

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

Juri Juksar

Rakkude kasvutihedus maatriksi metalloproteinaaside ekspressiooni reguleeriva faktorina

Bakalaureusetöö

Juhendaja Viljar Jaks, Ph.D.
Kaasjuhendaja Denis Belitškin, M.Sc.

TARTU 2013

SISUKORD

SISUKORD.....	2
KASUTATUD LÜHENDID.....	4
SISSEJUHATUS.....	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	6
1.1 Proteinaasid.....	6
1.1.1 Maatriksi metalloproteinaasid.....	7
1.1.1.1 MMP-de klassifikatsioon.....	7
1.1.1.2 Maatriksi metalloproteinaaside struktuur.....	8
1.1.1.3 Metalloproteinaaside regulatsioon.....	10
1.1.2 Maatriksi metalloproteinaas 2.....	11
1.1.3 Maatriksi metalloproteinaas 7.....	12
1.1.4 Maatriksi metalloproteinaas 9.....	13
1.1.5 Maatriksi metalloproteinaas 14 ehk MT1-MMP.....	13
1.2 Ekstratsellulaarne maatriks.....	14
1.2.2 Laminiinid ja ekstratsellulaarne maatriks.....	14
1.2.3 Metalloproteinaasid ja ekstratsellulaarne maatriks.....	15
1.2.4 MMP-de roll vähi arengus ning levikus.....	15
2. EKSPERIMENTAALOSA.....	17
2.1 Töö eesmärgid.....	17
2.2 Materjal ja meetodika.....	18
2.2.1 Rakud ja nende kultiveerimine.....	18
2.2.2 RNA eraldamine.....	18
2.2.3 cDNA süntees.....	18
2.2.4 DNA amplifikatsioon.....	19
2.2.5 Geelelektroforees.....	20
2.2.6 Valkude ekspressiooni analüüs <i>Western blot</i> meetodil.....	20
2.2.6.1 Maatriksi lüsaat.....	20
2.2.6.2 Rakulüsaat.....	21
2.2.6.3 <i>Western blot</i>	21
2.3 Töö tulemused.....	23
2.3.1 Variatsioonid erinevate rakuliinide MMP-de regulatsioonis.....	23
2.3.1.1 A549 rakuliinis leiduvate MMP-de ekspressiooni analüüs.....	23
2.3.1.2 HeLa rakuliinis leiduvate MMP-de ekspressiooni analüüs.....	24
2.3.1.3 JAR rakuliinis leiduvate MMP-de ekspressiooni analüüs.....	25
2.3.2 Laminiini ahelate proteolüütiline lõikamine konfluentsete A549 rakkude ECM-s.....	26

2.4 Töö arutelu	28
KOKKUVÕTE.....	31
RESUME.....	32
TÄNUSÕNAD.....	33
KASUTATUD KIRJANDUS	34
LISA 1.	39
LISA 2.	40
LISA 3.	41
LIHTLITSENTS	42

KASUTATUD LÜHENDID

CBD – *collagen binding domain*, kollageeni siduv domään

GPI – *glycosylphosphatidylinositol*, glükosüülfosfatidüülinositol

ECM – *extracellular matrix*, ekstratsellulaarne maatriks

FAS – *fatty acid synthase*, rasvhappe süntaas

FBS – *fetal bovine serum*, veise looteseerum

GAPDH - *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*, glütseeraldehüüd 3-fosfaat dehüdrogenaas

HRP – *horseradish peroxidase*, mädarõika peroksüdaas

HRPLP0 – *human ribosomal protein, large P0*, inimese suur ribosoomi valk P0

IMDM – *Iscove's Modified Dulbecco's Medium*, sööde rakkude kasvatamiseks

Ln-10 – *Laminin 10*, Laminiin 10

MMP – *matrix metalloproteinase*, maatriksi metalloproteinaas

MT-MMP – *membrane type matrix metalloproteinase*, membraantüüpi maatriksi metalloproteinaas

PAR – *protease activated receptor*, proteolüütiliselt aktiveeritud retseptor

PBS – *phosphate buffered saline*, fosfaat-puhverdatud soolalahus

PCR – *polymerase chain reaction*, polümeraasi ahelreaktsioon

PEX-domään – *hemopexin domain*, hemopeksiini domään

PMSF – *phenylmethylsulfonyl fluoride*, fenüülmetüülsulfonüül fluoriid

PVDF – *polyvinylidene difluoride*, polüvinüül difluoriid

RPMI – *Roswell Park Memorial Institute*, sööde rakkude kasvatamiseks

RT-PCR – *reverse transcription polymerase chain reaction*, pöördtranskriptsiooni polümeraasi ahelreaktsioon

SDS – *sodium-dodecyl-sulfate*, naatrium-dodetsüül-sulfaat

TIMP – *tissue inhibitor of metalloproteinases*, metalloproteinaaside koeinhibiitor

VEGF – *vascular endothelial growth factor*, veresoonte endoteliaalne kasvufaktor

SISSEJUHATUS

Ekstratsellulaarne maatriks ehk rakuvaheaine on rakkudevaheline võrgustik, mis koosneb rakkude sünteesitud ning sekreteeritud polüsahhariididest ja valkudest, millest olulisemateks võib pidada mitmesuguseid maatriksile tugevust ja elastsust andvaid kollageene ja laminiine. Rakuvaheaine peamine ülesanne on toimida kudede ehitusliku osana ning mõjutada nende arengut ja talitlust. Samas käitub ta kui kasvufaktorite lokaalne hoidla, mis võimaldab kasvufaktorite poolt indutseeritud kiiret ja lokaalset rakufunktsioonide aktivatsiooni. Seega on ekstratsellulaarne maatriks oluline kudede kasvukeskkonna kujundaja, millega kaasneb tema pidev struktuurne regulatsioon. Ühe regulatsioonitaseme moodustavad rakkude poolt sekreteeritavad maatriksi metalloproteinaasid, osaledes ekstratsellulaarse maatriksi degradatsioonis.

Maatriksi metalloproteinaasid on tsink-sõltuvad endopeptidaasid, mis osalevad hulga füsioloogiliste protsesside regulatsioonis, kaasa arvatud ekstratsellulaarse maatriksi remodelleerimises. Mitmete kasvajate puhul on märgatud metalloproteinaaside üleekspressiooni ja sekretsiooni, mis viitab sellele, et üha kasvava rakumassi mahutamiseks on vajalik pidev ekstratsellulaarse maatriksi lagundamine. Seega on rakuvaheaine konstitutiivne degradatsioon üheks kasvajate invasiivsuse tunnuseks. Sellise protsessi täpsem tundmaõppimine võib anda võimaluse uudsete ja tõhusate ravimeetodite väljatöötamiseks vähiteraapias.

Vähivastase ravimeetodi valikul on tähtis teada, milline on rakkude geeniekspressiooni muster. Erinevas faasis kasvajatel on erinev rakutihedus, mis omakorda tingib erinevuse rakkude geeniekspressiooni mustrites. Kasvajarakkude täpse geeniekspressiooni programmi teadmine enne ravi valikut võimaldaks iga patsiendi puhul rakendada personaalset lähenemist, mis oleks oluliselt tõhusam kui massmeetodid. Käesolev uurimustöö on keskendunud maatriksi metalloproteinaaside sünteesiprogrammi uurimisele, mis on reguleeritud kasvajarakkude tiheduse poolt.

Töö kirjanduslikus ülevaates keskendutakse eelkõige maatriksi metalloproteinaasidele ja nende seosele ekstratsellulaarse maatriksiga ning tuakse välja, kuidas see mõjutab vähkkasvajate invasiivsust. Töö eksperimentaalse osa eesmärgiks oli identifitseerida need maatriksi metalloproteinaasid, mis on reguleeritud rakkude tiheduse poolt ning mis võiksid olla vastutavad ekstratsellulaarse maatriksi lagundamise eest. Antud projekti lõpptulemus võiks olla lihtne maatriksi metalloproteinaaside *in vitro* mudel, mis kujutaks endast sobivat keskkonda järgnevate katsete läbiviimiseks.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Proteinaasid

Proteinaasideks nimetatakse ensüüme, mis on võimelised hüdrolüüsima valke väiksemateks peptiidideks. Sõltuvalt aminohappelisest järjestusest on proteinaasid võimelised lõikama kas teatud kindlaid peptiidsidemeid või lagundama terve peptiidiahela üksikuteks aminohapeteks. Olenevalt konkreetse valgu ülesandest võib selle osaline või täielik lagundamine kaasa tuua valgu funktsiooni kadumise (Murby jt, 1996) või uute signaaliradade aktivatsiooni proteolüütiliselt aktiveeritavates retseptorites (PAR, ingl *protease activated receptor*) (Soh jt, 2010). Seega on proteinaaside töö funktsionaalselt äärmiselt oluline ja vastutusrikas, mistõttu ei ole üllatav, et kõnealune ensüümperekond on äärmiselt mitmekesine, hõlmates väga erineva spetsiifilisusega valke.

Tänaseni on kasutusel Barrett'i 1994. aastal ilmunud artiklis välja pakutud proteinaaside klassifikatsioon (Barrett, 1994). Rühmitamise aluseks on valkude aktiivsentril paiknev vastav molekul, millest tulenevalt jaotatakse proteinaasid nelja suurde rühma: seriin proteinaasid, tsüsteiin proteinaasid, aspartaat proteinaasid ja metalloproteinaasid.

Seriin proteinaasid on oma nime saanud aktiivsaidis paikneva nukleofiilse seriini jäägi järgi (Hedstrom, 2002). Seriin proteinaase kasutab organism komplemendisüsteemi kaskaadis (Sim ja Laich, 2000) ning valesti volditud valkude lagundamisel (Pallen ja Wren, 1997). Plasmiin on üks seriin proteinaasidest, millel on võime aktiveerida ka maatriksi metalloproteinaase (MMP, ingl *matrix metalloproteinases*) (Monea jt, 2002).

Tsüsteiin proteinaasid omavad katalüütilist aktiivsust läbi tsüsteiini nukleofiilse tiolrühma. Kaspasid on tüüpilised tsüsteiin proteinaasid, mis vastutavad rakkudes apoptoosi läbiviimise eest. (Kumar, 2007).

Aspartaat proteinaas kasutab proteolüüsil aspartaadi jääki. Selliste proteinaaside hulka kuuluvad näiteks katepsiinid B ja D. Katepsiinide osalust peetakse oluliseks ka rinnavähi arengus (Baldwin jt, 1993), kus on näidatud nende ensüümide kõrget üleekspressiooni (Lee ja Choi, 2013).

Metalloproteinaasid on proteinaasid, mille katalüütiline protsess on seotud metalliga. Need ensüümid osalevad ekstratsellulaarse keskkonna remodulleerimises (Koshikawa jt, 2000) ning angiogeneesis (Bergers jt, 2000). Metalloproteinaaside substraatideks võivad olla sellised valgud nagu kollageen, želatiin või erinevad proteoglykaanid. Metalloproteinaaside hulka kuuluvad ka

maatriksi metalloproteinaasid, millele järgnevas kirjanduslikus ülevaates põhjalikumalt keskendutakse.

1.1.1 Maatriksi metalloproteinaasid

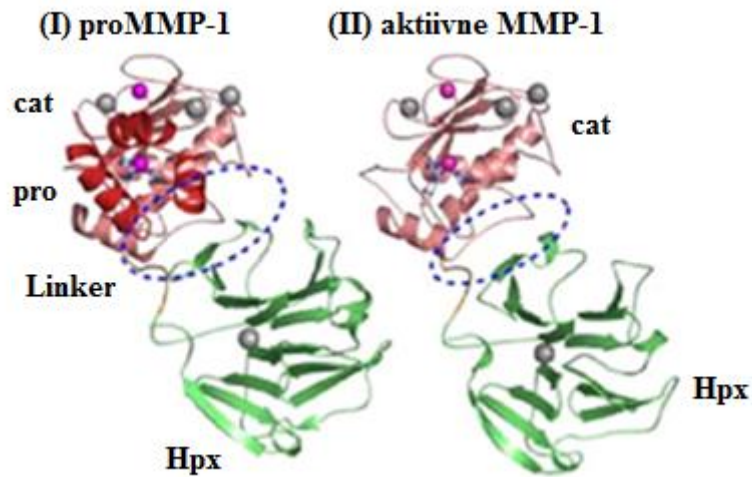
Esimesed kokkupuuted maatriksi metalloproteinaasidele sarnaste ensüümidega pärinevad 1962. aastast, kui Frederick J. Woessner Jr. kirjeldas kollageeni ensümaatilist lagundamist (Woessner, 1962). Samal aastal ilmunud artiklis uurisid Jerome Gross ja Charles Lapiere ensüümvahendatud kollageeni lüüsi konnakullese saba morfogeneesil, kirjeldades kollageenaasi, millest sai esimene MMP-de perekonna liige. (Gross ja Lapiere, 1962). Tänapäeval kuuluvad MMP-d suuremasse metalloproteinaaside perekonda ning neid peetakse oluliseks nii angiogeneesis (Sang, 1998) kui haavade paranemises (Pilcher jt, 1997).

1.1.1.1 MMP-de klassifikatsioon

MMP-d on oma rakulise lokalisatsiooni järgi jaotatud kahte rühma: sekreteeritavad ja membraanseoselised MMP-d (Bauvois, 2012).

