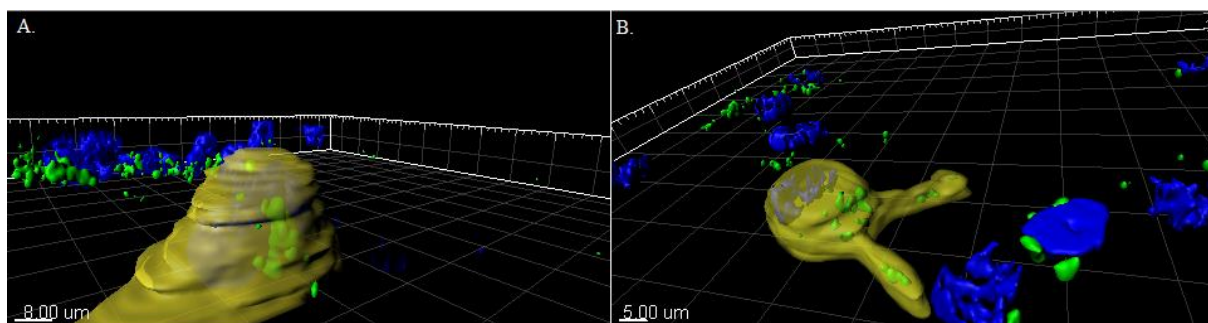
Trofoblasti rakuliinide rakkudest pärit mikrovesiikulite sissevõtmist endomeetriumi rakkudesse uuriti konfokaalmikroskoopia abil, millega saadud 3D kujutiste põhjal hinnati märgistatud mikrovesiikulite asukohta rakutuuma ja plasmamembraani suhtes. Rakkude plasmamembraan ja mikrovesiikulite membraan märgistati erineva fluorestsentspektriga lipiidvärvidega. Analüüs näitas, et rakkude sisse liigub terviklik mikrovesiikul, mitte ei toimu vesiikuli membraani ja raku plasmamembraani ühinemist. Joonisel 4, A, B ja C on näha, et roheliselt märkunud mikrovesiikulid on koondunud nii endomeetriumi kui ka kopsukartsinoomi rakkude plasmamembraani väljasopistuste ehk lamellopoodide sisse ega ole plasmamembraani osa.

Joonis 5 näitab, et H1299 rakkudest pärit mikrovesiikulid ka sisenevad endomeetriumi rakkudesse. Sarnaselt trofoblasti mikrovesiikulite sisenemisega kopsukartsinoomi

mikrovesiikulid on koondunud lamellopoodide sisse. Kuigi piisavalt mikrovesiikuleid paikneb ka tuuma juures.



Joonis 4. Trofoblasti rakuliini HTR-8/SVneo rakkudest pärit mikrovesiikulite sisenemine endomeetriumi rakuliinide RL95-2 ja HEC-1A rakkudesse ja kopsukartsinoomi rakuliini H1299 rakkudesse. Endomeetriumi ja kopsukartsinoomi rakuliinide rakke inkubeeriti lipiidide värvi FM 1-43 märgistatud mikrovesiikulitega 4 tunni jooksul. **A** – RL95-2 rakuliin; **B** – HEC-1A rakuliin; **C** – H1299 rakuliin. Kujutised on saadud konfokaalmikroskoobi abil ning töödeldud programmiga Imaris. Kollane tähistab raku piirjooni, sinine (Hoechst värving) raku tuumasid ning roheline mikrovesiikuleid.

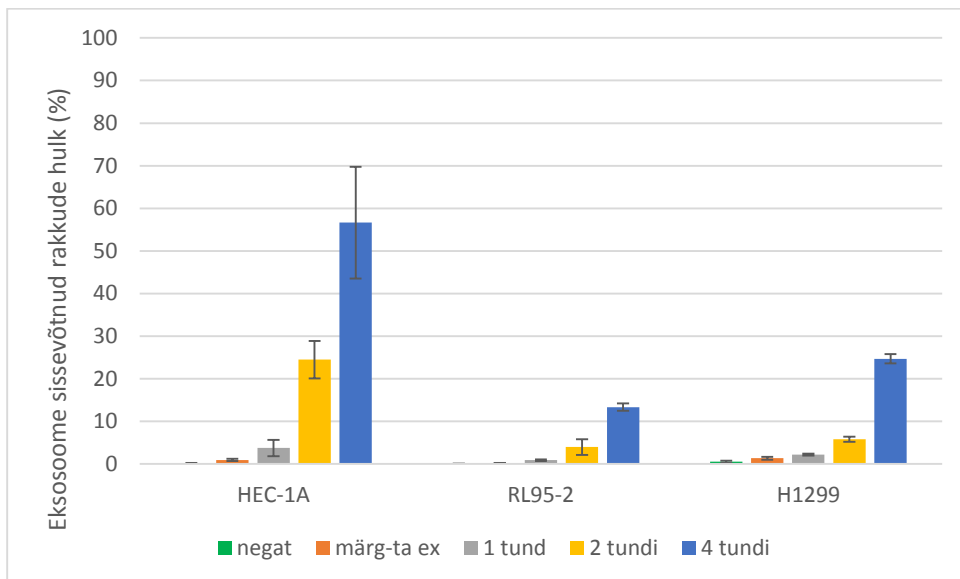


Joonis 5. H1299 rakkudest pärit mikrovesiikulite sissevõtmine endomeetriumi rakuliinide RL95-2 ja HEC-1A rakkude poolt. Endomeetriumi rakuliinide rakke inkubeeriti lipiidide värvi FM 1-43 märgistatud mikrovesiikulitega 4 tunni jooksul. **A** – HEC-1A rakuliin; **B** –

RL95-2 rakuliin. Kujutised on saadud konfokaalmikroskoobi abil ning töödeldud programmiga Imaris. Kollane tähistab raku piirjooni, sinine (Hoechst värving) raku tuumasid ning roheline mikrovesiikuleid.

2.3.1.3. HTR-8/SVneo rakkudest pärit eksosoomide sissevõtmine endomeetriumi rakuliinide RL95-2 ja HEC-1A ning kopsukartsinoomi rakuliini H1299 rakkude poolt.

Endomeetriumi rakuliinide rakke inkubeeriti märgistatud eksosoomidega samade ajavahemike jooksul nagu mikrovesiikulite puhul. Jooniselt 6 on näha, et kõige rohkem eksosoomide siseneb rakkudesse 4 tunni jooksul. Peale selle võib öelda, et kui mitteretseptoorse endomeetriumi rakuliini HEC-1A rakkudest 56% on eksosoomide sisse võtnud, siis retseptoorse endomeetriumi rakuliini RL95-2 rakkudest on neid ainult 13%. Seega võib öelda, et mitteretseptoorne endomeetrium võtab 4,3 korda efektiivsemalt eksosoomide sisse kui retseptoorne. Selleks, et hinnata kuivõrd spetsiifiline on trofoblastide eksosoomide sisenemine endomeetriumi rakkudesse võrdlesime seda nende sisenemisega kopsukartsinoomi rakuliini H1299 rakkudesse. Selgus, et 4 tunni jooksul sisenevad trofoblasti eksosoomid 24% H1299 kopsukartsinoomi rakkudesse.



Joonis 6. HTR-8/SVneo rakkudest pärit eksosoomide sissevõtmine endomeetriumi rakuliinide RL95-2 ja HEC-1A ning kopsukartsinoomi rakuliini H1299 rakkude poolt.

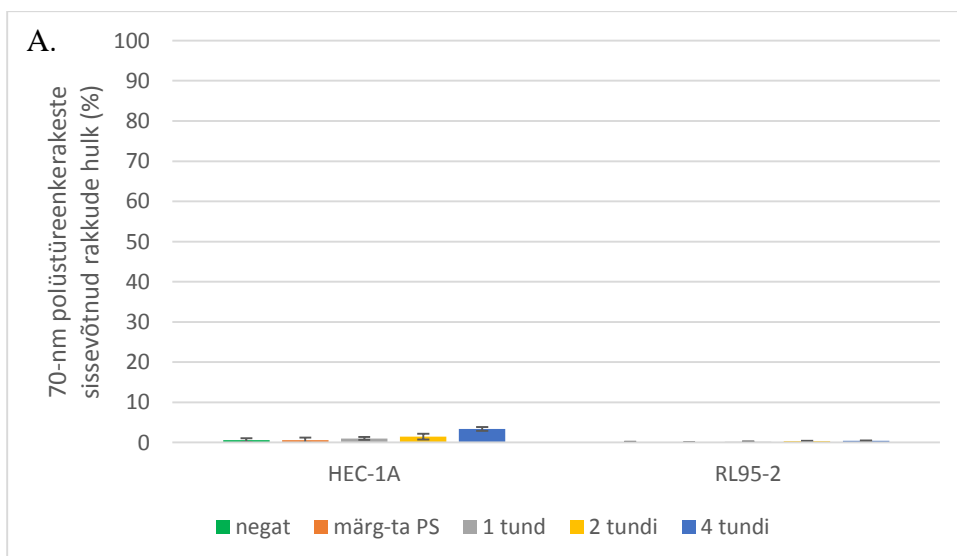
Eksosoomid märgistati lipiidide värviga FM 1-43 ning analüüs teostati läbivoolu tsütofluorimeetri abil. Y-teljel on märgitud eksosoomide sissevõtnud rakkude hulk protsentides

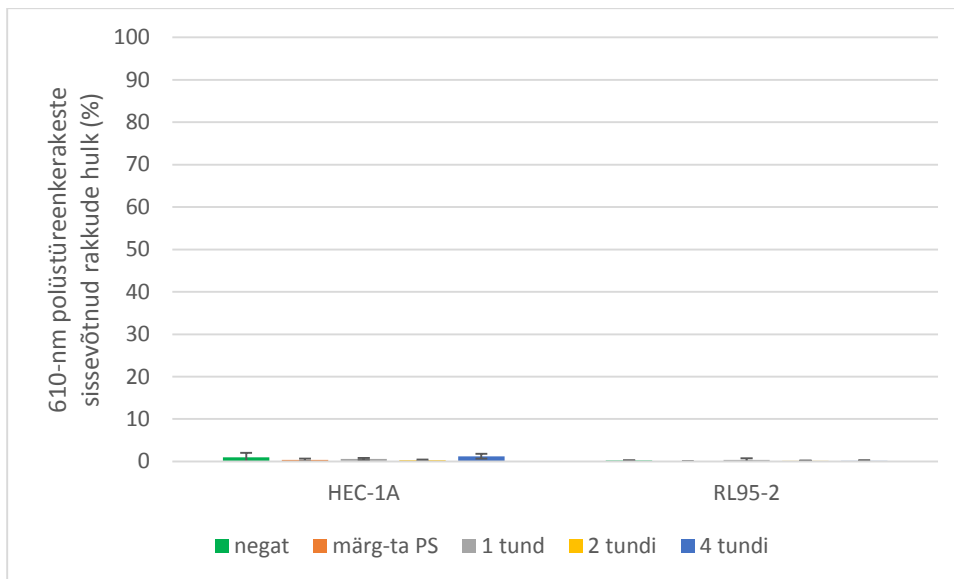
kogu populatsioonist. Roheline: rakud, mida eksosoomidega ei mõjutatud; punane: rakud, mida inkubeeriti märgistamata eksosoomidega 4 tunni jooksul; hall, kollane ja sinine: rakud, mida inkubeeriti märgistatud eksosoomidega vastavalt 1, 2 ja 4 tunni jooksul. Katse on tehtud kolmes korduses.

2.3.2. Fluorestseeruvat märgist kandva antihega seotud polüstüreenkerakeste sissevõtmine endomeetriumi rakuliinide RL95-2 ja HEC-1A rakkude poolt.

Selleks, et leida kas meie poolt kasutatud endomeetriumi rakuliinid võiksid rakuväliseid osakesi võtta sisse fagotsütoosi teel inkubeeriti RL95-2 ja HEC-1A rakke Alexa Fluor-488 märgisega antikehaga märgistatud polüstüreenkerakestega (Desjardins ja Griffiths, 2003; Feng et al., 2010; Seyrantepe et al., 2010). Rakke inkubeeriti polüstüreenkerakestega (20 µg/ml) (Feng et al., 2010) 1, 2 ja 4 tunni jooksul. Uurimaks, kas polüstüreenkerakeste suurus mõjutab nende rakkudesse sisenemise efektiivsust, kasutati kaheksa diameetriga kerakesi – 0,07-µm ja 0,61-µm. Polüstüreenkerakeste sisenemist endomeetriumi rakkudesse hinnati läbivoolu tsütofluorimeetri abil ning tuvastati ka kasutades konfokaalmikroskoopiat.

Katsetest selgus, et ainult 4% HEC-1A rakkudest võtsid 4 tunni jooksul sisse 0,07-µm ja 2% rakkudest 0,61-µm polüstüreenkerakesi (Joonis 7). RL95-2 rakuliini rakkudesse sisenes aga alla 1% mõlemat tüüpi polüstüreenkerakesi. Seega võtavad endomeetriumi rakud palju efektiivsemalt sisse eksosoomi ja mikrovesiikuleid kui polüstüreenkerakesi.

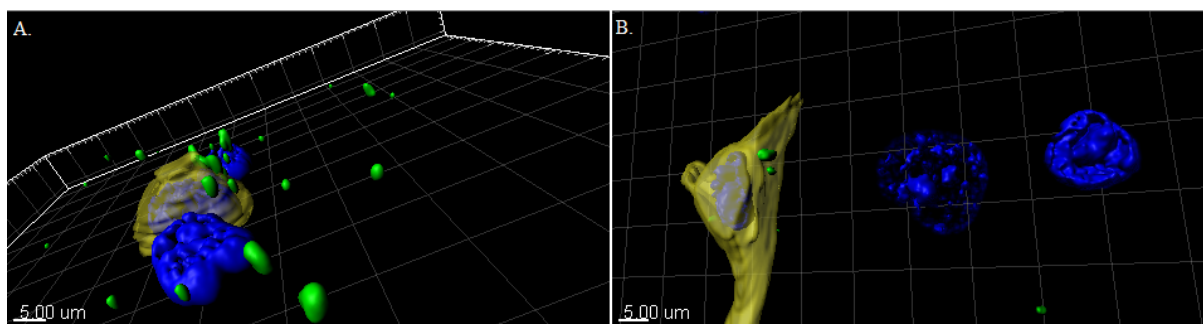




Joonis 7. Fluorestseeruvat määrgist kandva antikehaga seotud 0,61- μ m ja 0,07- μ m polüstüreenkerakeste sissevõtmine endomeetriumi rakuliinide RL95-2 ja HEC-1A rakkude poolt. Analüüs teostati läbivoolu tsütöfluorimeetri abil. Y-teljel on määrgitud polüstüreenkerakesi sissevõtnud rakkude hulk protsentides kogu populatsioonist. **A** – 0,07- μ m polüstüreenkerakesed; **B** – 0,61- μ m polüstüreenkerakesed. Roheline: rakud, mida polüstüreenkerakestega ei mõjutatud; punane: rakud, mida inkubeeriti määrgistamata polüstüreenkerakestega 4 tunni jooksul; hall, kollane ja sinine: rakud, mida inkubeeriti määrgistatud polüstüreenkerakestega vastavalt 1, 2 ja 4 tunni jooksul. Katse on tehtud kolmes korduses.

2.3.2.1. Fluorestseeruvat määrgist kandva antikehaga seotud polüstüreenkerakeste sissevõtmine endomeetriumi rakuliinide RL95-2 ja HEC-1A rakkude poolt.

Polüstüreenkerakeste sisenemist endomeetriumi rakkudesse uuriti konfokaalmikroskoopia abil, millega saadud 3D kujutiste põhjal määrati kerakeste asukoht rakutuuma ja plasmamembraani suhtes. Rakkude plasmamembraan määrgistati PKH26 värviga, mis fluorestseerub punases spektris. Polüstüreenkerakeste külge kinnitunud antikeha on seotud fluorokroomiga Alexa Fluor-488, mis kiirgab rohelises spektris. Tänu kiirgusspektrite erinevusele oli võimalik määrata kerakeste täpne asukoht raku plasmamembraani suhtes. Jooniselt 8 on näha, et polüstüreenkerakesed ehk rohelised määrgised paiknevad plasmamembraani välispinnal, mis lubab arvata, et kerakesed ei ole rakkudesse sisenenud.



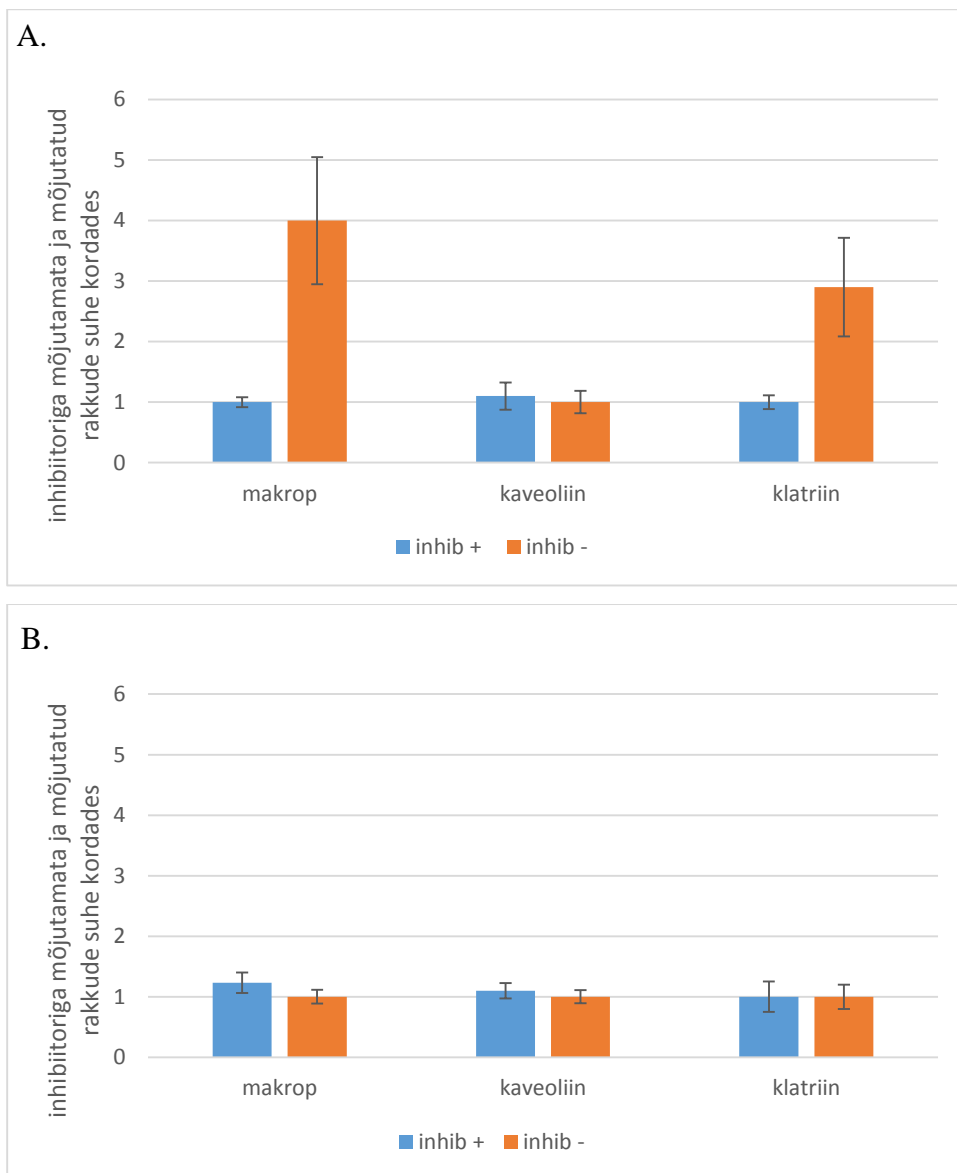
Joonis 8. Fluorestseeruvat märgist kandva antikehaga seotud polüstüreenkerakeste sisenemine endomeetriumi rakuliinide RL95-2 ja HEC-1A rakkudesse. Rakke inkubeeriti polüstüreenkerakestega 4 tunni jooksul: A – rakuliin HEC-1A; B – rakuliin RL95-2; Kujutised on saadud konfokaalmikroskoobi abil ning töödeldud programmiga Imaris. Kollane tähistab raku piirjooni, sinine (Hoechst värving) raku tuumasid ning roheline polüstüreenkerakesi.