Imetajatel kuulub sekreteeritud MMP-de hulka 17 MMP-d (Stevens ja Page-McCaw, 2012). Antud MMP-d sekreteeritakse latentsete proensüümide vormis, mis aktiveeruvad alles peale pro-domääni eemaldamist (Joonis 1). Sellist aktivatsiooni võivad läbi viia lisaks muudele aktivaatoritele ka juba aktiveeritud MMP-d (Wang jt, 2005) (Lisa 1). Sekreteeritavaid MMP-sid saab struktuuri järgi jaotada veel viieks grupiks: minimaal-domäänsed, hemopeksiini domääni (PEX-domään, ingl *hemopexin domain*) sisaldavad, želatiiniga seonduvad, furiini poolt aktiveeritud sekreteeritud ning vitronektiini taolise inserdigiga MMP-d (Lisa 2). Vitronektiin on ekstratsellulaarses maatriksis (ECM, ingl *extracellular matrix*) laialdaselt levinud adhesiooni soodustav glükoproteiin (Hayman jt, 1985).

Sekreteeritud MMP-de hulka kuuluvad näiteks MMP-2 ja -9, mida kutsutakse vastavalt želatinaas A ja B. Samuti kuuluvad sellesse rühma kollageenaasid (MMP-1, -8, -13 ja -18), matrilüsiinid (MMP-7 ja -26) (Gaire jt, 1994) ja stromelüsiinid (MMP-3, -10 ja -11).



Joonis 1. 3D kujutis inaktiivsest ja aktiivsest metalloproteinaasist MMP-1 näitel. Nii latentne kui aktiivne MMP-1 koosnevad katalüütilisest (cat), hemopeksiini (Hpx) ja neid ühendavast linker domäänist. Inaktiivsel vormil on lisaks veel pro-domään (pro), mis MMP aktiveerimiseks eemaldatakse. Modifitseeritud (Nagase jt, 2006).

Imetajatel kuulub membraanseoseliste MMP-de hulka 7 MMP-d (Stevens ja Page-McCaw, 2012). Membraantüüpi MMP-d on lokaliseerunud raku pinnale C-terminaalses otsas paikneva transmembraanse domääni või glükosüülfosfatidüülinositolist (GPI, ingl *glycosylphosphatidylinositol*) ankru abil. Struktuurselt saab neid jaotada membraanseoselisteks (tüüp I transmembraansed MMP-d), GPI-ankruga ja tüüp II transmembraanseteks MMP-deks. Membraanseoseliste MMP-de hulka kuulub näiteks MMP-14, mida kutsutakse ka MT1-MMP-ks (ingl *membrane type I matrix metalloproteinase*).

Lisaks lokalisatsioonipõhisele klassifikatsioonile võib MMP-sid eristada ka neile spetsiifilise substraadi lõikamise alusel. Selle põhjal jaotatakse MMP-d viite gruppi, milleks on kollageenaasid, želatinaasid, stromelüsiinid, matrilüsiinid ja membraantüüpi MMP-d (Bauvois, 2012).

1.1.1.2 Maatriksi metalloproteinaaside struktuur

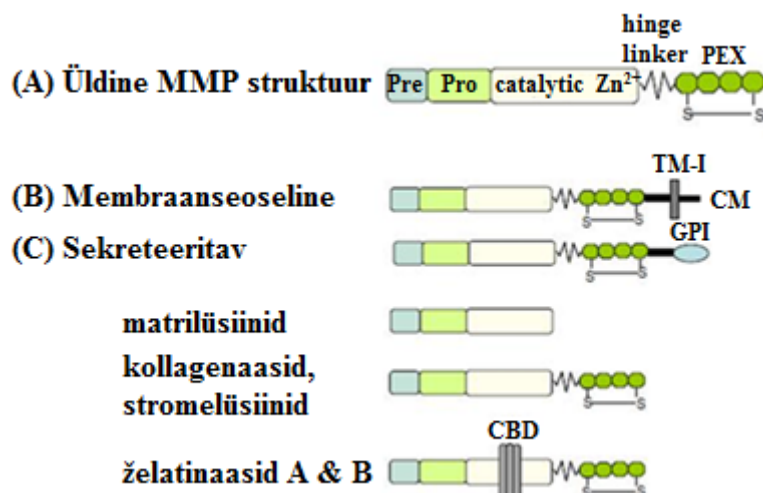
Hoolimata MMP-de perekonna suurest mitmekesisusest, võib neil ensüümidel täheldada siiski laialdaselt konserveerunud struktuuride olemasolu. Kõik maatriksi metalloproteinaasid (MMP-d) omavad propeptiidi, katalüütilist domääni ja signaalpeptiidi (Joonis 2). Propeptiidi domään on vajalik ensümaatiliseks latentsuseks. MMP-d on zümogeenid ehk nad on sünteesitud ilma oma tavapärase proteolüütilise aktiivsusega. Selliseid zümogeenide metalloproteinaase kutsutakse proMMP-deks. (Toth jt, 2003).

Aktiivtsentris tsinki (Zn^{2+}) sisaldav katalüütiline domään on vajalik MMP-dele omase ECM-i valkude degradatsiooni läbiviimiseks. Metalliooni olemasolu tagab katalüütilise domääni stabiilsuse ning nõrga termilise vastupidavuse (Wetmore ja Hardman, 1996). Enamik looduses esinevaid MMP-sid sisaldavad aktiivsaidis ühte või mitut tsink iooni. Samas leidub näiteid ka olukordadest, kus Zn on asendatud mõne teise divalentse katiooniga, näiteks koobalti või mangaaniga, kuid mille katalüütiline aktiivsus on ühetaoline. (Fukasawa jt, 2011).

Osadel MMP-del, nagu MMP-2 ja MMP-9, on katalüütilises piirkonnas kollageeni seondav domään (CBD, ingl *collagen binding domain*) (Joonis 1). Selle abil on MMP-d võimelised seonduma kollageenile ning suurendama teatud kollageenide, näiteks tüüp IV (Zeng jt, 1999) ja V (Veidal jt, 2012) degradeerimist (Murphy jt, 1994).

Suurel osal MMP-dest on ka paindlik proliinirikas liigend (ingl *hinge linker*), mis ühendab omavahel katalüütilise ja hemopeksiini domääni. PEX-domään seob MMP-de koeinhibiitoreid (TIMP, ingl *tissue inhibitor of metalloproteinase*) või substraate ning osaleb MMP-de aktivatsioonis. Esineb ka MMP-sid, millel puudub PEX-domään (Massova jt, 1998).

Membraantüüpi MMP-d omavad lisaks transmembraanset domääni ning lühikest tsütoplasmaatilist domääni (Joonis 2) (Dufour jt, 2008).



Joonis 2. Maatriksi metalloproteinaaside struktuurid ja nende erinevused. Joonisel on välja toodud MMP-de struktuurüksused – signaalpeptiid (Pre), propeptiid (Pro), katalüütiline domään (*catalytic*). Lisaks on välja toodud MMP-2-le ja MMP-9-le iseloomulik kollageeni seondav domään (CBD). Suuremal osal MMP-dest on ka liigend, mis on seotud PEX-domääniga. Membraanseoselistel MMP-del on näha transmembraanset osa (TM) ning tsütoplasmaatilist saba (CM). Modifitseeritud (Bauvois, 2012).

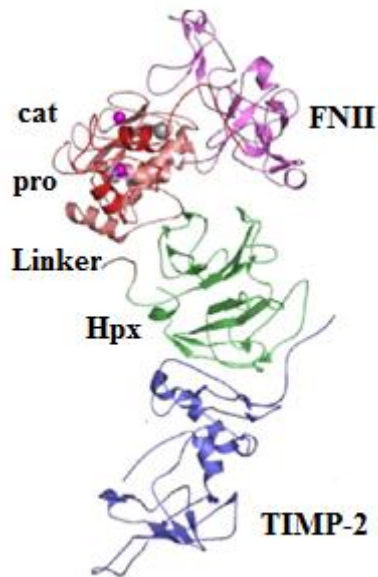
Eelneva põhjal võib öelda, et kuigi MMP-d jagavad mitmeid ühiseid tunnuseid, siis ometi on nende vahel ka hulgaliselt erinevusi. Nende omaduste baasil on võimalik erinevatel MMP-del osaleda neile vastavates regulatsiooniprotsessides.

1.1.1.3 Metalloproteinaaside regulatsioon

MMP-sid sekreteeritakse mitmete sidekoe- ja vähirakkude, fibroblastide, osteoblastide, endoteeli rakkude ja lümfotsüütide poolt. Kuna MMP-d suudavad lagundada tähtsaid valke ning kutsuda esile erinevaid rakke mõjutavaid protsesse, nagu adhesiooni vähendamine või apoptoosi indutseerimine (Li jt, 2006), on homöostaasi säilitamiseks normaalsetes füsioloogilistes tingimustes MMP-de ekspressioon minimaalne. (Verma ja Hansch, 2007). Lisaks on paljudel MMP-del sarnased ülesanded, mistõttu on nende bioloogiline funktsioon määratud rohkem ekspressiooni kui spetsiifilise rolli täitmise vajaduse poolt.

Kuigi valdavalt reguleeritakse MMP-de ekspressiooni transkriptsiooni tasemel, siis esineb ka erandeid. Näitena võib välja tuua MMP-2, mis erinevalt teistest MMP-dest on mitmetes normaalsetes ja transformeerunud rakkudes konstitutiivselt ekspresseeritud (Strongin jt, 1995) (Roomi jt, 2009).

MMP-d sünteesitakse zümogeenidena proMMP-de kujul (Quan jt, 2012). Oma katalüütilise funktsiooni saamiseks vajavad ensüümid aktiveerimist, mida reguleerib TIMP-ide (Joonis 3) kontsentratsioon kultuuris (Ramos-DeSimone jt, 1999). MMP-de aktiivsuse reguleerimiseks posttranslatsioonilisel tasemel on vajalikud neli TIMP-ide hulka kuuluvat MMP-de inhibiitorit (TIMP-1 kuni TIMP-4), mis lisaks reguleerivad ka rakkude kasvu, migratsiooni ja angiogeneesi (Gomis-Ruth jt, 1997). Peale MMP-de inhibeerimise on TIMP-idel veel täiendavaid funktsioone. Latentses vormis olev MMP-2 on võimeline moodustama komplekse TIMP-idega, mis toimivad kui MMP-2 aktivaatorid (Bauvois, 2012). Üldjoones on TIMP-id sünteesitud lahustunud kujul ning ei kinnitu. Erandiks on siinkohal TIMP-3 (Lisa 3), mis on oma ehituselt ja funktsioonilt teistest TIMP-idest erinev ning mida leidub pigem ECM-i valkude külge kinnitunult. Oma struktuurse iseärasuse pärast on TIMP-3 ainuke, millel on võime inhibeerida nii membraanseoselisi kui lahustunud MMP-sid (Shen jt, 2010).



Joonis 3. TIMP-ide 3D struktuur TIMP-2 näitel. TIMP-ide ehitusse kuuluvad katalüütiline (cat), linker, hemopeksiini (Hpx), tüüp II fibronektiini (FNII) ja pro-domään (pro). Modifitseeritud (Nagase jt, 2006).

Regulatoorseid funktsiooni võivad täita ka teised ensüümid. Plasminogeen on proensüüm, mis muutub MMP-de lõikuse tulemusel plasmiiniks. Plasmiin on aga ensüüm, mis indutseerib MMP-de sünteesi tõusu ja nende aktiveerimist (Lee jt, 1996). Plasmiini inhibiitorid, nagu serpiin α_2 -antiplasmiin, on samuti MMP-de sihtmärgid, muutes nad inaktiivseks (Lisa 1) (Lijnen jt, 2001).

1.1.2 Maatriksi metalloproteinaas 2

MMP-2 ehk želatinaas A on želatiini lagundav ensüüm. Latentsena on MMP-2 72 kDa suurune, aktivatsioonijärgselt aga 65 kDa (Bauvois, 2012). Tänu fibronektiini kordustele katalüütilises saidis (Joonis 2) on MMP-2 võimeline kinnituma želatiinile ning degradeerima kollageeni. Lisaks on MMP-2 tähtis ka mitmete teiste ECM-i valkude proteolüüsis, lagundades elastiine ning aktiivseid kasvufaktoreid ja laminiine. (Patterson jt, 2001) MMP-1 lagundab lahuses kollageeni paremini kui MMP-2, kuid tänu rakumembraanil toimuvale proMMP-2 aktiveerimisele on MMP-2 siiski tähtis kollageeni lagundaja rakupinnal. (Nagase jt, 2006).

ProMMP-2 aktiveerimine toimub rakumembraanil MT1-MMP ja TIMP-2 kompleksi abil. TIMP-2 puudumisel ei avalda MT1-MMP proMMP-2-le toimet. TIMP-2 liitumisel kompleksi ei ole MT1-MMP enam võimeline lõikama oma tavapärasest substraati ning muutub proMMP-2 retseptoriks, mis suunab temale kinnitunud proMMP-2 lähedal paikneva funktsionaalse MT1-MMP juurde. Selle tulemusel eemaldatakse proMMP-2 prodomään ja toimub aktiveeritud MMP-2 vabanemine MT1-

MMP/TIMP-2 kompleksist (Will jt, 1996) (Nishida jt, 2008).