2.3.3. Trofoblasti rakuliini HTR-8/SVneo mikrovesiikulite sissevõtmine endotsütoosi inhibiitoritega mõjutatud endomeetriumi rakuliinide RL95-2 ja HEC-1A rakkudesse.

Me uurisime täiendavalt, millise endotsütoosi mehhanismi kaudu võiksid trofoblasti rakkudest pärit mikrovesiikulid siseneda endomeetriumi rakuliinide HEC-1A ja RL95-2 rakkudesse. Rakke inkubeeriti mikrovesiikulitega, mis olid märgistatud FM 1-43 värviga, 4 tunni jooksul kolme erineva endotsütoosi inhibiitori (EIPA, kloorpromasiin ja nistatiin) juuresolekul. Katses kasutati nende inhibiitorite varem väljatöötatud optimaalseid kontsentratsioone (Cam et al., 2013; Di Guglielmo et al., 2003; Hussain et al., 2011).

Saadud tulemused (Joonis 9, A) näitasid, et mikrovesiikulite sisenemine HEC-1A rakkudesse vähenes makropinotsütoosi inhibeerimisel 4 korda ja klatriin-vahendatud endotsütoosi inhibeerimisel 3 korda. Kui aga samadele rakkudele toimiti kaveoliin-vahendatud endotsütoosi inhibiitoriga, siis mikrovesiikulite rakkudesse sisenemise tase ei muutunud kui võrrelda seda inhibiitoritega mõjutamata kontrollrakkudega.

Rakuliini RL95-2 puhul võime väita, et kasutatud inhibiitorid ei mõjuta mikrovesiikulite sisenemist üldse või on nende toime minimaalne (Joonisel 9, B). Siinkohal võib märkida, et makropinotsütoosi inhibiitoriga mõjutatud RL95-2 rakud võtavad veidi rohkem mikrovesiikuleid sisse kui mõjutamata rakud.



Joonis 9. Trofoblasti rakuliini HTR-8/SVneo mikrovesiikulite sissevõtmine endotsütoosi radade inhibiitoritega mõjutatud endomeetriumi rakuliinide RL95-2 ja HEC-1A rakkudesse. Makropinotsütoos ning kaveoliin- ja klatriin-vahendatud endotsütoos inhibeeriti vastavalt EIPA, nistatiini ja kloorpromasiiniga. A – rakuliin HEC-1A; B – rakuliin RL95-2; sinine – inhibiitoritega mõjutatud rakud; punane – mõjutamata rakud. Katse on tehtud kolmes korduses.

2.4. Arutelu

Trofoblastide poolt sekreteeritavad mikrovesiikulid ja eksosoomid seostuvad immuunsüsteemi ja endoteeli rakkudega põhjustades rasedusega kaasnevaid põletikulisi protsesse (Holder et al., 2012; Redman ja Sargent, 2007). Lisaks sellele on näidatud, et trofoblastid võtavad sisse endomeetriumi rakkudest pärit eksosoomi, mille tagajärjel suureneb adhesioonivõime (Greening et al., 2016). On leitud ka, et blastotsüsti poolt sekreteeritavad miRNA-sid sisaldavad eksosoomid sisenevad endomeetriumi ja trofoblasti rakkudesse, kus nad muudavad geenide ekspressiooni taset ning soodustavad implantatsiooni (Cuman et al., 2015). Siiani on vähe teada trofoblastidest pärit mikrovesiikulite ja eksosoomide seostumisest, sisenemisest ja toimest endomeetriumi rakkudele. Sellest lähtuvalt oli käesoleva töö eesmärgiks uurida, kas endomeetriumi rakuliinide HEC-1A ja RL95-2 rakud võtavad sisse HTR-8/SVneo rakuliini trofoblastidest pärit mikrovesiikuleid ja eksosoomi. Me valisime katseteks HEC-1A ja RL95-2 rakuliinide rakud, mis on paljude näitajate suhtes vastavalt kas mitteretseptiivsete või retseptiivsete omadustega, sest meid huvitas kas trofoblastidest pärit vesikulite sisenemine endomeetriumi rakkudesse võib olla seotud endomeetriimirakkude retseptiivsusega. Üheks retseptiivsuse näitajaks on trofoblastide rakuliini JAR rakkude poolt tekitatud sferoidide kinnitumine endomeetriumi rakkude pinnale. Katsed on näidanud, et JAR sferoidid seostuvad RL95-2 rakkude pinnale efektiivsemalt kui HEC-1A rakkudele (John et al., 1993). Vesikulite allikana kasutasime esimese trimestri trofoblastide rakuliini HTR-8/SVneo rakke, mis sekreteerivad nii mikrovesiikuleid kui ka eksosoomi. HTR-8/SVneo rakud ei ole mitte süntsütiotrofoblastid nagu JAR rakud (Jarvis et al., 1998), vaid varase arengujärgu hattudevälised trofoblastid (Correia-Branco et al., 2015; Weber et al., 2013).

Meie katsete tulemused näitasid, et mitteretseptoorse endomeetriumi rakud võtavad HTR-8/SVneo rakkudest pärit mikrovesiikuleid ja eksosoomi sisse efektiivsemalt kui retseptoorne endomeetriumi. See tulemus oli meie jaoks mõnevõrra üllatav, sest me eeldasime, et retseptiivsete endomeetriimirakkude suurem adhesiivsus trofoblastide rakkude suhtes võiks tähendada ka suuremat vastuvõtlikkust vesikulite suhtes. On teada, et HEC-1A ja RL95-2 rakkude pinnaretseptorite muster on erinev, mis kajastub ka JAR sferoidide adhesiooni efektiivsuses nende rakkude suhtes (Harduf et al., 2007; Harduf et al., 2009). Implanteerumise eelsel perioodil on endomeetriumi epiteelirakkude pinnal väga tugevalt ekspresseerunud glükosüleeritud valk Muc-1, mis hoiab ära embrüo enneaegse kinnitumise (Redzovic et al., 2013). Meie varasemad katsed näitasid (Gerly Pöder, magistritöö 2015), et Muc-1 valgu

ekspressioon on HEC-1A rakkudel kõrgem kui RL95-2 rakkudel, mis on vastavuses JAR rakkude sferoidide kinnitumise katsete tulemustega, mis kinnitab MUC-1 osalust endomeetriumi rakkude retseptiivsuses. HTR-8/SVneo rakkudest pärit vesiikulite sisenemine HEC-1A ja RL95-2 rakkudesse on täpselt vastupidise tendentsiga, s.o. rakkudesse, mille pinnal on rohkem MUC-1 valku siseneb ka enam vesiikuleid. Need tulemused viitavad sellele, et trofoblasti rakkudest koosnevate sferoidide ja neist pärit vesiikulite kinnitumine endomeetriumi rakkudele on väga erinevad protsessid. Siinkohal on oluline märkida, et MUC-1 valk ekspresseerub ka trofoblastidel. Kuivõrd selles töös me ei uurinud MUC-1 ega ka tema võimalike ligandide ekspressiooni HTR-8/SVneo rakkudest pärit vesiikulitel, siis ei saa me teha järeldusi MUC-1 võimalikust osalusest vesiikulite kinnitumises. Veel enam, me hindasime vesiikulite rakkudesse sisenemist, kuid mitte nende rakkudele kinnitumise efektiivsust. Arusaadavalt võib lõpptulemus, s.o. vesiikuleid sissevõtnud rakkude hulk sõltuda nii vesiikulite märklaudrakkudele kinnitumise kui ka sissevõtmise efektiivsusest. Seega seisab veel ees mahukas töö, et selgitada, milliste retseptor-ligandide kombinatsiooni kaudu toimub trofoblastidest pärit vesiikulite kinnitumine endomeetriumi rakkudele.

Selleks et kindlaks teha, kas trofoblastidest pärit vesiikulite sisenemine on omane ainult endomeetriumi rakkudele (RL95-2 ja HEC-1A), uurisime me HTR-8/SVneo rakkudest pärit mikrovesiikulite ja eksosoomidega sisenemist kopsukartsinoomi rakuliini H1299 rakkudesse. Selgus, et trofoblastide mikrovesiikulid sisenevad H1299 rakkudesse isegi efektiivsemalt kui endomeetriumi rakkudesse, mis laseb eeldada, et ei ole tegemist väga spetsiifilise trofoblasti ja endomeetriumi rakkude vahelise protsessiga. Siinkohal tuleb muidugi pidada silmas, et endomeetriumi mudelina ei kasutatud mitte primaarseid rakke, vaid kartsinoomi rakuliine, mis on küll pärit endomeetriumist kuid siiski transformeerunud vähirakud. Lisaks sellele me inkubeerisime kasutatud endomeetriumi rakuliine ka H1299 rakkudest pärit mikrovesiikulitega. Tulemused näitasid, et nii RL95-2 kui ka HEC-1A rakud võtsid aktiivselt sisse kopsukartsinoomi mikrovesiikuleid. See näitab, et tulevastes katsetes tuleb väga põhjalikult valida, millise päritoluga vesiikuleid ja märklaudrakke kasutada. Kuivõrd tegemist on uue ja väga kiiresti areneva uurimisvaldkonnaga, siis hetkel puuduvad selged seisukohad kuivõrd mõttekas on kasutada kasvajakäritolu rakke vesiikulite sisenemise uurimiseks. Siiani pole võrreldud kuivõrd võivad samast koetüübist pärit normaalsed ja kasvajakäritolud erineda vesiikulite sekreteerimise ja sissevõtmise efektiivsuse poolest. Oma töö järgmises etapis saame me kasutada vesiikulite sihtmärgina normaalse endomeetriumi epiteeli ja strooma rakke kuid normaalsetest trofoblastidest pärit vesiikulite eraldamine on väga raskesti teostatav.