Vaatamata sellele, et TIMP-2 on üks MMP-2 aktiveerijatest, käitub ta ka funktsionaalse ensüümi inhibeerijana (Bernardo ja Fridman, 2003). MMP-2 taseme tõustes ECM-is, vabaneb TIMP-2 kompleksist MT1-MMP-ga ning liigub rakupinnalt ECM-i, kus ta inhibeerib MMP-2 funktsiooni. Sellise negatiivse tagasiside käigus langeb proMMP-2 aktivatsioon, mis on tingitud MT1-MMP/TIMP-2 komplekside arvu vähenemisest (Toth jt, 2003).

MMP-2 ja MMP-9 on peamised tüüp IV kollageeni lagundajad, mis on põhiliseks ECM-i struktuurkomponendiks ning selle lagundamine mõjutab vähirakkude invasiivsust (Roomi jt, 2009) sedavõrd, et mittemetastaseeruva ja metastaseeruva kilpnäärmevähi võrdleval uuringul on tuvastatud MMP-2 kõrgeenenud ekspressiooni metastaase moodustavas vähis (Liang jt, 2011). Varasemalt on näidatud seost vähi invasiivsuse ja MMP-2 ning MMP-9 üleekspresseerimise vahel (Roomi jt, 2009).

1.1.3 Maatriksi metalloproteinaas 7

MMP-7 ehk matrilüsiin on seni teadaolevatest MMP-dest kõige väiksem proteinaas, mille molekulmass on latentses faasis 28 kDa, kuid aktiivselt vormilt on N-terminaalsest otsast eemaldatud 9 kDa suurune osa (Ii jt, 2006). MMP-7 on võimeline lagundama mitmeid maatriksi valke, näiteks fibronektiini, elastiini, kollageen IV ja proteoglükaane (Di Girolamo jt, 2001) ning *in vivo* on näidatud tema osalust ka teiste MMP-de lõikamisel (Dozier jt, 2006).

Sarnaselt teistele MMP-dele on MMP-7 sünteesitud proensüümi vormis ning aktiveerub pärast prodomääni eemaldamist. (Ii jt, 2006) Täpne aktivatsiooniprotsess on veel teadmata, kuid on näidatud, et proMMP-7 interakteerub CD151-ga rakumembraanil. CD151 ei oma aga proteolüütilist aktiivsust, mille tõttu ei saa see olla otsene proMMP-7 aktivaator. (Shiomi jt, 2005)

MMP-7 on üleekspresseeritud inimese kasvajates, kus ta on tähtis nii ECM-i valkude lagundamises, kui ka maatriksiväliste valkude aktiveerimises ja lõikamises (Ii jt, 2006). ECM-i valkude lagundamise kaudu aitab MMP-7 otseselt kaasa vähi invasiivsusele, lõhkudes ümbritseva maatriksi struktuurseid üksusi. MMP-7 teiste funktsioonide hulka kuuluvad näiteks proMMP-2 ja proMMP-9 aktiveerimine (Wang jt, 2005) ning e-kaderiini ektodomääni lõikamine. Viimase näite puhul muudab ensümaatiline protsessing e-kaderiini lahustuvaks, mis on seejärel võimeline lõikama membraanset Fas ligandi (FasL) nii normaalsetelt kui ka vähirakkudelt, muutes FasL-i lahustuvaks.

Sellise ahelreaktsiooni tulemusel suunatakse lähedal asuvad rakud apoptoosi (Ii jt, 2006). Erinevalt normaalsetest rakkudest, ei põhjusta FasL apoptoosi naabruses paiknevates vähirakkudes, kuna apoptootiline signaal, mida see ligand lahustunud kujul kannab, on nõrgem membraanse FasL-i poolt tekitatud signaalist. (Holler jt, 2003) (Ii jt, 2006)

1.1.4 Maatriksi metalloproteinaas 9

MMP-9 ehk želatinaas B kuulub koos MMP-2-ga želatinaaside gruppi. Sarnaselt MMP-2-le lagundab ta mõningaid kollageeni alatüüpe ja želatiini, kuid erinevalt MMP-2-st ei ole ta võimeline lagundama tüüp I, II ja III kollageene (Visse ja Nagase, 2003). ProMMP-9 on 92 kDa suurune, pärast aktiveerimist on ensüümi molekulmassiks 82 kDa (Bauvois, 2012).

ProMMP-9 üheks aktivaatoriks on plasmiin, mis lokaliseerub raku pinnal (Visse ja Nagase, 2003). Samas on lahuses võimalik kasutada proMMP-9 aktivaatorina ka MMP-2-te, kuid koekultuurides MMP-2 juuresolekul proMMP-9 proteolüütilist töötlemist ei toimu (Toth jt, 2003). ProMMP-9 aktivatsioon sõltub tema positiivsete ja negatiivsete regulaatorite kontsentratsioonide suhtest. Näiteks, TIMP-1 kontsentratsioon määrab ära selle, kas MMP-3 suudab aktiveerida proMMP-9-t. Samasuguse loogika alusel reguleeritakse seda protsessi ka TIMP-2 ja MMP-2 kaudu. Kui TIMP-2-te ekspresseeritakse võrreldes MT1-MMP-ga oluliselt vähem, siis toimub proMMP-2 aktivatsioon. See omakorda võimaldab proMMP-9 protsessingut ja funktsionaalse vormi teket. Kõrge TIMP-2 kontsentratsiooni puhul MT1-MMP ja MMP2 inhibeeritakse ning proMMP-9 aktivatsiooni ei toimu (Toth jt, 2003).

Aktiivne MMP-9 molekul on struktuurselt ja funktsionaalselt sarnane MMP-2 molekulile. Mõlemad on maatriksi valkude lagundajad ning peamised tüüp IV kollageeni lagundajad. MMP-9 on üks põhilisi pahaloomuliste lümfotsüütide poolt sünteesitavaid MMP-sid, mida kasutatakse kudede remodelleerimiseks (Kamiguti jt, 2004). MMP-9 ekspressioon on oluline ka angiogeneesis, kus ta lagundab ECM-i, tekitades ruumi uue veresoonte süsteemi jaoks (Lee jt, 2002).

1.1.5 Maatriksi metalloproteinaas 14 ehk MT1-MMP

MMP14 ehk membraantüüp 1 maatriksi metalloproteinaas on transmembranne ensüüm, mis on oluline proMMP-2 aktivaator. Struktuurselt on MT1-MMP teiste MMP-dega võrreldes eriline oma transmembraanse ja tsütoplasmaatilise domääni poolest. (Rožanov jt, 2001) Latentsel MT1-MMP molekulmass varieerub erineva türosiin-fosforülatiooni astme tõttu 63-66 kDa piires (Nyalendo jt,

2007) ning aktiivne vorm on 54 kDa suurune (Sato jt, 1994).

MT1-MMP katalüütiline sait moodustab komplekse TIMP-2-ga (Zucker jt, 1998), mis võimaldab tal aktiveerida proMMP-2-te ning proMMP9-t (Toth jt, 2003). Lisaks on ta võimeline aktiveerima ka proMMP-13-t (Knauper jt, 2002). Sõltumata proMMP-2 aktivatsioonist on MT1-MMP võimeline lagundama mitmeid ECM-i valke (Fillmore jt, 2001) nagu näiteks kollageeni. (Lee jt, 2006)

MT1-MMP on seotud ka angiogeneesiga, mille korral toimub tema transkriptsiooniline ülesreguleerimine. Selline regulatsiooni tõus tuleneb sellest, et lisaks ECM-i proteolüüsi kiirendamisele on MT1-MMP seotud veresoonte endoteliaalse kasvufaktori (VEGF ingl *vascular endothelial growth factor*) ekspressiooni ülesreguleerimisega (Oblander jt, 2005).

1.2 Ekstratsellulaarne maatriks

ECM on organismi arengu käigus pidevas muutuses. Remodelleerimine toimub tänu ECM-i komponentide sünteesile või degradatsioonile (Yannas jt, 1989). Rakuvaheaine koostisesse kuuluvad erinevad valgud, näiteks glükoproteiinid ja polüsahhariidid. ECM-i võib jagada basaalmembraaniks ning interstitsiaalseks maatriksiks. Basaalmembraani koostisesse kuuluvad teatud tüüpi kollageenid (kollageen IV) ning laminiinid. Need valgud on basaalmembraani struktuurseteks üksusteks.

1.2.2 Laminiinid ja ekstratsellulaarne maatriks

Laminiinid on basaalmembraanis leiduvad glükoproteiinid, mis käituvad rakkude adhesioonimolekulidena. (Durbeej, 2010) ECM-is täidavad need valgud struktuurset ülesannet, olles rakuvaheaines kollageeni järel ühed sagedasemalt esindatud glükoproteiinid (Aumailley ja Smyth, 1998). Laminiinid on heterotrimeerid, mis koosnevad ühest α -, β - ja γ -ahelast (Beck jt, 1993). Need kolm ahelat paiknevad T- või ristikujulise struktuurina, mis võimaldab neil moodustada võrgustikke, seondades rakke nende membraanil paiknevate retseptorite vahendusel (Durbeej, 2010).

Üheks laialdaselt levinud ahelaks on laminiin $\alpha 5$, mis kuulub laminiin 10-ne (Ln-10) koosseisu. Ln-10 mõjutab rakkude migratsiooni ja adhesiooni ning seda leidub suurel hulgal ECM-is. Varasemates uuringutes on leitud, et MT1-MMP on seotud Ln-10 modifitseerimisega ning seeläbi eesnäärme

vähi invasiivsuse tõstmisega (Bair jt, 2005).

1.2.3 Metalloproteinaasid ja ekstratsellulaarne maatriks

Kuna MMP-d on võimelised lagundama ECM-i struktuurseid valke, siis arvatakse, et MMP-d täidavad tähtsat rolli kudede arengus nende ümberkujundamisel, kasvul ja haava paranemisel. MMP-de üleekspressioon võib endaga kaasa tuua koe kahjustused ja seda on seostatud selliste haigustega nagu artriit, aordianeurüsm ja kasvaja areng. (Shapiro ja Senior, 1999)

Rakud tunnetavad nendest väljaspool asuvat keskkonda läbi interaktsioonide ECM-iga. Kui rakud puutuvad kokku intaktse ECM-iga, käituvad nad loomulikult ning täidavad tavapäraseid funktsioone. Kokkupuutel vigastatud ECM-iga vallanduvad mitmed signaalrajad, mille tulemusena muutub rakkude käitumine (Shapiro ja Senior, 1999). Oma kõrge aktiivsuse tõttu ekspresseeritakse normaalingimustes MMP-sid vähesel hulgal ja nende lokaliseerumine ning aktiivsus on rangelt kontrollitud (Strongin, 2010). MMP-sid kontrollitakse ning vajadusel inhibeeritakse kudedes TIMP-ide abil (Bernardo ja Fridman, 2003). Patogeneesi korral on aga rakkude vahendatud ECM-i reguleerimise protsess häiritud, mistõttu võib süsteem tasakaalust väljuda, võimaldades seega vähkkasvajate teket ja invasiooni.

1.2.4 MMP-de roll vähi arengus ning levikus

Maatriksi metalloproteinaasid lagundavad valikuliselt ekstratsellulaarse maatriksi komponente ja vabastavad ECM-is paiknevaid kasvufaktoreid ja tsütokiine. MMP-d on veel võimelised aktiveerima latentseid kasvufaktoreid ja tsütokiine ning lõikama raku pinnaretseptoreid. Sellise proteolüütilise aktiivsuse tõttu mängivad MMP-d tähtsat rolli invasioonis ning metastaaside tekkes. (Bauvois, 2012)

Rakk-rakk ja rakk-maatriks interaktsioonid on tervetes rakkudes rangelt kontrollitud, vähirakkudes esinevad aga tihti rakkude adhesiooni häired (Bair jt, 2005). Tulenevalt muutustest adhesioonimolekulide ekspressioonis või sekreteeritud MMP-de hulgast, kaasneb vähirakkude võime muuta kuju, eralduda ja saavutada mobiilsus (Griffin jt, 2013). Vähirakkudel on kergem migreeruda kaugettesse aladesse ja moodustada metastaase, kuna adhesioon on häiritud ning MMP-de sekretsiooni tagajärjel toimub ka ECM-i degradatsioon (Bourbouli ja Stetler-Stevenson, 2010). Nii näiteks omab MMP-2 rakumembraanile seostuvaid komponente, mida ta kasutab otseseks adhesiooni mõjutamiseks. Et aga muuta vähirakud mobiilsemaks on vajalik membraantüüpi MMP,

näiteks MT1-MMP, vahendatud kollageeni degradatsioon. (Bourboulia ja Stetler-Stevenson, 2010).

Invasiivsete kasvajate puhul on vähirakkude pinnal kõrgelt ekspresseerunud nii MMP-d kui integriinid, mis on abiks rakk-rakk ja rakk-ECM interaktsioonides. MMP-d interakteeruvad rakkude pinnal olevate integriinidega, mis soodustab kollageeni degradatsiooni ning vähirakkude migratsiooni. (Bourboulia ja Stetler-Stevenson, 2010).

MMP-de abil ECM-i lõikamine on vähirakkudele kasulik, kuna see võimaldab neil vabaneda ECM-i „haardest“ ning migreeruda teistesse kudedesse, kus nad tekitavad metastaase (Frantz jt, 2010). Kuna MMP-d on kasvajarakkudes kõrgelt ekspresseeritud, siis on hakatud neid kasutama ka kui vähimarkereid (Bauvois, 2012).

Kopsu adenokartsinoomi invasiivsuse puhul on eriti tähtsad MMP-2, MMP-7, MMP-9 ning MMP-14 (Lee jt, 2010; Lin jt, 2009). MMP-2 ja MMP-9 käituvad kui peamised ekstratsellulaarse maatriksi struktuurüksuste lagundajad, MMP-7 ja MMP-14 täidavad lisaks lagundamisele ka proMMP-2 ja proMMP-9 aktiveerimise rolli (Wang jt, 2005).