Me uurisime ka, millise mehhanismi kaudu võiksid trofoblastidest pärit vesiikulid jõuda endomeetriumi rakkude tsütosooli. Kõigepealt me uurisime rakkude võimet endotsüteerida latekskerakesi (Desjardins ja Griffiths, 2003; Feng et al., 2010). Tegelikult ei saa öelda, et latekskerakesed annaksid endotsütoosi tuvastamiseks universaalse võimaluse, kuna väga palju sõltub just kerakeste suurusest ja rakkude tüübist. Näiteks, osaliselt diferentseerunud hematopoeetilised tüvirakud ja dendriittrakud võtavad latekskerakesi sisse makropinotsütoosi teel (Falcone et al., 2006; Kolb-ma et al., 2002), aga küpsete makrofaagide puhul sisenevad latekskerakesed rakkudesse fagotsütoosi teel (Feng et al., 2010; Seyrantepe et al., 2010). On leitud, et diferentseerumise käigus toimuvad monotsüütide eellasrakkude muutused (neuraminidaasi aktiveerimine) annavad rakkudele fagotsütoosivõimet (Seyrantepe et al., 2010). Seega on võimalik, et makropinotsütoos asendatakse diferentseerumise käigus fagotsütoosiga. On näidatud, et latekskerakesi võtavad sisse mitte ainult fagotsüteerivad rakud. Näiteks hiire epiteeliaalse kartsinoomi rakuliini B12-F10 rakud võtavad 50 – 200 nm diameetriga fluorestseeruvaid latekskerakesi klatriin-vahendatud endotsütoosi teel, samal ajal kui suuremad osakesed sisenevad kaveoliin-vahendatud endotsütoosiga (Rejman et al., 2004). Tegelikult on klatriinivagude sügavus alla 100 nm (Kou et al., 2013; McMahon ja Boucrot, 2011). Seega ainuke viis, kuidas rakud võivad selliseid suuri osakesi sisse võtta, on vagude „kokkusulamine“ (Shin, 2000). Makropinotsütoos ise ei ole spetsiifiline protsess, kuigi selle aktiveerimiseks vajavad rakud stiimulit (Lim ja Gleeson, 2011). Peale stiimuli rakendamist moodustuvad rakkude pinnal kurrud, mille abil haaravad rakud rakkudevälise vedelikku koos selles sisalduva materjaliga (Swanson, 1989). Meie inkubeerisime endomeetriumi rakuliinide HEC-1A ja RL95-2 rakke latekskerakestega, mille diameeter oli 0,61 µm ja 0,07 µm. Võiks arvata, et söötmes hõljuvad kerakesed satuvad raku sisekeskkonda koos rakkudevälise vedelikuga. Meie tulemused näitasid, et vähem kui 4% mõlemat tüüpi kerakesi sisenes endomeetriumi rakkudesse. See lubab arvata, et trofoblastidest pärit vesiikulid ei sisene endomeetriumi rakkudesse mittespetsiifiliselt makropinotsütoosi teel, vaid tegemist on spetsiifilise retseptor-vahendatud endotsütoosiga, kus olulist osa mängib ilmselt ka endomeetriimirakkude aktiveerumine. Viimast oletust tuleb edasises töös põhjalikult kontrollida.

Käesoleva töö viimases etapis me uurime, millise endotsütoosi mehhanismiga võiksid HTR-8/SVneo rakkudest pärit mikrovesiikulid RL95-2 ja HEC-1A rakkudesse siseneda. Selleks me inhibeerisime makropinotsütoosi, klatriin- või kaveoliin-vahendatud endotsütoosi rajad

vastavate kemikaalidega. Selgus, et makropinotsütoosi inhibiitor EIPA vähendas mikrovesiikulite sisenemist HEC-1A rakkudesse 4 korda. Siinkohal tuleb märkida, et mikrovesiikulite diameeter on 200 – 1000 nm, aga makropinosoomi diameeter kuni 10 µm (Kou et al., 2013; Joel A Swanson, 2008). Võrreldes klatriini (Kou et al., 2013; McMahon ja Boucrot, 2011) ja kaveoliiniga kaetud lohkudega (Kou et al., 2013; Parton ja Simons, 2007; Peiró et al., 2000; Razani et al., 2002) on makropinosoomid suurema läbimõõduga, mistõttu oleksid nad kõige sobivamad üle 500 nm osakeste sissevõtmiseks. Mikrovesiikulid on väga heterogeensed, sest nende suurus varieerub 100 nm-st kuni 1 µm-ni. Seega ei saa välistada, et mikrovesiikulite sisenemine võib toimuda ka klatriin-vahendatud endotsütoosi teel (klatriiniga kaetud lohu diameeter on ~ 100 nm). Veel enam, retseptor-vahendatud endotsütoos toimub just nimelt klatriin-vahendatud endotsütoosi teel. Võimalusele, et trofoblastidest pärit vesiikulid jõuavad endomeetriimirakkudesse klatriin-vahendatud endotsütoosi teel viitab asjaolu, et kloorpromasiiniga mõjutatud endomeetriimirakud võtavad sisse 3 korda vähem mikrovesiikuleid kui mõjutamata rakud. Meie katsed näitasid, et kaveoliin-vahendatud endotsütoosi inhibiitor nistatiini ei mõjutanud trofoblastidest pärit mikrovesiikulite sisenemist endomeetriimirakkudesse. Võiks arvata, et mikrovesiikulite sisenemine endomeetriimirakkudesse ei toimu selle raja kaudu, kui võrd kaveoliini lohkude diameeter on liiga väike (50 – 100 nm) (Kou et al., 2013; Parton ja Simons, 2007; Peiró et al., 2000; Razani et al., 2002). RL95-2 rakke mõjutati samade inhibiitoritega kasutades samu kontsentratsioone. Selgus, et ükski kasutatud inhibiitoritest ei blokeerinud trofoblastide mikrovesiikulite sisenemist RL95-2 rakkudesse. Kuigi RL95-2 rakud võtsid trofoblastidest pärit mikrovesiikuleid vähem sisse kui HEC-1A rakud, ei selgita see endotsütoosi inhibiitorite toime puudumist nendele rakkudele. On teada, et apoptootilised rakud võtavad aktiivselt sisse rakuvälist materjali, mistõttu me küsisime, kas katses kasutatud inhibiitorid võiksid olla RL95-2 rakkudele toksilised ja põhjustada nende suremist. Selleks viisime läbi katse, kus märgistasime inhibiitoritega mõjutatud RL95-2 rakke Annexin-V-FITC ja DAPI-ga (Lisa 1). Selgus, et kasutatud inhibiitorid ei põhjusta RL95-2 rakkude surma ning trofoblastidest pärit olevate mikrovesiikulite sissevõtmise kõrge tase ei ole seotud inhibiitoritega mõjutatud rakkude apoptoosiga. Seega praegusel hetkel meil puudub vastus, miks endotsütoosi inhibiitorid on RL95-2 ja HEC-1A rakkude suhtes nii erineva toimega, sest me kasutasime varasemates töödes esitatud optimaalseid inhibiitorite kontsentratsioone.

Blastotsüsti ümbritsevate trofoblastide ja endomeetriumi epiteeli ning strooma rakkude vahel peab toimima täpselt kooskõlastatud ühendus selleks, et blastotsüst saaks emaka seinale

kinnituda ning toimuks edasine trofoblastide liikumine endomeetriumi koesse. Käesolevaks ajaks on teada, et rakkude poolt sekreteeritavad mikrovesiikulid ja eksosoomid kannavad lähterakkudest pärit molekule (valke, miRNA-sid, RNA-d) kaugemalasuivate sihtmärkrakkude juurde. Viimasel ajal on leitud, et vesiikulid sisenevad sihtmärkrakkudesse ning neist vabanevad molekulid kujundavad ümber rakkude geeniekspressiooni ning füsioloogia. Eriti tähtsat rolli mängivad eksosoomid. Näiteks, endomeetriumi kartsinoomi eksosoomid kannavad miRNA-sid (Vilella et al., 2015) ja rakuvälise maatriksi valke (laminiin, kollageen, perlekaan), mis muudavad embrüo rakkude transkriптоomi ning soodustavad blastotsüsti implanteerumist (Greening et al., 2016; Ng et al., 2013). Trofoblastidest pärit mikrovesiikulid ja eksosoomid seostuvad immunsüsteemi, endoteeli ja silelihasrakkudega, aktiveerides makrofaage, remodelleerides spiraalartereid ja soodustades silelihasrakkude migratsiooni (Redman ja Sargent, 2007; Salomon et al., 2014). Seega rakkude poolt sekreteeritavate vesiikulite näol on rakkudevahelisse suhtlusse lisandunud uus komponent. Sellest tulenevalt on väga oluline mõista rakkude poolt sekreteeritavate vesiikulite osa blastotsüsti implanteerumises, trofoblastide migreerumises ning platsenta väljakujunemises. Vesiikulite kaudu toimuv trofoblastide ja endomeetriumi rakkude suhtlus on väga keeruline protsess kuivõrd mõlemad rakutüübid sekreteerivad nii eksosoomide kui ka mikrovesiikuleid. Vesiikulite sisenemisest trofoblastide või endomeetriumi rakkudesse ja sellele järgnevatest protsessidest on seni veel vähe teada. Hiljuti avaldati põhjalik uurimus endomeetriumi rakkudest pärit eksosoomide sisenemisest trofoblastidesse ning sellega kaasnevatest muutustest trofoblasti rakkude füsioloogias. Meie töö eesmärgiks oli uurida kas trofoblastidest pärit eksosoomid ja mikrovesiikulid sisenevad endomeetriumi rakkudesse. Kuivõrd saadud tulemused näitavad, et see on nii, siis edasiste uuringute käigus oleks vaja tuvastada, milliseid endomeetriumi rakkudele omaseid protsesse trofoblastide vesiikulitega ülekantud komponendid mõjutavad.

KOKKUVÕTE

Käesoleva töö eesmärgiks oli leida, kas inimese endomeetriumi kasvajakarakud RL95-2 ja HEC-1A võtavad sisse inimese trofoblasti rakuliini HTR-8/SVneo rakkudest pärit mikrovesiikuleid ja eksosoomide. Lisaks sellele uuriti, kas trofoblasti mikrovesiikulite ja eksosoomide sissevõtmise tasemes on erinevusi retseptoorse (RL95-2 rakud) ja mitteretseptoorse (HEC-1A rakud) endomeetriumi rakkude vahel ning millise endotsütoosi mehhanismiga sisenevad trofoblasti mikrovesiikulid sihtmärkrakkudesse.