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1 Töö eesmärgid

Käesoleva lõputöö eesmärgiks oli uurida maatriksi metalloproteinaaside ekspressioonimustrit erinevates rakuliinides ning selle mõju rakkude poolt sünteesitud ekstratsellulaarsele maatriksile. Eesmärgi täitmiseks püstitati järgmised uurimisülesanded:

1. Uurida, milliste MMP-de süntees toimub meie poolt valitud rakuliinis.
2. Selgitada välja, milline on meie poolt valitud MMP-de ekspressioon sõltuvalt rakkude konfluentsusest.
3. Kontrollida, kas MMP-de ekspressioonimustri muutus korreleerub ECM-s leiduvate laminiinide proteolüütilise lagundamisega.

2.2 Materjal ja meetodika

2.2.1 Rakud ja nende kultiveerimine

Töös kasutati inimese kopsu adenokartsinoomi rakuliini A549, inimese emakakaelavähi rakuliini HeLa ja koorioni kartsinoomi liini JAR. Rakke kasvatati 10 cm läbimõõduga koekultuuri tassidel. A549 ja HeLa rakkude söötmena kasutati IMDM-i (ingl *Iscove's Modified Dulbecco's Medium*), kuhu oli lisatud 10% veise looteseerumit (FBS, ingl *fetal bovine serum*) ning 100 U/ml penitsilliini ja 100 µg/ml streptomütsiini. JAR rakkude söötmena kasutati aga RPMI (ingl *Roswell Park Memorial Institute*) söödet, millesse oli lisatud eelmainitud söötmega võrdsel kogusel nii FBS-i kui penitsilliini ja streptomütsiini. Rakke kasvatati inkubaatoris temperatuuril 37°C ja kasvukeskkond sisaldas 5% CO₂-te.

Ribonukleiinhappe (RNA, ingl *ribonucleic acid*) eraldamiseks kasvatati rakke kas 70% konfluentsuseni või täieliku konfluentsuse saabumiseni. *Western blot* analüüsi jaoks kasutati rakke, millel lasti pärast konfluentsuse saavutamist tassidel kasvada veel täiendavalt 3 või 7 päeva. Sellisel juhul vahetati söödet iga kahe päeva tagant.

2.2.2 RNA eraldamine

RNA eraldamiseks kasutati *Favorprep RNA Purification Mini Kit*-i (*Favorgen*) lähtudes tootjapoolsetest juhistest. Saadud RNA lahustati 50 µl RNAasi vabas vees ja kontsentratsioon määrati spektrofotomeetriga NanoDrop ND-100 (Thermo Scientific).

2.2.3 cDNA süntees

Enne desoksüribonukleiinhappe (DNA, ingl *deoxyribonucleic acid*) sünteesi ühtlustati RNA kontsentratsioonid ligikaudu 2000 ng/µl. Komplementaarse DNA (cDNA, ingl *complementary DNA*) sünteesiks kasutati *First Strand cDNA Synthesis Kit*-i (*Thermo Scientific*), algmaterjalina kasutati 1 µg totaalset RNA-d ning töö tegemisel lähtuti tootjapoolsetest juhistest. Saadud cDNA-d kasutati otse pöördtranskriptsiooni PCR-is (RT-PCR, ingl *Reverse transcription polymerase chain reaction*).

2.2.4 DNA amplifikatsioon

Polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR, ingl *polymerase chain reaction*) kasutati MMP-de ekspressioonimustri leidmiseks. Kõigi kasutatud praimerite nimetused, järjestused ja seondumistemperatuurid (T_m) on välja toodud Tabelis 1. Iga PCR-i reaktsiooni lahuse lõppmaht oli 20 µl, mis sisaldas 14 µl deioniseeritud vett, 4 µl 5x *FIREPol*® *Mastermix* PCR puhvrit ning 10 µmol mõlemat praimerit. Amplifitseerimiseks kasutati *Applied Biosystem 2720 Thermal Cycler*-it.

PCR-i reaktsioon viidi läbi järgmistel tingimustel:

1. Esmane denaturatsioon 95°C juures 3 minutit.
2. Denaturatsioon 95°C juures 30 sekundit.
3. Praimerite seondumine 60°C juures 30 sekundit. Osadel praimeritel 64°C.
4. Ekstensioon toimus alati 72°C juures, kuid sõltuvalt produkti pikkusest varieerus aeg. Ekstensiooniaja arvutamisel võeti arvesse, et 1 minuti jooksul sünteesitakse 1000 aluspaari.
5. Korrata 2, 3, 4 punkti 30 tsükliks.
6. Lõppekstensioon 72°C juures 5 minutit.
7. Säilidata temperatuuril 4°C.

Tabel 1. Töös kasutatud praimerid.

Nimetus	Tüüp	5' – 3' suunalised järjestused	T _m
MMP-2	<i>Forward</i>	GTGCTGAAGGACACACTAAAGAAGA	64°C
	<i>Reverse</i>	GCATCATCCACTGTCTCTGG	64°C
MMP-7	<i>Forward</i>	CGGATGGTAGCAGTCTAGGG	64°C
	<i>Reverse</i>	TGAATGGATGTTCTGCCTGA	64°C
MMP-9	<i>Forward</i>	CTCGAACTTTGACAGCGACA	63°C
	<i>Reverse</i>	GCCATTCACGTCGTCCTTAT	63°C
MMP-14	<i>Forward</i>	CAGAGAAGGCACACAAACGA	64°C
	<i>Reverse</i>	CACTGGTGAGACAGGCTTGA	64°C
GAPDH	<i>Forward</i>	GAAGGTGAAGGTCGGAGT	60°C
	<i>Reverse</i>	GAAGATGGTGATGGGATTTC	60°C
HRPLP0	<i>Forward</i>	TCGTGGAAGTGACATCGTCT	64°C
	<i>Reverse</i>	TCTGCTCCCACAATGAAACA	64°C

Kõik Tabelis 1 välja toodud MMP-praimerid disainiti spetsiaalselt selle katse jaoks. Võrdse

laadimise kontrollina kasutati GAPDH-d (ingl *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*) ja HRPLP0-i (ingl *human ribosomal protein, large P0*), mis olid varem meie uurimusgrupi poolt spetsiaalselt selleks otstarbeks disainitud.

2.2.5 Geelelektroforees

PCR produkte kontrolliti geelelektroforeesil. PCR-produktide lahutamiseks kasutati 2%-list agarosgeeli TAE (40 mM Tris-atsetaat, 1 mM EDTA) puhvril. DNA visualiseerimiseks lisati geeli etiidiumbromiidi (EtBr), mille lõppkontsentratsioon oli 0,01 µg/µl. EtBr kujutab endast nukleiinhapete aluspaaride vahele seonduvat UV-lainepikkusel fluorestseeruvat ainet, mis võimaldab geelil lahutatud PCR-fragmente UV-laua abil visualiseerida. DNA fragmentide pikkuse kindlaks tegemiseks kasutati markerit (*50 bp/1kb DNA Ladder, Thermo Scientific*).

2.2.6 Valkude ekspressiooni analüüs *Western blot* meetodil

2.2.6.1 Maatriksi lüsaat

Maatriksi ja rakulüsaat eraldati kultuuri kolmest erinevast kasvustaadiumist. Konfluentsuse saabudes, 3-ndal või 7-ndal päeval pärast täieliku konfluentsuse saabumist eemaldati rakkudest sööde ning pesti kolm korda külma PBS-iga (ingl *phosphate buffered saline*). Rakkude eemaldamiseks tassilt lisati PBS-ga pestud rakkudele 3 ml külma EDTA-d ning nende vabanedes substraadilt suspendeeriti PBS-is. Seejärel tõsteti rakud pipetiga tassilt ümber jääle olemasolevasse 50 ml tuubi. Seda protsessi korrati seni, kuni tassile jäi minimaalselt rakke. Kogutud rakud tsentrifugeeriti 50 ml tuubis (990 rpm, 5 minutit, 4°C), eemaldati supernatant ning suspendeeriti PBS-is. Kogu protseduur toimus jääle.

Eemaldatud rakkudega tase sai seejärel edasi kasutada ECM-i kogumiseks. Maatriksi eraldamiseks eemaldati pipeti abil tassidelt kogu EDTA lahus ning lisati 500 µl maatriksi lüüsipuhvrit [50 mmol Tris-HCl pH 7,5, 2% SDS-i (ingl *sodium dodecyl sulfate*)]. Pärast lüüsipuhvri lisamist viidi läbi mehaaniline maatriksi eraldamine tassilt kummispaatli abil. Seda protsessi korrati kümne järjestikuse 10 cm läbimõõduga Petri tassi peal. Saadud maatriksi lüsaat (ligikaudu 300 – 400 µl) hoiustati -20°C juures.

2.2.6.2 Rakulüsaat

Pärast maatriksi lüsaadi kogumise protseduuri jätkati tööd eelmises sammus jääle asetatud rakkudega. Rakud tsentrifugeeriti taas maha (990 rpm, 5 minutit, 4 °C), eemaldati supernatant ning suspendeeriti PBS-is. Seda protsessi korrati kolm korda. Järgnevalt aspireeriti rakkudelt supernatant ning lisati 6 ml lüüsi puhvrit [50 mM Tris-HCl pH 8, 1% Triton-X 100, PMSF (ingl *phenylmethylsulfonyl fluoride*)]. Seejärel inkubeeriti rakke lüüsumise eesmärgil jääl 45 minutit. Kolmveerand tunni möödumisel tõsteti 1 ml kaupa lüsaati Eppendorf'i tuubidesse ning tsentrifugeeriti (13 200 rpm, 10 minutit, 4°C). Tsentrifugeeritud supernatant kanti uude tuubi ning hoiustati -20°C juures.

2.2.6.3 Western blot

Maatriksi ja rakulüsaatidele lisati 6x SDS-i proovipuhvrit (0,125 M Tris-HCl pH 6,8, 4% SDS, 20% glütserool, 10% β-merkaptopetaanool, 0,004% broomfenoolsinine) ja seejärel kuumutati segu valkude denatureerimiseks 5 minutit 100°C juures.

Valkude lahutamiseks kasutati geelelektroforeesi, mille tarbeks valmistati 5% SDS-polüakrüülamiidgel 1x SDS-i jooksupuhvris (25 mM Tris, 192 mM glütsiin, 0,1% SDS). Proov kanti geelile ühte suurde hambasse ning molekulmasside võrdluseks kasutati 300 kDa markerit. Valkude lahutamiseks 100 V pinge juures kulus ligikaudu 3 tundi. Peale elektroforeesi inkubeeriti geeli ja eelnevalt metanoolis niisutatud PVDF (ingl *polyvinylidene difluoride*) filtrit (*Millipore ImmobilonTM*) ülekandepuhvris (48 mM Tris, 39 mM glütsiin, 0,0375% SDS, 20% metanool) 5 minutit. Valkude ülekande toimus 20 V pinge juures tund aega märgülekande masinas (*Cleaver Scientific*). Ülekande järel lõigati membraan 5 mm laiusteks ribadeks ning membraanfiltrit lõike blokeeriti tund aega 5% lõssipulbrilahuses (5% lõssipulber, 1x PBS, 0,05% Tween 20).

Peale blokeerimist inkubeeriti membraanlõike loksutil tund aega primaarse antikehaga, seejärel pesti filtrit 3x 15 minutit pesulahusega (0,05% Tween 1x PBS-is) ning järgnevalt toimus inkubeerimine sekundaarse antikehaga. Kõik antikehade lahjendused valmistati 5% lõssipulbrilahuses ja inkubeeriti 1 tund toatemperatuuril. Primaarse antikehaga kasutati laminiini α5 (4B5, hiire monoklonaalne antikeha, S. Ingerpuu ja E. Juronen) kontsentratsiooniga 5 µg/ml. Negatiivseks kontrolliks oli hiire IgG vastane antikeha (*Monosan*). Sekundaarse antikehaga kasutati mädarõika peroksüdaasiga (HRP, ingl *horseradish peroxidase*) konjugeeritud kitses valmistatud hiire IgG vastast antikeha (suhtes 1 : 100 000; *PerkinElmer*). Peale sekundaarse antikehaga

inkubeerimist pesti filtrit nii nagu eelnevalt kirjeldatud. Kogu protseduur viidi läbi toatemperatuuril.

Signaali visualiseerimiseks kasutati *chemiluminescent HRP Substrate* komplekti, millega töötati vastavalt tootja poolt pakutud protokollile (*ImmobilonTM Western, Millipore*). Filtrit inkubeeriti reaktsiooniseguga 5 minutit toatemperatuuril. Membraanilõikudelt eralduv valgus eksponeeriti pimikus valgustundlikule filmile (*Fuji*).

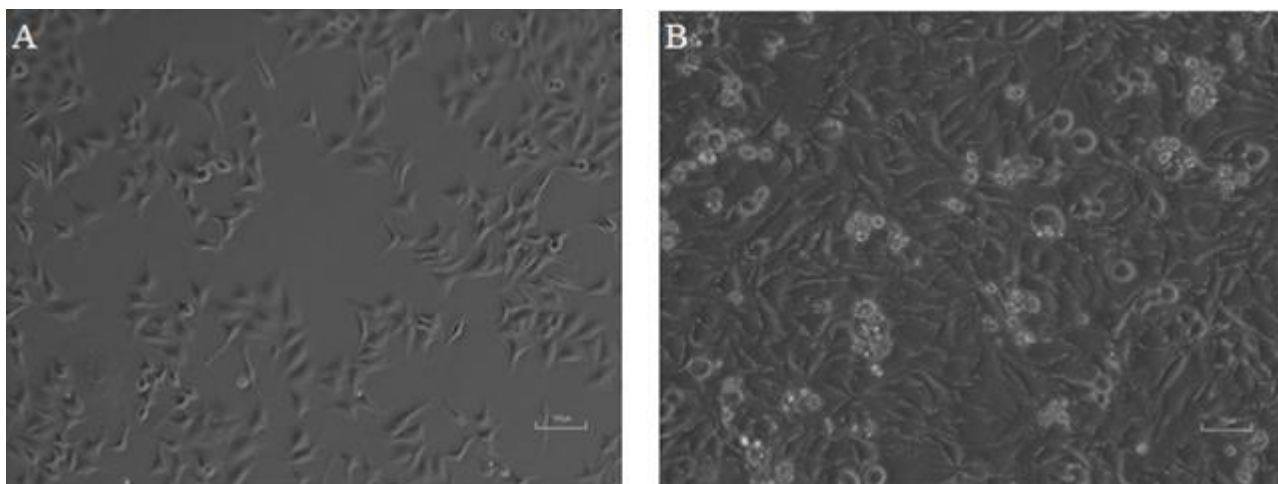
2.3 Töö tulemused

2.3.1 Variatsioonid erinevate rakuliinide MMP-de regulatsioonis

Käesolevas töös uuriti MMP-de ekspressiooni cDNA põhjal, kasutades matriitsina huvialustest rakukultuuridest (A549, HeLa, JAR) eraldatud RNA-d.

2.3.1.1 A549 rakuliinis leiduvate MMP-de ekspressiooni analüüs

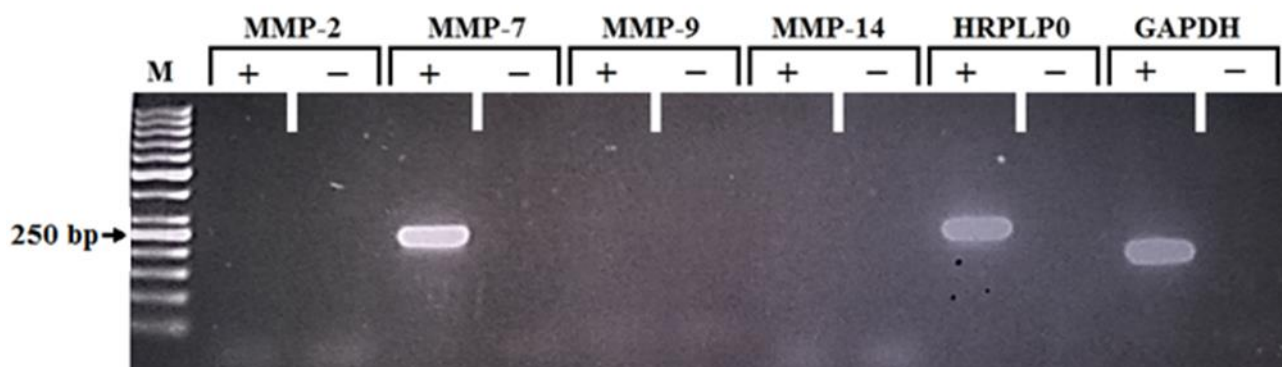
Antud töös valiti üheks uuritavaks rakuliiniks A549 rakud. Selleks, et jälgida kõnealustele rakkudele iseloomulikku geeniekspressiooni erineva tihedusega kultuuris, lasti rakkudel kasvada 60%-lise konfluentsuseni (nn hõre kultuur) või kasvatati rakke veel kuni täieliku konfluentsuse saabumiseni (nn tihe kultuur). Erineva tihedusega rakkude väliste tunnuste hindamiseks vaadeldi ning pildistati kultuure valgusmikroskoobi all. Saadud tulemustest on näha hõreda ja tiheda kultuuri puhul rakkude morfoloogilist muutust (Joonis 5). 60% konfluentsusega kultuuri rakud on piisava ruumi olemasolul ennast pikemaks venitanud (Joonis 5, A), samas kui tiheda kultuuri puhul oli märgata vaba ruumi puudumisest tingitud rakukuhilate või mitmekihilisuse teket, mistõttu olid rakud tihedalt üksteise vastu pressitud (Joonis 5, B), kaotades hõredale kultuurile iseloomuliku väärtja kinnitumise substraadile.



Joonis 5. Rakkude konfluentsuste võrdlus. Kõikidest rakuliinidest kasvatati kaks erineva konfluentsusega populatsiooni. Paneelidelt A ja B on näha vastavalt 60% tihedusega ja konfluentseid populatsioone. Mõõtkava 100 µm.

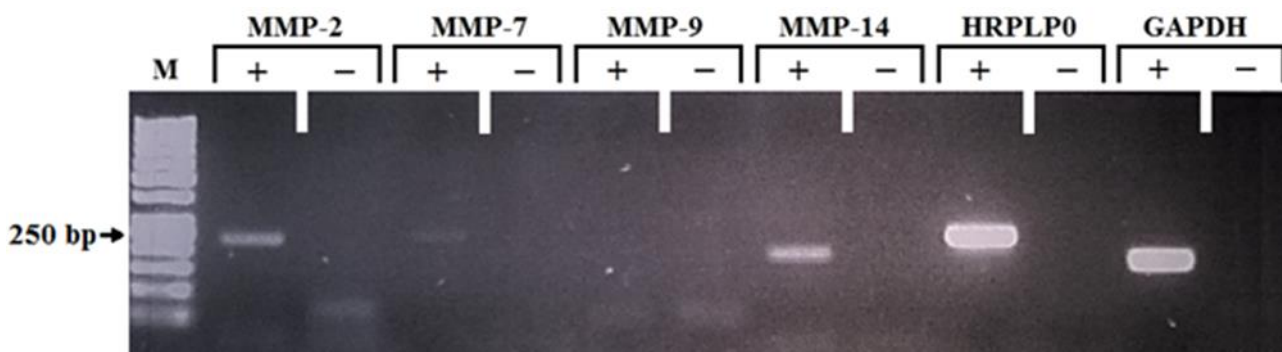
Erineva tihedusega rakkude kasvatamise eesmärgiks ei olnud niivõrd analüüsida rakkude välispidiseid tunnuseid, vaid uurida rakkude geeniekspressiooni mustrite oletatavat erinevust. Et hinnata, milliseid metalloproteinaase ühe või teise konfluentsusega A549 liini rakud sünteesivad, teostati cDNA sünteesi põhine ekspressioonianalüüs. See uuring andis kinnitust, et erinevate konfluentsustega rakkude proovides on erinev MMP-de ekspressioonimuster (Joonised 6 ja 7).

Tulemused näitasid, et mittekongruentsete rakkude kultuurid ei sünteesinud suure ECM-i degradeeriva toimega kollagenaase (MMP-2 ja MMP-9) ega ka vastavaid aktivaatoreid (MMP-14). Ainus ekspresseeritav proteinaas oli MMP-7 (Joonis 6).



Joonis 6. Hõredalt kasvanud A549 rakkude MMP-de ekspressioon. Näha vaid MMP-7 ekspressiooni.

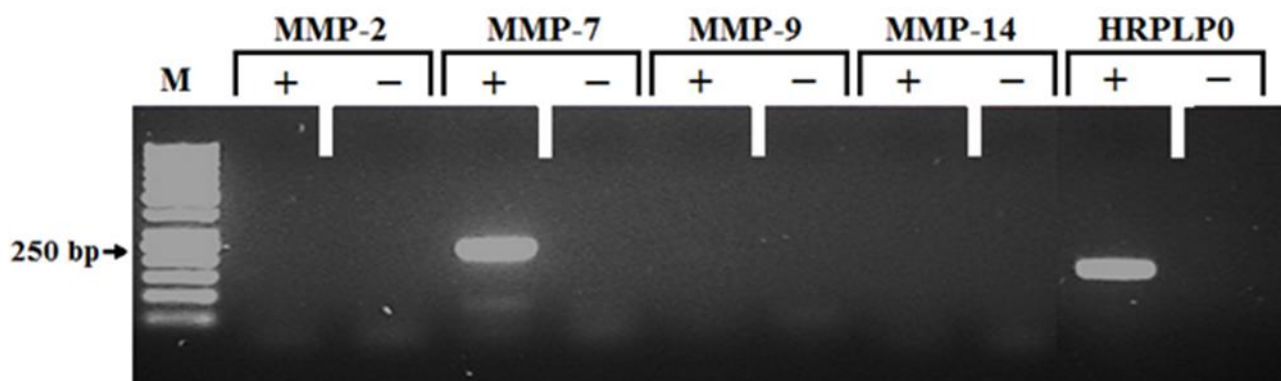
Tiheda kultuuri puhul oli näha MMP-2 ja MMP-14 ekspressiooni, kuid MMP-7 tase oli võrreldes mittekongruentsete rakkudega oluliselt langenud (Joonis 6 ja 7). Mustri õigsust kontrolliti kolmel järjestikusel korduskatsel, mille käigus kasvatati uued A549 rakud ning vaadeldi samu meetodeid kasutades nende geeniekspressiooni. Seega uuringu tulemustest selgus, et erineva kongruentsusega A549 kultuuride geeniekspressiooni muster on märgatavalt erinev. Uuringuplaani täitmise eesmärgil teostati samasugused analüüsid ka teiste töös kasutatud rakuliinide puhul.



Joonis 7. Tihedalt kasvanud A549 rakkude MMP-de ekspressioon. On näha MMP-2 ja MMP-14 ekspressiooni.

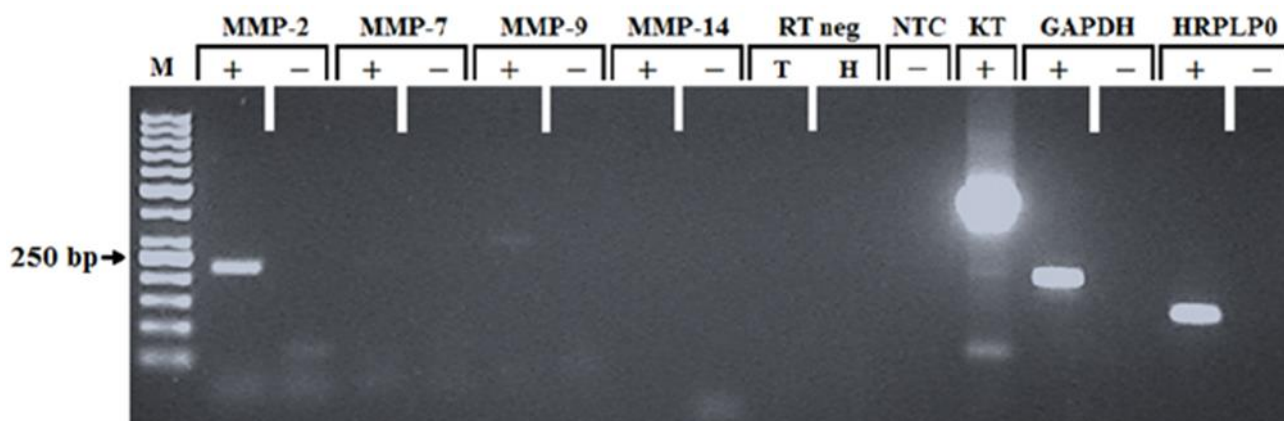
2.3.1.2 HeLa rakuliinis leiduvate MMP-de ekspressiooni analüüs

Järgmisena uuriti HeLa rakke, mida käsitleti samal moel kui A549 rakke. Hõredate HeLa rakkude ekspressioon oli sarnane hõredalt kasvanud A549 rakkudega, ekspresseerides vaid MMP-7-t (Joonis 8). Rakkude morfoloogilisi erinevuseid antud rakuliini puhul ei võrreldud, kuna see ei olnud käesolevas uurimustöös primaarse tähtsusega.



Joonis 8. Hõredalt kasvanud HeLa rakkude MMP ekspressioon. Pildil on näha MMP-7 ekspressiooni (Pildilt redigeeritud tühi ala).

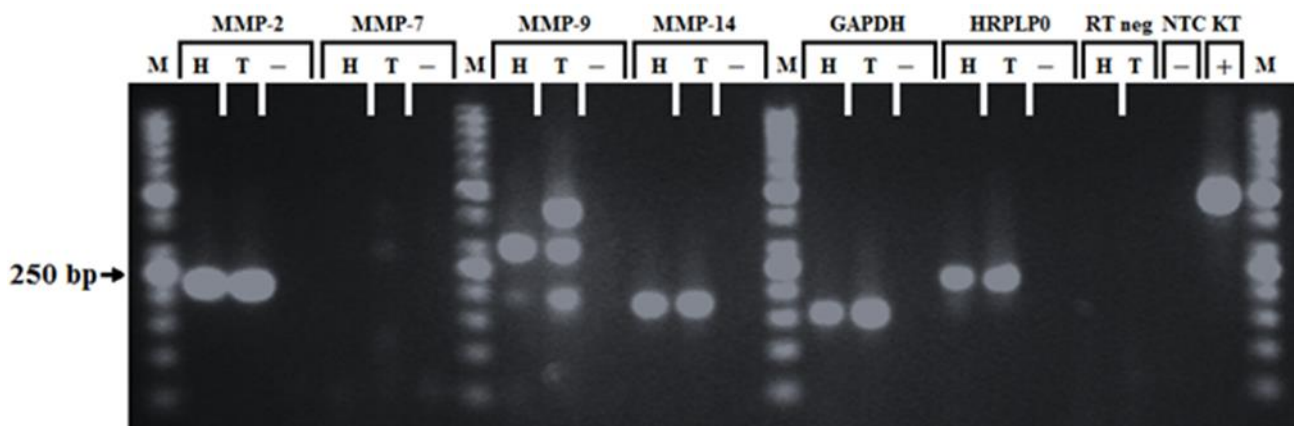
Katsed tiheda rakukultuuriga näitasid, et HeLa rakud ekspresseerisid MMP-2-te. Erinevalt A549 rakkudest ei toimunud aga MMP-14 ekspressiooni ning vähesel määral oli näha hoopis MMP-9 ekspressioon (Joonis 9).