Saadud tulemused näitasid, et üle 50% rakuliinide RL95-2 ja HEC-1A rakkudest võtavad sisse HTR-8/SVneo rakkudest pärit mikrovesiikuleid ja eksosoomide. See näitab, et vähemalt kasvajakarakude tasemel sisenevad trofoblastidest pärit mikrovesiikulid ja eksosoomid endomeetriumi rakkudesse. On teada, et trofoblastide rakuliini JAR rakkudest tekkinud sferoidide adhesiivsus on retseptoorse endomeetriumi rakkude suhtes kõrgem kui mitteretseptoorsete suhtes. Meie katsetest selgus, et see ei kehti trofoblasti rakkude vesiikulite suhtes, sest mitteretseptiivsed HEC-1A rakud võtavad rohkem mikrovesiikuleid ja eksosoomide sisse kui retseptiivsed RL95-2 rakud. Lisaks me leidsime, et kasvajalist päritolu endomeetriumi rakud võtavad sisse kopsukartsinoomi rakuliini H1299 rakkudest pärit mikrovesiikuleid. Veel enam, kopsukartsinoomi rakuliini H1299 rakud võtavad sisse trofoblastidest pärit mikrovesiikuleid ja eksosoomide. Need tulemused viitavad sellele, et vesiikulite aktiivne sisenemine sihtmärkrakkudesse on omane kasvajakarakudele ning ei sõltu otseselt sellest, millist koelist päritolu rakkudega on tegemist. Kuidas toimub normaalsetest trofoblastidest pärit vesiikulite sisenemine normaalsetesse endomeetriumi rakkudesse on küsimus, mis väärrib uurimist edaspidi.

Me uurisime samuti, kas endomeetriumi rakud võiksid sisse võtta latekskerakesi. Selleks me kasutasime erineva suurusega kerakesi. Selgus, et HEC-1A ja RL95-2 rakud ei võta latekskerakesi sisse, mis tähendab, et vesiikulite sisenemine endomeetriumi rakkudesse toimub tõenäoliselt spetsiifilise retseptor-vahendatud endotsütoosi teel.

Lõpuks huvitas meid, millise endotsütoosi mehhanismi abil sisenevad trofoblasti mikrovesiikulid endomeetriumi rakkudesse. Selleks me mõjutasime RL95-2 ja HEC-1A rakke kolme erineva endotsütoosi raja inhibiitoriga. Me blokeerisime makropinotsütoosi ning klatriin- ja kaveoliin-vahendatud endotsütoosi. Selgus, et makropinotsütoosi inhibiitoriga

mõjutatud HEC-1A rakkudesse siseneb 4 korda vähem mikrovesiikuleid kui mõjutamata rakkudesse. Kaveoliin-vahendatud raja inhibiitor nistatiin ei mõjutanud mikrovesiikulite raku sisenemist, kuid samas klatriin-vahendatud inhibiitori toime vähenes mikrovesiikulite sisenemine HEC-1A 3 korda. Seega võib arvata, et HEC-1A rakud võtavad mikrovesiikuleid sisse valdavalt makropinotsütoosi ja klatriin-vahendatud endotsütoosi teel ning kaveoliin-vahendatud endotsütoos selles ei osale. Me ei oska hetkel põhjendada, miks vesiikulite sissevõtmise protsess RL95-2 rakkudesse ei allunud ühegi inhibiitori toimele.

Kokkuvõtteks võib öelda, et endomeetriumi kartsinoomi rakuliinide rakud võtavad sisse trofoblastide rakuliinide rakkudest pärit mikrovesiikuleid ja eksosoomi. Kuid kuivõrd tegemist on kasvajaliste rakkudega, siis ei ole saadud tulemuste põhjal võimalik öelda kas see kehtib ka normaalsete rakkude puhul. Vaatamata sellele andis kasvajarakkude mudeli kasutamine hea metoodilise kogemuse järgnevalt normaalsete rakkude uurimiseks. Edasises töös tuleb siiski arvestada, et normaalsete trofoblastide ja endomeetriumi rakkude kasvatamine on väga keeruline ning siiani puuduvad andmed kuivõrd efektiivselt toimub nendest rakkudest vesiikulite sekreteerimine.

SUMMARY

The uptake of trophoblast cell line derived microvesicles and exosomes by endometrial cell line HEC-1A and RL95-2 cells.

The aim of current study was to find out whether endometrial cell lines RL95-2 and HEC-1A cells take up microvesicles and exosomes derived from trophoblast cell line HTR-8/SVneo cells. We also asked, whether there is difference between RL95-2 and HEC-1A cells in vesicle uptake effectiveness and what mechanism of endocytosis is used by trophoblast-derived microvesicles to enter target cells.

The results showed that more than 50% of RL95-2 and HEC-1A cells internalize HTR-8/SVneo derived microvesicles and exosomes. This finding demonstrates that at least on the level of cancer cells (RL95-2 and HEC-1A) the microvesicles and exosomes from trophoblasts are internalized to endometrial cells. It has been shown that adhesiveness of JAR cells spheroids to receptive endometrial RL95-2 cells is higher than to non-receptive endometrial HEC-1A cells. Our study showed that there was inverse tendency in trophoblast-derived vesicles uptake – HEC-1A cells took up more vesicles than RL95-2 cells. Moreover, we found that endometrial carcinoma cells were able to internalize microvesicles originated from lung carcinoma H1299 cells. In addition to this, H1299 cells took up HTR-8/SVneo derived microvesicles and exosomes. These results suggest that such an active vesicle uptake by different „targets“ is characteristic of cancer cells. So, the question that we have to answer is: how vesicles derived from normal trophoblast cells enter normal endometrial cells?

We studied also internalization of latex beads of different size by endometrial cells. For this purpose we used latex beads of 0.61 μ m and 0.07 μ m. Results showed that neither RL95-2 nor HEC-1A cells took up latex beads, what means that vesicles are internalized probably via receptor-mediated endocytosis.

At last we elucidated what endocytosis pathway HTR-8/SVneo-derived microvesicles use to enter endometrial cells. To study that RL95-2 and HEC-1A cells were incubated with macropinocytosis, clathrin- and caveolae-mediated endocytosis inhibitors. We found that HEC-1A cells, incubated with macropinocytosis inhibitor, took up 4 times less microvesicles than noninhibited cells. Nystatin (inhibits caveolae-mediated endocytosis) had no effect on HEC-1A

cells. After treatment with chlorpromazine, that inhibits clathrin-mediated endocytosis, 3 times less HEC-1A cells took up microvesicles compare to the control cells. These results suggest that microvesicles enter into HEC-1A cells basically via macropinocytosis and clathrin-mediated endocytosis. Caveolae-mediated endocytosis is probably not in use. We cannot explain why none of inhibitors affect RL95-2 cells' endocytosis.

In conclusion we can say that we have demonstrated that endometrial cells take up trophoblast-derived microvesicles and exosomes. But since we used carcinoma cell lines we cannot assert that the same tendency applies to normal cells. In further studies it is worth to take into account that cultivation of normal trophoblast and endometrial cells is very complicated and moreover, until now there is no data about the secretion of vesicles by these cells.

KASUTATUD KIRJANDUS

- al-Lamki, R. S., Skepper, J. N. and Burton, G. J. (1999). Are human placental bed giant cells merely aggregates of small mononuclear trophoblast cells? An ultrastructural and immunocytochemical study. *Human Reproduction* 14:496–504.
- Anderson, H. A., Chen, Y. and Norkin, L. C. (1996). Bound simian virus 40 translocates to caveolin-enriched membrane domains, and its entry is inhibited by drugs that selectively disrupt caveolae. *Molecular Biology of the Cell* 7:1825–1834.
- Anderson, R. G. (1998). The caveolae membrane system. *Annual Review of Biochemistry* 67:199–225.
- Anderson, R. G., Brown, M. S. and Goldstein, J. L. (1977). Role of the coated endocytic vesicle in the uptake of receptor-bound low density lipoprotein in human fibroblasts. *Cell* 10:351–364.
- Anderson, R. G., Kamen, B. A., Rothberg, K. G. and Lacey, S. W. (1992). Potocytosis: sequestration and transport of small molecules by caveolae. *Science* 255:410–411.
- Aplin, J. D. (1991). Implantation, trophoblast differentiation and haemochorial placentation: mechanistic evidence in vivo and in vitro. *Journal of Cell Science* 99:681–692.
- Balasubramanian, K., Mirnikjoo, B. and Schroit, A. J. (2007). Regulated externalization of phosphatidylserine at the cell surface: Implications for apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 282:18357–18364.
- Barry, O. P. and FitzGerald, G. A. (1999). Mechanisms of cellular activation by platelet microparticles. *Thrombosis and Haemostasis* 82:794-800.
- Bashkirov, P. V., Akimov, S. A., Evseev, A. I., Schmid, S. L., Zimmerberg, J. and Frolov, V. A. (2008). GTPase cycle of dynamin is coupled to membrane squeeze and release, leading to spontaneous fission. *Cell* 135:1276–1286.
- Bonnemaison, M. L., Eipper, B. A. and Mains, R. E. (2013). Role of adaptor proteins in secretory granule biogenesis and maturation. *Frontiers in Endocrinology* 4:101.
- Boucrot, E., Saffarian, S., Zhang, R. and Kirchhausen, T. (2010). Roles of AP-2 in clathrin-mediated endocytosis. *PLoS ONE* 5:e10597.
- Burton, G. J., Watson, A. L., Hempstock, J., Skepper, J. N., and Jauniaux, E. (2002). Uterine glands provide histiotrophic nutrition for the human fetus during the first trimester of pregnancy. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 87:2954–2959.
- Cam, A., Sivaguru, M., and Gonzalez de Mejia, E. (2013). Endocytic Mechanism of Internalization of Dietary Peptide Lunasin into Macrophages in Inflammatory Condition

Associated with Cardiovascular Disease. PLoS ONE 8:e72115.

- Carozzi, A. J., Ikonen, E., Lindsay, M. R., and Parton, R. G. (2001). Role of cholesterol in developing T-tubules: analogous mechanisms for T-tubule and caveolae biogenesis. *Traffic* 1:326–341.
- Cheng, Y., Boll, W., Kirchhausen, T., Harrison, S. C. and Walz, T. (2007). Cryo-electron tomography of clathrin-coated vesicles: structural implications for coat assembly. *Journal of Molecular Biology* 365:892–899.
- Chinkers, M., McKanna, J. A. and Cohen, S. (1979). Rapid induction of morphological changes in human carcinoma cells A-431 by epidermal growth factors. *The Journal of Cell Biology* 83:260–265.
- Christianson, H. C., Svensson, K. J., van Kuppevelt, T. H., Li, J.-P. and Belting, M. (2013). Cancer cell exosomes depend on cell-surface heparan sulfate proteoglycans for their internalization and functional activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110:17380–17385.
- Correia-Branco, A., Azevedo, C. F., Araújo, J. R., Guimarães, J. T., Faria, A., Keating, E. and Martel, F. (2015). Xanthohumol impairs glucose uptake by a human first-trimester extravillous trophoblast cell line (HTR-8/SVneo cells) and impacts the process of placentation. *Molecular Human Reproduction* 21:803–815.
- Cuman, C., Van Sinderen, M., Gantier, M. P., Rainczuk, K., Sorby, K., Rombauts, L., Osianlis, T. and Dimitriadis, E. (2015). Human Blastocyst Secreted microRNA Regulate Endometrial Epithelial Cell Adhesion. *EBioMedicine* 2:1528–1535.
- Dawson, J. P., Berger, M. B., Lin, C.-C., Schlessinger, J., Lemmon, M. A. and Ferguson, K. M. (2005). Epidermal growth factor receptor dimerization and activation require ligand-induced conformational changes in the dimer interface. *Molecular and Cellular Biology* 25:7734–7742.
- Desjardins, M. and Griffiths, G. (2003). Phagocytosis: Latex leads the way. *Current Opinion in Cell Biology* 15:498–503.
- Dhonukshe, P., Aniento, F., Hwang, I., Robinson, D. G., Mravec, J., Stierhof, Y. D. and Friml, J. (2007). Clathrin-Mediated Constitutive Endocytosis of PIN Auxin Efflux Carriers in Arabidopsis. *Current Biology* 17:520–527.
- Di Guglielmo, G. M., Le Roy, C., Goodfellow, A. F. and Wrana, J. L. (2003). Distinct endocytic pathways regulate TGF-beta receptor signalling and turnover. *Nature Cell Biology* 5:410–421.
- Distler, J. H. W., Pisetsky, D. S., Huber, L. C., Kalden, J. R., Gay, S. and Distler, O. (2005).

- Microparticles as regulators of inflammation: Novel players of cellular crosstalk in the rheumatic diseases. *Arthritis and Rheumatism* 52:3337–3348.
- Dvorak, A. M., Kohn, S., Morgan, E. S., Fox, P., Nagy, J. A. and Dvorak, H. F. (1996). The vesiculo-vacuolar organelle (VVO): a distinct endothelial cell structure that provides a transcellular pathway for macromolecular extravasation. *Journal of Leukocyte Biology* 59:100–115.
- Ehrlich, M., Boll, W., Van Oijen, A., Hariharan, R., Chandran, K., Nibert, M. L., and Kirchhausen, T. (2004). Endocytosis by random initiation and stabilization of clathrin-coated pits. *Cell* 118:591–605.
- Falcone, S., Cocucci, E., Podini, P., Kirchhausen, T., Clementi, E. and Meldolesi, J. (2006). Macropinocytosis: regulated coordination of endocytic and exocytic membrane traffic events. *Journal of Cell Science* 119:4758–4769.
- Feng, D., Zhao, W. L., Ye, Y. Y., Bai, X. C., Liu, R. Q., Chang, L. F., Zhou, Q. and Sui, S. F. (2010). Cellular internalization of exosomes occurs through phagocytosis. *Traffic* 11:675–687.
- Fra, A. M., Williamson, E., Simons, K. and Parton, R. G. (1995). De novo formation of caveolae in lymphocytes by expression of VIP21-caveolin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92:8655–8659.
- Frank, S., Gaume, B., Bergmann-Leitner, E. S., Leitner, W. W., Robert, E. G., Catez, F., Smith, C. L. and Youle, R. J. (2001). The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Developmental Cell* 1:515–525.
- Frost, A., Perera, R., Roux, A., Spasov, K., Destaing, O., Egelman, E. H., De Camilli, P. and Unger, V. M. (2008). Structural Basis of Membrane Invagination by F-BAR Domains. *Cell* 132:807–817.
- Greening, D. W., Nguyen, H. P. T., Elgass, K., Simpson, R. J. and Salamonsen, L. A. (2016). Human Endometrial Exosomes Contain Hormone-Specific Cargo Modulating Trophoblast Adhesive Capacity: Insights into Endometrial-Embryo Interactions. *Biology of Reproduction* 94:38.
- Gude, N. M., Roberts, C. T., Kalionis, B. and King, R. G. (2004). Growth and function of the normal human placenta. *Thrombosis Research* 114:397–407.
- György, B., Módos, K., Pállinger, E., Pálóczi, K., Pásztói, M., Misják, P., Deli, Mária A., Sipos, A., Szalai, A., Voszka, I., Polgár, A., Tóth, K., Csete, M., Nagy, G., Gay, S., Falus, A., Kittel, A. and Buzás, E. I. (2011). Detection and isolation of cell-derived microparticles are compromised by protein complexes resulting from shared biophysical

- parameters. *Blood* 117:e39–48.
- Harduf, H., Goldman, S. and Shalev, E. (2007). Human uterine epithelial RL95-2 and HEC-1A cell-line adhesiveness: the role of plexin B1. *Fertility and Sterility* 87:1419–1427.
- Harduf, H., Goldman, S. and Shalev, E. (2009). Progesterone receptor A and c-Met mediates spheroids-endometrium attachment. *Reproductive Biology and Endocrinology* 7:14.
- Heijnen, H. F. G., Schiel, A. E., Fijnheer, R., Geuze, H. J. and Sixma, J. J. (1999). Activated Platelets Release Two Types of Membrane Vesicles: Microvesicles by Surface Shedding and Exosomes Derived From Exocytosis of Multivesicular Bodies and α -Granules. *Blood* 94:3791–3799.
- Henne, W. M., Boucrot, E., Meinecke, M., Evergren, E., Vallis, Y., Mittal, R. and McMahon, H. T. (2010). FCHo proteins are nucleators of clathrin-mediated endocytosis. *Science* 328:1281–1284.
- Henne, W. M., Kent, H. M., Ford, M. G. J., Hegde, B. G., Daumke, O., Butler, P. J. G., Mittal, R., Langen, R., Evans, P. and McMahon, H. T. (2007). Structure and analysis of FCHo2 F-BAR domain: a dimerizing and membrane recruitment module that effects membrane curvature. *Structure* 15:839–852.
- Heusermann, W., Hean, J., Trojer, D., Steib, E., von Bueren, S., Graff-Meyer, A., Genoud, C., Martin, K., Pizzato, N., Voshol, H., Morrissey, D., EL Andaloussi, S., Wood, M. and Meisner-Kober, N. C. (2016). Exosomes surf on filopodia to enter cells at endocytic hot spots and shuttle within endosomes to scan the ER. *Journal of Cell Biology* 213:173-184.
- Hinrichsen, L., Meyerholz, A., Groos, S. and Ungewickell, E. J. (2006). Bending a membrane: how clathrin affects budding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:8715–8720.
- Hirano, H., Imai, Y. and Ito, H. (2002). Spiral Artery of Placenta: Development and Pathology - Immunohistochemical, Microscopical, and Electron-Microscopic Study. *Kobe J. Med. Sci.* 13–23.
- Holder, B. S., Tower, C. L., Forbes, K., Mulla, M. J., Aplin, J. D. and Abrahams, V. M. (2012). Immune cell activation by trophoblast-derived microvesicles is mediated by syncytin 1. *Immunology* 136:184–191.
- Horstman, L. L., Jy, W., Jimenez, J. J., Bidot, C. and Ahn, Y. S. (2004). New horizons in the analysis of circulating cell-derived microparticles. *The Keio Journal of Medicine* 53:210–230.
- Hristov, M., Erl, W., Linder, S. and Weber, P. C. (2004). Apoptotic bodies from endothelial cells enhance the number and initiate the differentiation of human endothelial progenitor

- cells in vitro. *Blood* 104:2761.
- Hussain, K. M., Leong, K. L. J., Ng, M. M. L. and Chu, J. J. H. (2011). The essential role of clathrin-mediated endocytosis in the infectious entry of human enterovirus 71. *Journal of Biological Chemistry* 286:309-321
- Jarvis, J. N., Xu, C., Zhao, L., Iobidze, M. and Moore, H. T. (1998). Human choriocarcinoma JAR cells constitutively express pro-interleukin-1beta that can be released with Fc(gamma) receptor engagement. *Pediatric Research* 43:509–513.
- John, N. J., Linke, M. and Denker, H.-W. (1993). Quantitation of human choriocarcinoma spheroid attachment to uterine epithelial cell monolayers. *In Vitro Cellular ja Developmental Biology - Animal* 29:461–468.
- Kaufmann, P., Black, S. and Huppertz, B. (2003). Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. *Biology of Reproduction* 69:1–7.
- Kelly, B. T., McCoy, A. J., Späte, K., Miller, S. E., Evans, P. R., Höning, S. and Owen, D. J. (2008). A structural explanation for the binding of endocytic dileucine motifs by the AP2 complex. *Nature* 456:976–979.
- Kolb-ma, A., Wilhelm, M., Weissinger, F., Bro, E. and Goebel, W. (2002). Interaction of human hematopoietic stem cells with bacterial pathogens. *Immunobiology* 100:3703–3709.
- Kou, L., Sun, J., Zhai, Y. and He, Z. (2013). The endocytosis and intracellular fate of nanomedicines: Implication for rational design. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* 8:1–8.
- Lane, J. D., Lucocq, J., Pryde, J., Barr, F. A., Woodman, P. G., Allan, V. J. and Lowe, M. (2002). Caspase-mediated cleavage of the stacking protein GRASP65 is required for Golgi fragmentation during apoptosis. *The Journal of Cell Biology* 156:495–509.
- Lee, S.-H., Meng, X. W., Flatten, K. S., Loegering, D. A. ja Kaufmann, S. H. (2013). Phosphatidylserine exposure during apoptosis reflects bidirectional trafficking between plasma membrane and cytoplasm. *Cell Death and Differentiation* 20:64–76.
- Li, G., D’Souza-Schorey, C., Barbieri, M. A., Cooper, J. A. and Stahl, P. D. (1997). Uncoupling of membrane ruffling and pinocytosis during Ras signal transduction. *Journal of Biological Chemistry* 272:10337–10340.
- Lim, J. P. and Gleeson, P. A. (2011a). Macropinocytosis: an endocytic pathway for internalising large gulps. *Immunology and Cell Biology* 89:836–843.
- Lim, J. P. and Gleeson, P. A. (2011b). Macropinocytosis: an endocytic pathway for