Joonis 9. Tihedalt kasvanud HeLa rakkude MMP ekspressioon. Paistab välja MMP-2 ja õrnalt ka MMP-9 ekspressioon. RT-neg – pöördtranskriptaasita kontroll. NTC (ingl *no template control*) – DNA vaba proov. KT – positiivne kontroll.

2.3.1.3 JAR rakuliinis leiduvate MMP-de ekspressiooni analüüs

Koorioni kartsinoomi rakkude (JAR) MMP-de ekspressiooni muster erines nii A549 kui HeLa rakuliini omast (Joonised 6-10). Nimelt ei ekspresseerinud JAR rakud MMP-7 ensüümi madala konfluentsuse juures ning ka tiheda kultuuri puhul kindlat signaali olemasolu väita ei saa (Joonis 10). RT-PCR-i tulemustest lähtudes tuli omapärase omadusena välja see, et ekspressioonimuster ei erine hõredate ja tihedate populatsioonide vahel (Joonis 10). Ka selle rakuliini puhul morfoloogilisi andmeid ei jäädvustatud.



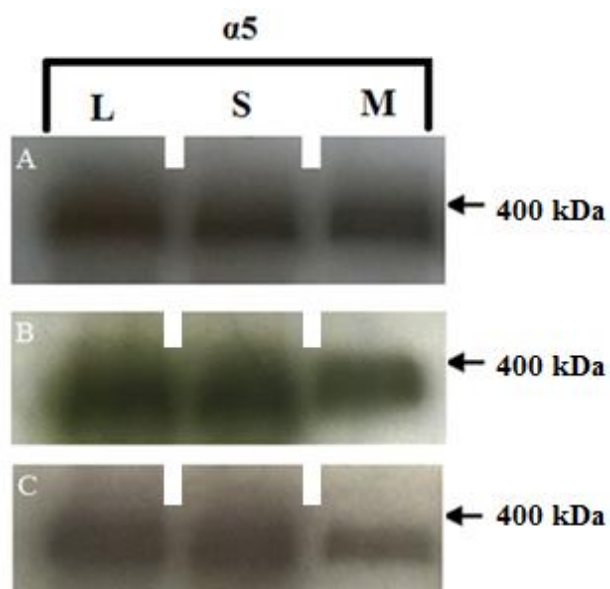
Joonis 10 JAR rakkude MMP ekspressioon. H- hõredalt kasvanud rakud; T – tihedalt kasvanud rakud. RT-neg – pöördtranskriptaasita kontroll. NTC – DNA vaba proov. KT – positiivne kontroll.

2.3.2 Laminiini ahelate proteolüütiline lõikamine konfluentsete A549 rakkude ECM-s.

Kontrollimaks, kas A549 rakuliini MMP-de ekspressioonimustri muutus korreleerub ECM-is leiduva Ln-10 proteolüütilise lagundamisega, teostati *Western blot* analüüs. Antud uuringus võrreldi laminiin α 5-e terviklikkust kolmes erinevas rakupopulatsioonis: A, B ja C.

Populatsioon A koosnes äsja konfluentsuse saavutanud rakkudest ning iseloomustavas hõredalt kasvanud rakke. Populatsioonidest B ja C korjati proovimaterjal vastavalt 3 ja 7 päeva järgselt pärast konfluentsuse saabumist ning iseloomustasid tihedalt kasvanud rakkude keskkonda. Võrreldi proove, mis olid eraldatud ECM-ist, rakulüsaadist ning rakulüsaadist koos sademega.

Western blot analüüsi tulemusel ei täheldatud laminiin α 5-e suhtes proteolüütilist aktiivsust sõltumata tihedusest (Joonis 11). Katset korrati kolm korda.



Joonis 11. Western blot analüüsi tulemused. A – konfluentsuse saavutanud populatsioon. B – 3 päeva konfluentselt kasvanud populatsioon. C – 7 päeva konfluentselt kasvanud populatsioon. L – rakulüsaadist eraldatud proov. S – rakulüsaadist koos sademega eraldatud proov. M – ECM-ist eraldatud proov. Laminiin $\alpha 5$ ensümaatilist lõikamist ei tuvastatud.

2.4 Töö arutelu

Vähkkasvajate arengumehhanismide mõistmiseks on tähtis tunda nende geeniekspressiooni omapärasusi erinevates arengu staadiumites, mis võiksid põhjustada invasiivsuse tõusu. Üheks võimaluseks on maatriksi metalloproteinaaside (MMP-de) regulatsiooni uurimine, mis on vähkkasvajates tihti üleekspressioonunud, olles seega potentsiaalne vähiteraapia märklaud. Kuna kasvajakud käituvad erisugustes keskkonnatingimustes erinevalt, siis antud bakalaureusetöö ühe hüpoteesi kohaselt võiks leida seaduspärasusi ka MMP-de ekspressioonimustris. Üheks MMP-de uurimisvaldkonnaks võivad olla nende arvukad interaktsioonid nii ECM-i kui erineva populatsioonitihedusega rakkudega. Mitmete vähkkasvajate puhul on näidatud teatud MMP-de üleekspressiooni (Scorilas jt, 2001), mis võib tingida vähirakkude invasiivsuse kasvu ning kiirendada kasvaja arengut (Roomi jt, 2009).

Varasemates uurimustööde on näidatud, et ECM-i remodelleerimise kaudu aitavad MMP-d kaasa osade vähkkasvajate metastaseerumisele (Zeng jt, 1999). See võimaldab vähirakkudel vabaneda kollageeni ja laminiini haardest ning liikuda oma algsest asukohast organismi vereringesse. Sealt omakorda toimub levik uude asukohta ning tekib metastaas (Koshikawa jt, 2000). Seda arvestades võib eeldada, et konfluentseks kasvanud kultuuri mudelis on MMP-de ekspresseerimise eesmärgiks võimaldada tihedalt koos kasvavatel kasvajakududel vabaneda ECM-i haardest ja migreeruda neile paremate kasvutingimustega aladele.

Käesoleva töö raames loodud MMP uurimismudel näitas, et erinevates vähi arengustaadiumides võivad sünteesitud proteinaaside kombinatsioonid olla erinevad. Vaatamata sellele, et MMP-de funktsioonid võivad suures osas olla samad, uuriti töö käigus ensüüme mille ülesannetes oli varem kirjeldatud varieeruvust (Pozzi jt, 2000) (Sun ja Hemler, 2001). cDNA-põhise analüüsiga sai kinnitust, et hõredates vähkkasvaja rakukultuurides on enamik testitud MMP-sid vaigistatud. A549 ja HeLa hõredate rakukultuuride puhul oli detekteeritav MMP-7 ekspressioon, kuid samasuguse konfluentsusega JAR rakkude kultuur näitas mõnevõrra laialdasemat spetsiifikat, ekspresseerides nii MMP-2, -9 kui ka -14. Samas MMP-7 ekspressiooni JAR rakkude puhul ei täheldatud. Kuna JAR rakud on küllaltki agressiivse iseloomuga, siis just see võikski põhjendada nende rakkude laiemat MMP-de ekspressioonipaneeli, sünteesides enamikke testitud MMP-sid juba populatsiooni hõredas staadiumis.

Põhjused, miks on A549 ja HeLa hõreda populatsioonidega kultuurides ekspresseeritud just MMP-7 on veel selgusetud. MMP-7 roll on organismis lisaks ECM-i degradeerimisele ka ECM-i mitte

kuuluvate valkude degradeerimine, vähendades organismis rakkude adhesiooni e-kaderiini degradeerides ning tekitades apoptootilist FasL-i lahustuvat ligandi (Ii jt, 2006). Samas hõredate kultuuride puhul ruumi puuduse probleemi ei tohiks esineda. MMP-7 ekspressioon viitab sellele, et kasvajarakkudel on juba varases kasvustaadiumis võime ekspansiivseks kasvuks. Sellise mehhanismis abil on võimalik kasvajarakkudel vähendada teiste lähedal asuvate mitte-kasvajarakkude adhesiooni, võimaldades vähirakkudel asuda nende kohale. Kuna tegemist on siiski kasvaja rakuliinidega, siis on täiesti arvestatav võimalus, et vähirakkudele iseloomulik ebakorrapära väljendubki kasvaja algfaasis just MMP-7 ekspressioonis, mis võiks seega täiendava kinnituse saamisel olla potentsiaalne marker varase vähkkasvaja tuvastamisel.

Tihedate kultuuride puhul oli märgata aga MMP-7 ekspressiooni selget langust (A549) või täielikku puudumist (HeLa ja JAR). Selline ilming võib olla seletatav asjaoluga, et lisaks ECM-i degradeerivale omadusele on MMP-7 võimeline põhjustama ka normaalrakkude apoptoosi FasL ligandi lõikamise abil (Holler jt, 2003). Seega üheks hüpoteesiks MMP-7 ekspressiooni langusele tihedates kultuurides võib olla see, et kui rakud on juba väga tihedalt kokku kasvanud, siis ei ole teiste rakkude eemale tõrjumine piisavalt efektiivne, vaid on vaja kasvajarakkude kuhjumise tõttu võimaldada neil migreeruda. Seetõttu väheneb vajadus MMP-7 järele ning tõuseb nõudlus MMP-2, MMP-9 ja MMP-14 järele, mis suuremal hulgal kollageeni ja laminiini lagundavad. Selline MMP-de ekspressioonimustri muutus võiks väljenduda laminiin $\alpha 5$ degradatsioonis, mis praegustele teadmistele tuginedes võiks aidata kaasa kasvajarakkude migratsioonile ning metastaseerumisele, kuid uurimustöö käigus teostatud *Western blot* tulemused seda ei peegeldanud.

MMP-2 ja MMP-9 on rakkude ümber võrgustiku moodustanud kollageeni ja laminiini degradeerijate rollis, tekitades seeläbi kasvajarakkudel võimaluse basaalmembraanist eralduda (Patterson jt, 2001). MMP-14 käitub nii lagundaja, kui aktivaatorina MMP-2 jaoks (Toth jt, 2003). Tihedates A549 ja JAR kultuurides olid ekspresseeritud nii MMP-2, kui ka tema aktivaator MMP-14. Üllatava omadusena tuli välja see, et tiheda HeLa rakukultuuri puhul oli märgata küll MMP-2 ekspressiooni, kuid MMP-14 signaali ei tuvastatud. MMP-9 ekspressioon oli detekteeritav vaid JAR erineva tihedusega kultuurides, mida võiks jällegi seletada antud rakuliini tunduvalt agressiivsemate omadustega.

Eelnevast lähtudes võib A549 ja HeLa rakkude puhul MMP-de ekspressioonimustri muutuse võimalikuks põhjuseks olla see, et ECM-i koguneb populatsiooni kasvamise käigus aina juurde, ületades kriitilise punkti ning põhjustades vastavat maatriksi komponenti lagundavate proteinaaside sünteesile ümberlülitumist. JAR rakukultuuri hõredate ja tihedate populatsioonide ekspressiooni

erinevuse puudumist võib põhjendada nende rakkudele iseloomuliku agressiivsusega ning sellest tulenevate spetsiifiliste omadustega. Erinevalt A549 ja HeLa rakkudest on JAR rakud võimelised sünteesima suuremal hulgal ekstratsellulaarset maatriksit. Seega võib eeldada, et erinevuse metalloproteiinide ekspressioonis võib põhjustada mitte niivõrd rakupopulatsiooni konfluentsus vaid hoopis ECM-i tihedus. JAR rakud on aktiivsed ECM-i sünteesijad, seega on kriitiline punkt juba populatsiooni varajases kasvustaadiumis saavutatud ning ei olnud ka ekspressiooni ümberlülitumist märgata.

Kokkuvõttes on käesoleva uurimustöö käigus saanud kinnitust hüpotees, et MMP-de ekspressioonimuster varieerub vähiliinide erinevates arengustaadiumides ning seda reguleerib keskkonnast tulev stiimul – oletatavasti rakkude tihedusest põhjustatud kõrge ECM-i tase. Lisaks varustas käesolev uurimustöö meid töötava uurimismudeli alusega, mille täiendamisega saaks luua MMP-de ja vähi invasiivsuse uuringuteks sobiva süsteemi.