- internalising large gulps. *Immunology and Cell Biology* 89:836–843.
- Liu, P., Ying, Y. and Anderson, R. G. (1997). Platelet-derived growth factor activates mitogen-activated protein kinase in isolated caveolae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94:13666–13670.
- Liu, P., Ying, Y., Ko, Y. G. and Anderson, R. G. W. (1996). Localization of platelet-derived growth factor-stimulated phosphorylation cascade to caveolae. *Journal of Biological Chemistry* 271:10299–10303.
- Lobb, R. J., Becker, M., Wen, S. W., Wong, C. S. F., Wiegmans, A. P., Leimgruber, A., and Möller, A. (2015). Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma. *Journal of Extracellular Vesicles* 4.
- Majeed, M., Cavegion, E., Lowell, C. A. and Berton, G. (2001). Role of Src kinases and Syk in Fcγ receptor-mediated phagocytosis and phagosome-lysosome fusion. *Journal of Leukocyte Biology* 70:801–811.
- Mcmahon, H. T. and Boucrot, E. (2011). Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nature Publishing Group* 12:517–533.
- Mcneil, P. L. and Kirchhausen, T. (2005). An emergency response team for membrane repair. *Molecular Cell* 6:499–505.
- Montesano, R., Roth, J., Robert, A. and Orci, L. (1982). Non-coated membrane invaginations are involved in binding and internalization of cholera and tetanus toxins. *Nature* 296:651–653.
- Moser, G., Gauster, M., Orendi, K., Glasner, A., Theuerkauf, R. and Huppertz, B. (2010). Endoglandular trophoblast, an alternative route of trophoblast invasion? Analysis with novel confrontation co-culture models. *Human Reproduction* 25:1127–1136.
- Motley, A., Bright, N. A., Seaman, M. N. J. and Robinson, M. S. (2003). Clathrin-mediated endocytosis in AP-2-depleted cells. *Journal of Cell Biology* 162:909–918.
- Muralidharan-Chari, V., Clancy, J., Plou, C., Romao, M., Chavrier, P., Raposo, G. and D'Souza-Schorey, C. (2009). ARF6-regulated shedding of tumor-cell derived plasma membrane microvesicles. *Curr Biol.* 19:1875–1885.
- Nakase, I., Kobayashi, N. B., Takatani-Nakase, T. and Yoshida, T. (2015). Active macropinocytosis induction by stimulation of epidermal growth factor receptor and oncogenic Ras expression potentiates cellular uptake efficacy of exosomes. *Scientific Reports* 5:10300.
- Nawaz, M., Camussi, G., Valadi, H., Nazarenko, I., Ekstrom, K., Wang, X., Principe, S., Shah, N., Ashraf, N., Fatima, F., Neder, L. and Kislinger, T. (2014). The emerging role

- of extracellular vesicles as biomarkers for urogenital cancers. *Nat Rev Urol* 11:688–701.
- Nawaz, M., Fatima, F., Zanetti, B. R., Martins, I. D. L., Schiavotelo, N. L., Mendes, N. D., Silvestre, R. and Neder, L. (2014). Microvesicles in Gliomas and Medulloblastomas : An Overview. *Journal of Cancer Therapy* 5:182–191.
- Ng, Y. H., Rome, S. and Labert, A., Forterre, A., Singh, H., Hincks, C. L., and Salamonsen, L. A. (2013). Endometrial Exosomes/Microvesicles in the Uterine Microenvironment: A New Paradigm for Embryo-Endometrial Cross Talk at Implantation. *PLoS ONE* 8:e58502.
- Norbury, C. C., Chambers, B. J., Prescott, A. R., Ljunggren, H. G. and Watts, C. (1997). Constitutive macropinocytosis allows TAP-dependent major histocompatibility complex class I presentation of exogenous soluble antigen by bone marrow-derived dendritic cells. *European Journal of Immunology* 27:280–288.
- Oram, J. F. and Yokoyama, S. (1996). Apolipoprotein-mediated removal of cellular cholesterol and phospholipids. *Journal of Lipid Research* 37:2473–2491.
- Pan, B. T., Teng, K., Wu, C., Adam, M. and Johnstone, R. M. (1985). Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *Journal of Cell Biology* 101:942–948.
- Parton, R. G. and Simons, K. (2007). The multiple faces of caveolae. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 8:185–194.
- Parton, R. G., Way, M., Zorzi, N. and Stang, E. (1997). Caveolin-3 associates with developing T-tubules during muscle differentiation. *Journal of Cell Biology* 136:137–154.
- Peiró, S., Comella, J. X., Enrich, C., Martín-Zanca, D. and Rocamora, N. (2000). PC12 cells have caveolae that contain TrkA. Caveolae-disrupting drugs inhibit nerve growth factor-induced, but not epidermal growth factor-induced, MAPK phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry* 275:37846–37852.
- Pelkmans, L., Kartenbeck, J. and Helenius, A. (2001). Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nature Cell Biology* 3:473–483.
- Peter, B. J., Kent, H. M., Mills, I. G., Vallis, Y., Butler, P. J. G., Evans, P. R. and McMahon, H. T. (2004). BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure. *Science* 303:495–499.
- Pijnenborg, R., Vercruyse, L. and Hanssens, M. (2006). The uterine spiral arteries in human pregnancy: facts and controversies. *Placenta* 27:939–958.

- Pilzer, D., Gasser, O., Moskvich, O., Schifferli, J. A. and Fishelson, Z. (2005). Emission of membrane vesicles: roles in complement resistance, immunity and cancer. *Springer Seminars in Immunopathology* 27:375–387.
- Razani, B., Woodman, S. E. and Lisanti, M. P. (2002). Caveolae: from cell biology to animal physiology. *Pharmacological Reviews* 54:431–467.
- Redman, C. W. G. and Sargent, I. L. (2007). Microparticles and immunomodulation in pregnancy and pre-eclampsia. *Journal of Reproductive Immunology* 76:61–67.
- Redzovic, A., Laskarin, G., Dominovic, M., Haller, H. and Rukavina, D. (2013). Mucins help to avoid alloreactivity at the maternal fetal interface. *Clinical and Developmental Immunology* 2013:9.
- Rejman, J., Oberle, V., Zuhorn, I. S. and Hoekstra, D. (2004). Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *The Biochemical Journal* 377:159–169.
- Rothberg, K. G., Heuser, J. E., Donzell, W. C., Ying, Y.-S., Glenney, J. R. and Anderson, R. G. W. (1992). Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* 68:673–682.
- Roux, A., Uyhazi, K., Frost, A. and De Camilli, P. (2006). GTP-dependent twisting of dynamin implicates constriction and tension in membrane fission. *Nature* 441:528–531.
- Saffarian, S., Cocucci, E. and Kirchhausen, T. (2009). Distinct dynamics of endocytic clathrin-coated pits and coated plaques. *PLoS Biology* 7:e1000191.
- Salomon, C., Sarah, Y., Scholz-Romero, K., Kobayashi, M., Vaswani, K., Kvaskoff, D., Illanes, S. E., Mitchell, M. and Rice, G. E. (2014). Extravillous trophoblast cells-derived exosomes promote vascular smooth muscle cell migration. *Frontiers in Pharmacology* 5:1–13.
- Salomon, C., Yee, S. W., Mitchell, M. D. and Rice, G. E. (2014). The Possible Role of Extravillous Trophoblast-Derived Exosomes on the Uterine Spiral Arterial Remodeling under Both Normal and Pathological Conditions. *BioMed Research International* 2014:1–10.
- Sargiacomo, M., Sudol, M., Tang, Z. and Lisanti, M. P. (1993). Signal transducing molecules and glycosyl-phosphatidylinositol-linked proteins form a caveolin-rich insoluble complex in MDCK cells. *Journal of Cell Biology* 122:789–807.
- Schlossman, D. M., Schmid, S. L., Braell, W. A. and Rothman, J. E. (1984). An enzyme that removes clathrin coats: purification of an uncoating ATPase. *The Journal of Cell Biology* 99:723–733.