KOKKUVÕTE

Maatriksi metalloproteinaasid on keerulise regulatsioonisüsteemiga ensüümid, mille muutused võivad mõjutada inimese tervist ja kaasa aidata kasvaja metastaseerumisele ning arengule. See muudab nad väga tähtsateks uurimusobjektideks vähiarengus ning potentsiaalselt võib neid kunagi kasutada teatud kasvajate diagnoosimise puhul markeritena või toota nendele vastavaid inhibiitoreid. Kahjuks MMP aktiivsuse mõõtmiseks kliinilistes tingimustes aga vahendid puuduvad või on alles arendamisel, mistõttu ei ole võimalik teraapiaid kasutusele võtta.

Käesoleva töö eesmärgiks oligi astuda sammu lähemale potentsiaalsele teraapiavõimalusele, luues aluse lihtsale *in vitro* mudelile MMP-de ekspressiooni uurimiseks.

Eesmärgi saavutamiseks vaatlesime me kolme erinevat rakuliini, mis erinesid ekstratsellulaarse maatriksi sünteesi hulga poolest. Madalama ECM-i sünteesiga olid A549 ja HeLa rakuliinid ning tugevamaga oli JAR rakuliin. Erinevate MMP-de ekspressiooni ümberlülitumist uuriti rakupopulatsioonide konfluentsust varieerides, eraldades seejärel neist RNA ning viies läbi RT-PCR ja geelelektroforees mustrite nähtavaks muutmiseks.

Tulemustest oli võimalik eristada kahte erinevat ekspressioonimustrit. Esimene, mis esines madalama ECM-i sünteesiga rakkude puhul, kujutas endas hõreda populatsiooni korral MMP-7 ekspressiooni. Rakukultuuri konfluentsuse saabudes toimus aga muutus ekspressioonimustris ning MMP-7 asendus MMP-2-ga. Omakorda jagunesid A549 ja HeLa populatsioonide mustrid omakorda nii, et A549 puhul ekspresseerus lisaks MMP-14 aga HeLa rakkude puhul MMP-9.

Teine ekspressioonimuster esines JAR rakkude puhul ning millel puudus esimene etapp ehk MMP-de ekspressioon ei erinenud oluliselt hõredate ja tihedate populatsioonide vahel. Selle võis põhjustada tihe ECM, milleni on esimese mustri korral jõutud alles rakukultuuri konfluentsuse saabudes.

Kokkuvõttes leiti käesoleva töö käigus, et erinevate vähiliinide maatriksi metalloproteinaaside ekspressioon sõltub rakkude konfluentsusest ning mingil määral toimub ka ekstratsellulaarse maatriksi lagundamine. Töö järgmises etapis oleks vajalik uurida kas MMP-de ekspressioon *in vitro* on reguleeritud vaid ECM-i tiheduse poolest või siiski rakkude konfluentsusest. Vaadelda ka ekspressioonimustrit teiste rakuliinide ning MMP-de puhul ja vaadelda nende inhibiitorite ekspressiooni regulatsiooni.

The regulation of matrix metalloproteinase expression in lung adenocarcinoma cells.

Juri Juksar

RESUME

Matrix metalloproteinases are enzymes with a complex regulatory network, the changes of which can affect our health. They play a key role in degrading the extracellular matrix, angiogenesis and wound healing. They also play a role in cancer progression, causing invasive and metastatic properties. Thus, efforts should be made to develop ways of measuring MMP activity and provide critical information on the regulation of their expression.

The aim of this research was to create the basis for a small *in vitro* model for researching MMP expression.

To achieve this goal we studied three different cell lines, which exhibited different levels of ECM synthesis. Two of the cell lines, which exhibited lower levels of ECM synthesis, were A549 and HeLa cells. The JAR cell line had a high level of ECM synthesis. The changes in MMP expression were observed through purifying the RNA from cells that were grown at different densities. After which the RNA was used to synthesise cDNA and later used in RT-PCR. The results were visualized through gel electrophoresis.

The results showed two different expression patterns. The first pattern was observed in cells with lower levels of ECM synthesis, where MMP-7 was expressed in populations with low density. As the cells became confluent the expression changed and MMP-7 was replaced by MMP-2. A549 cells also started to express MMP-14 and the HeLa cells expressed MMP-9.

A different pattern was observed in JAR cells, where there was no difference in the expression of MMPs between cells grown at low density and to confluency cells. A possible explanation would be the high levels of ECM synthesis in JAR cells. The modulation of the MMP expression pattern by the amount of the ECM would also explain the expression switch in cells with a lower level of ECM.

TÄNUSÕNAD

Eelkõige tänaksin oma juhendajat Viljar Jaksi, kellel jätkus aega ja kannatlikkust minuga tegeleda. Lisaks tänaks ka laborikollektiivi, kelle abi ja suunitlused aitasid oluliselt katsete läbiviimisel kaasa. Viimasena tänaks ka Sulev Ingerpuud, kellelt sai alati asjakohast nõu.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Aumailley, M. ja Smyth, N. (1998). The role of laminins in basement membrane function. *J Anat.* **193 (Pt 1)**: 1-21.
- Bair, E. L., Chen, M. L., McDaniel, K., Sekiguchi, K., Cress, A. E., Nagle, R. B. ja Bowden, G. T. (2005). Membrane type 1 matrix metalloprotease cleaves laminin-10 and promotes prostate cancer cell migration. *Neoplasia.* **7**: 380-9.
- Baker, A. H., Edwards, D. R. ja Murphy, G. (2002). Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci.* **115**: 3719-27.
- Baldwin, E. T., Bhat, T. N., Gulnik, S., Hosur, M. V., Sowder, R. C., 2nd, Cachau, R. E., Collins, J., Silva, A. M. ja Erickson, J. W. (1993). Crystal structures of native and inhibited forms of human cathepsin D: implications for lysosomal targeting and drug design. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**: 6796-800.
- Barrett, A. J. (1994). Classification of peptidases. *Methods Enzymol.* **244**: 1-15.
- Bauvois, B. (2012). New facets of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 as cell surface transducers: outside-in signaling and relationship to tumor progression. *Biochim Biophys Acta.* **1825**: 29-36.
- Beck, K., Dixon, T. W., Engel, J. ja Parry, D. A. (1993). Ionic interactions in the coiled-coil domain of laminin determine the specificity of chain assembly. *J Mol Biol.* **231**: 311-23.
- Bergers, G., Brekken, R., McMahon, G., Vu, T. H., Itoh, T., Tamaki, K., Tanzawa, K., Thorpe, P., Itohara, S., Werb, Z. ja Hanahan, D. (2000). Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol.* **2**: 737-44.
- Bernardo, M. M. ja Fridman, R. (2003). TIMP-2 (tissue inhibitor of metalloproteinase-2) regulates MMP-2 (matrix metalloproteinase-2) activity in the extracellular environment after pro-MMP-2 activation by MT1 (membrane type 1)-MMP. *Biochem J.* **374**: 739-45.
- Bourboulia, D. ja Stetler-Stevenson, W. G. (2010). Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion. *Semin Cancer Biol.* **20**: 161-8.
- Di Girolamo, N., Coroneo, M. T. ja Wakefield, D. (2001). Active matrilysin (MMP-7) in human pterygia: potential role in angiogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **42**: 1963-8.
- Dozier, S., Escobar, G. P. ja Lindsey, M. L. (2006). Matrix metalloproteinase (MMP)-7 activates MMP-8 but not MMP-13. *Med Chem.* **2**: 523-6.
- Dufour, A., Sampson, N. S., Zucker, S. ja Cao, J. (2008). Role of the hemopexin domain of matrix metalloproteinases in cell migration. *J Cell Physiol.* **217**: 643-51.
- Durbeej, M. (2010). Laminins. *Cell Tissue Res.* **339**: 259-68.
- Fillmore, H. L., VanMeter, T. E. ja Broaddus, W. C. (2001). Membrane-type matrix metalloproteinases (MT-MMPs): expression and function during glioma invasion. *J Neurooncol.* **53**: 187-202.
- Frantz, C., Stewart, K. M. ja Weaver, V. M. (2010). The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci.* **123**: 4195-200.
- Fukasawa, K. M., Hata, T., Ono, Y. ja Hirose, J. (2011). Metal preferences of zinc-binding motif on metalloproteases. *J Amino Acids.* **2011**: 574816.
- Gaire, M., Magbanua, Z., McDonnell, S., McNeil, L., Lovett, D. H. ja Matrisian, L. M. (1994). Structure and expression of the human gene for the matrix metalloproteinase matrilysin. *J Biol Chem.* **269**: 2032-40.
- Gomis-Ruth, F. X., Maskos, K., Betz, M., Bergner, A., Huber, R., Suzuki, K., Yoshida, N., Nagase, H., Brew, K., Bourenkov, G. P., Bartunik, H. ja Bode, W. (1997). Mechanism of inhibition of the human matrix metalloproteinase stromelysin-1 by TIMP-1. *Nature.* **389**: 77-81.
- Griffin, J. R., Wriston, C. C., Peters, M. S. ja Lehman, J. S. (2013). Decreased expression of intercellular adhesion molecules in acantholytic squamous cell carcinoma compared

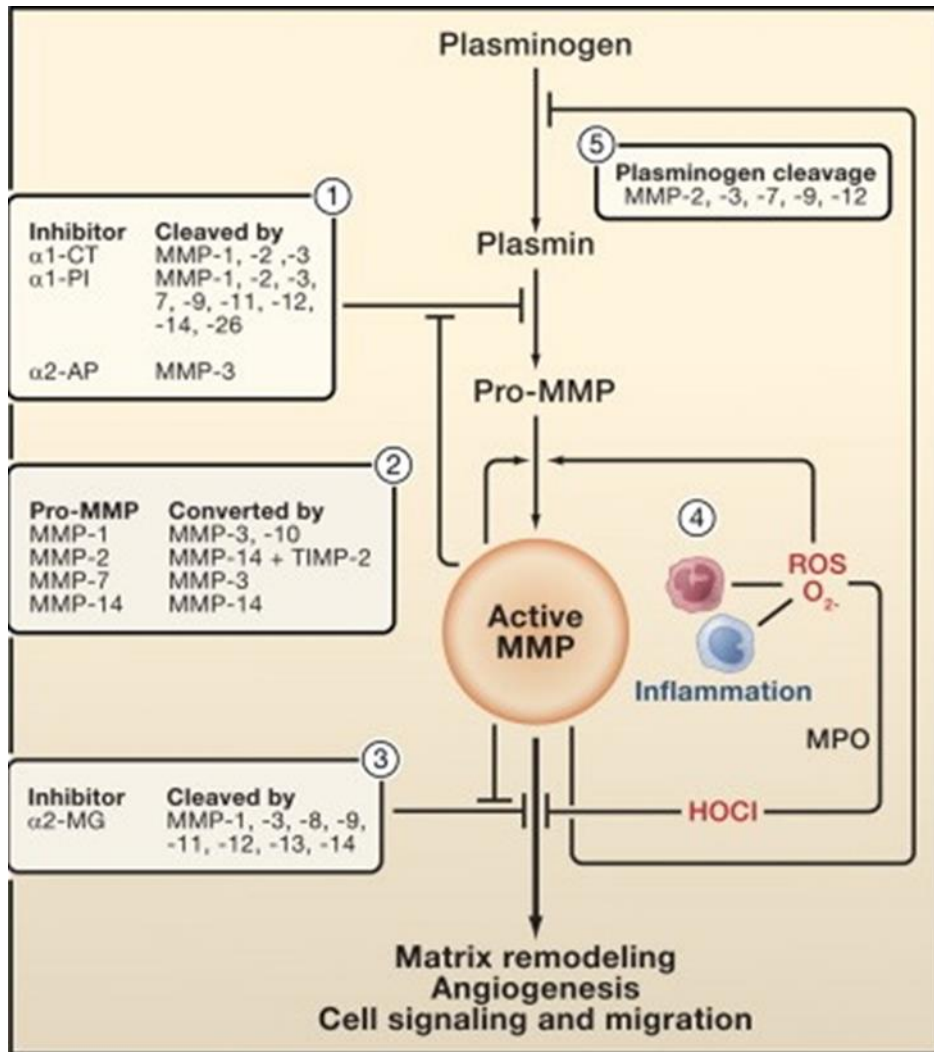
- with invasive well-differentiated squamous cell carcinoma of the skin. *Am J Clin Pathol.* **139**: 442-7.
- Gross, J. ja Lapiere, C. M. (1962). Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **48**: 1014-22.
- Hayman, E. G., Pierschbacher, M. D., Suzuki, S. ja Ruoslahti, E. (1985). Vitronectin--a major cell attachment-promoting protein in fetal bovine serum. *Exp Cell Res.* **160**: 245-58.
- Hedstrom, L. (2002). Serine protease mechanism and specificity. *Chem Rev.* **102**: 4501-24.
- Holler, N., Tardivel, A., Kovacsovics-Bankowski, M., Hertig, S., Gaide, O., Martinon, F., Tinel, A., Deperthes, D., Calderara, S., Schulthess, T., Engel, J., Schneider, P. ja Tschopp, J. (2003). Two adjacent trimeric Fas ligands are required for Fas signaling and formation of a death-inducing signaling complex. *Mol Cell Biol.* **23**: 1428-40.
- Ii, M., Yamamoto, H., Adachi, Y., Maruyama, Y. ja Shinomura, Y. (2006). Role of matrix metalloproteinase-7 (matrilysin) in human cancer invasion, apoptosis, growth, and angiogenesis. *Exp Biol Med (Maywood).* **231**: 20-7.
- Kamiguti, A. S., Lee, E. S., Till, K. J., Harris, R. J., Glenn, M. A., Lin, K., Chen, H. J., Zuzel, M. ja Cawley, J. C. (2004). The role of matrix metalloproteinase 9 in the pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol.* **125**: 128-40.
- Karthikeyan, V. J., Lane, D. A., Beevers, D. G., Lip, G. Y. ja Blann, A. D. (2013). Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in hypertension-related pregnancy complications. *J Hum Hypertens.* **27**: 72-8.
- Kessenbrock, K., Plaks, V. ja Werb, Z. (2010). Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell.* **141**: 52-67.
- Knauper, V., Bailey, L., Worley, J. R., Soloway, P., Patterson, M. L. ja Murphy, G. (2002). Cellular activation of proMMP-13 by MT1-MMP depends on the C-terminal domain of MMP-13. *FEBS Lett.* **532**: 127-30.
- Koshikawa, N., Giannelli, G., Cirulli, V., Miyazaki, K. ja Quaranta, V. (2000). Role of cell surface metalloprotease MT1-MMP in epithelial cell migration over laminin-5. *J Cell Biol.* **148**: 615-24.
- Kumar, S. (2007). Caspase function in programmed cell death. *Cell Death Differ.* **14**: 32-43.
- Lee, E., Vaughan, D. E., Parikh, S. H., Grodzinsky, A. J., Libby, P., Lark, M. W. ja Lee, R. T. (1996). Regulation of matrix metalloproteinases and plasminogen activator inhibitor-1 synthesis by plasminogen in cultured human vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* **78**: 44-9.
- Lee, H., Overall, C. M., McCulloch, C. A. ja Sodek, J. (2006). A critical role for the membrane-type 1 matrix metalloproteinase in collagen phagocytosis. *Mol Biol Cell.* **17**: 4812-26.
- Lee, H. R. ja Choi, K. C. (2013). 4-tert-Octylphenol stimulates the expression of cathepsins in human breast cancer cells and xenografted breast tumors of a mouse model via an estrogen receptor-mediated signaling pathway. *Toxicology.* **304**: 13-20.
- Lee, S., Zheng, M., Kim, B. ja Rouse, B. T. (2002). Role of matrix metalloproteinase-9 in angiogenesis caused by ocular infection with herpes simplex virus. *J Clin Invest.* **110**: 1105-11.
- Lee, Y. C., Lin, H. H., Hsu, C. H., Wang, C. J., Chiang, T. A. ja Chen, J. H. (2010). Inhibitory effects of andrographolide on migration and invasion in human non-small cell lung cancer A549 cells via down-regulation of PI3K/Akt signaling pathway. *Eur J Pharmacol.* **632**: 23-32.
- Liang, H., Zhong, Y., Luo, Z., Huang, Y., Lin, H., Zhan, S., Xie, K. ja Li, Q. Q. (2011). Diagnostic value of 16 cellular tumor markers for metastatic thyroid cancer: an immunohistochemical study. *Anticancer Res.* **31**: 3433-40.
- Lijnen, H. R., Van Hoef, B. ja Collen, D. (2001). Inactivation of the serpin α 2-antiplasmin by stromelysin-1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology.* **1547**: 206-213.
- Lin, S. S., Lai, K. C., Hsu, S. C., Yang, J. S., Kuo, C. L., Lin, J. P., Ma, Y. S., Wu, C. C. ja Chung, J.