- Schmid, S. L. (1997). Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process. *Annual Review of Biochemistry* 66:511–48.
- Schneider, A. and Simons, M. (2016). Catching filopodia: Exosomes surf on fast highways to enter cells. *The Journal of Cell Biology* 213:143–145.
- Schnitzer, J. E. (1994). Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and capillary permeability of select macromolecules. *The Journal of Cell Biology* 127:1217–1232.
- Seyrantepe, V., Iannello, A., Liang, F., Kanshin, E., andyanth, P., Samarani, S., Szewczuk, M. R., Ahmad, A. and Pshezhetsky, A. V. (2010). Regulation of phagocytosis in macrophages by neuraminidase 1. *Journal of Biological Chemistry* 285:206–215.
- Shin, J.-S. (2000). Involvement of Cellular Caveolae in Bacterial Entry into Mast Cells. *Science* 289:785–788.
- Simionescu, N., Simionescu, M. and Palade, G. E. (1973). Permeability of muscle capillaries to exogenous myoglobin. *Journal of Cell Biology* 57:424–452.
- Simionescu, N., Simionescu, M. and Palade, G. E. (1975). Permeability of muscle capillaries to small heme peptides. Evidence for the existence of patent transendothelial channels. *Journal of Cell Biology* 64:586–607.
- Simons, K. and Toomre, D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 1:31–39.
- Smaczynska-de Rooij, I. I., Allwood, E. G., Aghamohammadzadeh, S., Hetteema, E. H., Goldberg, M. W. and Ayscough, K. R. (2010). A role for the dynamin-like protein Vps1 during endocytosis in yeast. *Journal of Cell Science* 123:3496–3506.
- Smart, E. J., Ying, Y. S., Conrad, P. A. and Anderson, R. G. W. (1994). Caveolin moves from caveolae to the Golgi apparatus in response to cholesterol oxidation. *Journal of Cell Biology* 127:1185–1197.
- Smart, E. J., Ying, Y. S., Donzell, W. C. and Anderson, R. G. W. (1996). A role for caveolin in transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to plasma membrane. *Journal of Biological Chemistry* 271:29427–29435.
- Spencer, T., Diego, S. and Kensington, S. (1990). Of a Specific Signal Sequence for Internalization. *Journal of Cell Biology* 110:283–294.
- Stan, R. V., Roberts, W. G., Predescu, D., Ihida, K., Saucan, L., Ghitescu, L. and Palade, G. E. (1997). Immunolocalization and partial characterization of endothelial plasmalemmal vesicles (caveolae). *Molecular Biology of the Cell* 8:595–605.
- Stan, R. V., Ghitescu, L. andcobson, B. S. and Palade, G. E. (1999). Isolation, cloning, and

- localization of rat PV-1, a novel endothelial caveolar protein. *Journal of Cell Biology* 145:1189–1198.
- Stang, E., Kartenbeck, J. and Parton, R. G. (1997). Major histocompatibility complex class I molecules mediate association of SV40 with caveolae. *Molecular Biology of the Cell* 8:47–57.
- Stimpson, H. E. M., Toret, C. P., Cheng, A. T., Pauly, B. S. and Drubin, D. G. (2009). Early-arriving Syp1p and Ede1p function in endocytic site placement and formation in budding yeast. *Molecular Biology of the Cell* 20:4640–4651.
- Swanson, J. A. (1989). Phorbol esters stimulate macropinocytosis and solute flow through macrophages. *Journal of Cell Science* 94:135–142.
- Swanson, J. A. (2008). Shaping cups into phagosomes and macropinosomes. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 9:639–649.
- Swanson, J. A. and Yoshida, S. (2015). Macropinocytosis. *Encyclopedia of Cell Biology* 2: 758-765
- Sweitzer, S. M. and Hinshaw, J. E. (1998). Dynamin Undergoes a GTP-Dependent Conformational Change Causing Vesiculation. *Cell* 93:1021–1029.
- Taylor, R. C., Cullen, S. P. and Martin, S. J. (2008). Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 9:231–241.
- Tetta, C., Bruno, S., Fonsato, V., Deregibus, M. C. and Camussi, G. (2011). The role of microvesicles in tissue repair. *Organogenesis* 7:105–115.
- Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G. and Clayton, A. (2006). Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Current Protocols in Cell Biology* 30:3.22.1–3.22.29.
- Trams, E. G., Lauter, C. J., Norman S. J. and Heine, U. (1981). Exfoliation of Membrane Ecto-Enzymes in the Form of Micro-Vesicles. *BBA - Biomembranes* 645:63–70.
- Traub, L. M. (2009). Tickets to ride: selecting cargo for clathrin-regulated internalization. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 10:583–596.
- Trowsdale, J. and Moffett, A. (2008). NK receptor interactions with MHC class I molecules in pregnancy. *Seminars in Immunology* 20:317–320.
- Tsukamoto, H. and Farrens, D. L. (2013). A constitutively activating mutation alters the dynamics and energetics of a key conformational change in a ligand-free G protein-coupled receptor. *Journal of Biological Chemistry* 288:28207–28216.
- Turiák, L., Misják, P., Szabó, T. G., Aradi, B., Pálóczi, K., Ozoholics, O., Drahos, L., Kittel, A., Falus, A. ja Buzás, E. I. and Vékey, K. (2011). Proteomic characterization of

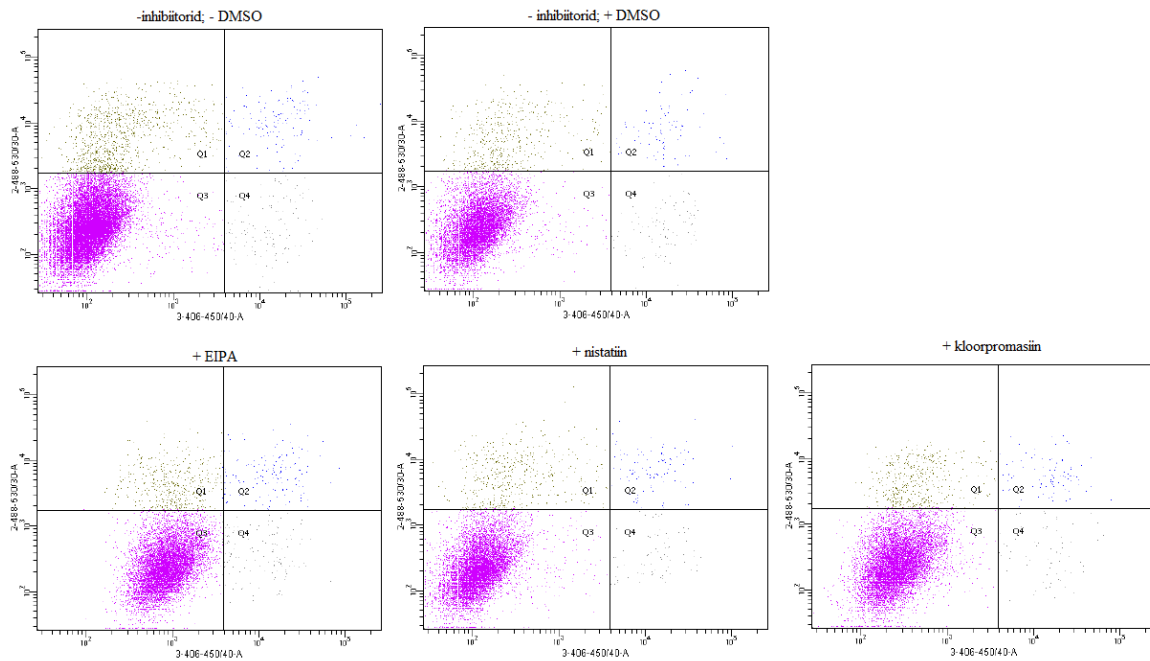
- thymocyte-derived microvesicles and apoptotic bodies in BALB/c mice. *Journal of Proteomics* 74:2025–2033.
- Turturici, G., Tinnirello, R., Sconzo, G. and Geraci, F. (2014). Extracellular membrane vesicles as a mechanism of cell-to-cell communication: advantages and disadvantages. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 306:C621–633.
- Urbé, S., Tooze, S. A. and Barr, F. A. (1997). Formation of secretory vesicles in the biosynthetic pathway. *Biochimica et Biophysica Acta* 1358:6–22.
- van der Pol, E., Böing, A. N., Harrison, P., Sturk, A. and Nieuwland, R. (2012). Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacological Reviews* 64:676–705.
- Vilella, F., Moreno-Moya, J. M., Balaguer, N., Grasso, A., Herrero, M., Martinez, S., Marcilla, A. and Simon, C. (2015). Hsa-miR-30d, secreted by the human endometrium, is taken up by the pre-implantation embryo and might modify its transcriptome. *Development* 142:3210–3221.
- Weber, M., Knoefler, I., Schleussner, E., Markert, U. R. and Fitzgerald, J. S. (2013). HTR8/SVneo cells display trophoblast progenitor cell-like characteristics indicative of self-renewal, repopulation activity, and expression of “stemness-” associated transcription factors. *BioMed Research International* 2013.
- Wei, X., Liu, C., Wang, H., Wang, L., Xiao, F., Guo, Z. and Zhang, H. (2016). Surface Phosphatidylserine Is Responsible for the Internalization on Microvesicles Derived from Hypoxia-Induced Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells into Human Endothelial Cells. *PLoS ONE* 11:e0147360.
- Yamada, E. (1955). The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* 1:445–458.
- Yáñez-Mó, M., Siljander, P. R.-M., Andreu, Z., Zavec, A. B., Borràs, F. E., Buzas, E. I. . . . Wever, O. De. (2015). Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of Extracellular Vesicles* 4.
- Yu, A., Rual, J., Tamai, K., Harada, Y., Vidal, M., He, X. and Kirchhausen, T. (2007). Association of Dishevelled with the Clathrin AP-2. *Developmental Cell* 12:129–141.

KASUTATUD VEEBIAADDRESSID

http://www.spheroTech.com/tech_SpheroTech_Note_1.html

LISAD

Lisa 1. Apoptoetiliste RL95-2 rakkude läbivoolu tsütofluorimeetriline analüüs. Rakud inkubeeriti DAPI ja Annexin-V-FITC-ga, mis seostuvad tuuma DNA ja raku pinnale eksponeeritud fosfatidüülseriiniga. Kuna EIPA ja nistatiin lahjendati DMSO-s, siis analüüsiti ka rakud, kuhu lisati DMSO-t. Y-teljel on Annexin-V-FITC fluorestents ja X-teljel DAPI fluorestents. Q1 – hiline apoptoos; Q2 – surnud rakud; Q3 – terved rakud; Q4 – varane apoptoos.



TÄNUSÕNAD

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

LIHTLITSENTS LÕPUTÖÖ REPRODUTSEERIMISEKS JA LÕPUTÖÖ ÜLDSUSELE KÄTTESAADAVAKS TEGEMISEKS

Mina Arina Lavrits (sünnikuupäev: 22.04.1991)

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

Trofoblasti rakuliini HTR-8/Svneo mikrovesiikulite ja eksosoomide sissevõtmine endomeetriumi rakuliinidesse RL95-2 ja HEC-1A,

mille juhendajad on Sulev Ingerpuu ja Mariann Koel

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

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates 01.01.2019 kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

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

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

Tartus, 27.05.2016