- G. (2009). Curcumin inhibits the migration and invasion of human A549 lung cancer cells through the inhibition of matrix metalloproteinase-2 and -9 and Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). *Cancer Lett.* **285**: 127-33.
- Massova, I., Kotra, L. P., Fridman, R. ja Mobashery, S. (1998). Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification. *FASEB J.* **12**: 1075-95.
- Monea, S., Lehti, K., Keski-Oja, J. ja Mignatti, P. (2002). Plasmin activates pro-matrix metalloproteinase-2 with a membrane-type 1 matrix metalloproteinase-dependent mechanism. *J Cell Physiol.* **192**: 160-70.
- Murby, M., Uhlen, M. ja Stahl, S. (1996). Upstream strategies to minimize proteolytic degradation upon recombinant production in Escherichia coli. *Protein Expr Purif.* **7**: 129-36.
- Murphy, G., Nguyen, Q., Cockett, M. I., Atkinson, S. J., Allan, J. A., Knight, C. G., Willenbrock, F. ja Docherty, A. J. (1994). Assessment of the role of the fibronectin-like domain of gelatinase A by analysis of a deletion mutant. *J Biol Chem.* **269**: 6632-6.
- Nagase, H., Visse, R. ja Murphy, G. (2006). Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res.* **69**: 562-73.
- Nishida, Y., Miyamori, H., Thompson, E. W., Takino, T., Endo, Y. ja Sato, H. (2008). Activation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) by membrane type 1 matrix metalloproteinase through an artificial receptor for proMMP-2 generates active MMP-2. *Cancer Res.* **68**: 9096-104.
- Nyalendo, C., Michaud, M., Beaulieu, E., Roghi, C., Murphy, G., Gingras, D. ja Beliveau, R. (2007). Src-dependent phosphorylation of membrane type I matrix metalloproteinase on cytoplasmic tyrosine 573: role in endothelial and tumor cell migration. *J Biol Chem.* **282**: 15690-9.
- Oblander, S. A., Zhou, Z., Galvez, B. G., Starcher, B., Shannon, J. M., Durbeej, M., Arroyo, A. G., Tryggvason, K. ja Apte, S. S. (2005). Distinctive functions of membrane type 1 matrix-metalloprotease (MT1-MMP or MMP-14) in lung and submandibular gland development are independent of its role in pro-MMP-2 activation. *Dev Biol.* **277**: 255-69.
- Pallen, M. J. ja Wren, B. W. (1997). The HtrA family of serine proteases. *Mol Microbiol.* **26**: 209-21.
- Patterson, M. L., Atkinson, S. J., Knauper, V. ja Murphy, G. (2001). Specific collagenolysis by gelatinase A, MMP-2, is determined by the hemopexin domain and not the fibronectin-like domain. *FEBS Lett.* **503**: 158-62.
- Pilcher, B. K., Dumin, J. A., Sudbeck, B. D., Krane, S. M., Welgus, H. G. ja Parks, W. C. (1997). The activity of collagenase-1 is required for keratinocyte migration on a type I collagen matrix. *J Cell Biol.* **137**: 1445-57.
- Pozzi, A., Moberg, P. E., Miles, L. A., Wagner, S., Soloway, P. ja Gardner, H. A. (2000). Elevated matrix metalloprotease and angiostatin levels in integrin alpha 1 knockout mice cause reduced tumor vascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**: 2202-7.
- Quan, J., Zhou, C., Johnson, N. W., Francis, G., Dahlstrom, J. E. ja Gao, J. (2012). Molecular pathways involved in crosstalk between cancer cells, osteoblasts and osteoclasts in the invasion of bone by oral squamous cell carcinoma. *Pathology.* **44**: 221-7.
- Ramos-DeSimone, N., Hahn-Dantona, E., Siple, J., Nagase, H., French, D. L. ja Quigley, J. P. (1999). Activation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) via a converging plasmin/stromelysin-1 cascade enhances tumor cell invasion. *J Biol Chem.* **274**: 13066-76.
- Roomi, M. W., Monterrey, J. C., Kalinovsky, T., Rath, M. ja Niedzwiecki, A. (2009). Patterns of MMP-2 and MMP-9 expression in human cancer cell lines. *Oncol Rep.* **21**: 1323-33.
- Rozanov, D. V., Deryugina, E. I., Ratnikov, B. I., Monosov, E. Z., Marchenko, G. N., Quigley, J. P. ja Strongin, A. Y. (2001). Mutation analysis of membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP). The role of the cytoplasmic tail Cys(574), the active site Glu(240), and furin cleavage motifs in oligomerization, processing, and self-

- proteolysis of MT1-MMP expressed in breast carcinoma cells. *J Biol Chem.* **276**: 25705-14.
- Sang, Q. X. (1998). Complex role of matrix metalloproteinases in angiogenesis. *Cell Res.* **8**: 171-7.
- Sato, H., Takino, T., Okada, Y., Cao, J., Shinagawa, A., Yamamoto, E. ja Seiki, M. (1994). A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature.* **370**: 61-5.
- Scorilas, A., Karameris, A., Arnogiannaki, N., Ardavanis, A., Bassilopoulos, P., Trangas, T. ja Talieri, M. (2001). Overexpression of matrix-metalloproteinase-9 in human breast cancer: a potential favourable indicator in node-negative patients. *Br J Cancer.* **84**: 1488-96.
- Shapiro, S. D. ja Senior, R. M. (1999). Matrix metalloproteinases. Matrix degradation and more. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **20**: 1100-2.
- Shen, Y., Winkler, I. G., Barbier, V., Sims, N. A., Hendy, J. ja Levesque, J. P. (2010). Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (TIMP-3) regulates hematopoiesis and bone formation in vivo. *PLoS One.* **5**.
- Shiomi, T., Inoki, I., Kataoka, F., Ohtsuka, T., Hashimoto, G., Nemori, R. ja Okada, Y. (2005). Pericellular activation of proMMP-7 (promatrilysin-1) through interaction with CD151. *Lab Invest.* **85**: 1489-506.
- Sim, R. B. ja Laich, A. (2000). Serine proteases of the complement system. *Biochem Soc Trans.* **28**: 545-50.
- Soh, U. J., Dores, M. R., Chen, B. ja Trejo, J. (2010). Signal transduction by protease-activated receptors. *Br J Pharmacol.* **160**: 191-203.
- Stevens, L. J. ja Page-McCaw, A. (2012). A secreted MMP is required for reepithelialization during wound healing. *Mol Biol Cell.* **23**: 1068-79.
- Strongin, A. Y. (2010). Proteolytic and non-proteolytic roles of membrane type-1 matrix metalloproteinase in malignancy. *Biochim Biophys Acta.* **1803**: 133-41.
- Strongin, A. Y., Collier, I., Bannikov, G., Marmer, B. L., Grant, G. A. ja Goldberg, G. I. (1995). Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. *J Biol Chem.* **270**: 5331-8.
- Sun, J. ja Hemler, M. E. (2001). Regulation of MMP-1 and MMP-2 production through CD147/extracellular matrix metalloproteinase inducer interactions. *Cancer Res.* **61**: 2276-81.
- Zeng, Z. S., Cohen, A. M. ja Guillem, J. G. (1999). Loss of basement membrane type IV collagen is associated with increased expression of metalloproteinases 2 and 9 (MMP-2 and MMP-9) during human colorectal tumorigenesis. *Carcinogenesis.* **20**: 749-55.
- Zucker, S., Drews, M., Conner, C., Foda, H. D., DeClerck, Y. A., Langley, K. E., Bahou, W. F., Docherty, A. J. ja Cao, J. (1998). Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) binds to the catalytic domain of the cell surface receptor, membrane type 1-matrix metalloproteinase 1 (MT1-MMP). *J Biol Chem.* **273**: 1216-22.
- Toth, M., Chvyrkova, I., Bernardo, M. M., Hernandez-Barrantes, S. ja Fridman, R. (2003). Pro-MMP-9 activation by the MT1-MMP/MMP-2 axis and MMP-3: role of TIMP-2 and plasma membranes. *Biochem Biophys Res Commun.* **308**: 386-95.
- Wang, F. Q., So, J., Reierstad, S. ja Fishman, D. A. (2005). Matrilysin (MMP-7) promotes invasion of ovarian cancer cells by activation of progelatinase. *Int J Cancer.* **114**: 19-31.
- Veidal, S. S., Larsen, D. V., Chen, X., Sun, S., Zheng, Q., Bay-Jensen, A. C., Leeming, D. J., Nawrocki, A., Larsen, M. R., Schett, G. ja Karsdal, M. A. (2012). MMP mediated type V collagen degradation (C5M) is elevated in ankylosing spondylitis. *Clin Biochem.* **45**: 541-6.
- Verma, R. P. ja Hansch, C. (2007). Matrix metalloproteinases (MMPs): chemical-biological functions and (Q)SARs. *Bioorg Med Chem.* **15**: 2223-68.
- Wetmore, D. R. ja Hardman, K. D. (1996). Roles of the propeptide and metal ions in the folding and stability of the catalytic domain of stromelysin (matrix metalloproteinase 3). *Biochemistry.* **35**: 6549-58.

- Will, H., Atkinson, S. J., Butler, G. S., Smith, B. ja Murphy, G. (1996). The soluble catalytic domain of membrane type 1 matrix metalloproteinase cleaves the propeptide of progelatinase A and initiates autoproteolytic activation. Regulation by TIMP-2 and TIMP-3. *J Biol Chem.* **271**: 17119-23.
- Visse, R. ja Nagase, H. (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res.* **92**: 827-39.
- Woessner, J. F., Jr. (1962). Catabolism of collagen and non-collagen protein in the rat uterus during post-partum involution. *Biochem J.* **83**: 304-14.
- Yannas, I. V., Lee, E., Orgill, D. P., Skrabut, E. M. ja Murphy, G. F. (1989). Synthesis and characterization of a model extracellular matrix that induces partial regeneration of adult mammalian skin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **86**: 933-7.

LISA 1. MMP-de aktivatsioonitsükkel. Joonisel on näidatud proMMP-de aktivatsiooni võimalused aktiivsete MMP-de ja plasmiini poolt ning aktiivsete MMP-de mõju inhibiitoritele ja zümogeenidele (Kessenbrock jt, 2010).



LISA 2. Sekreteeritavaid MMP-sid saab struktuuri järgi jaotada veel viieks grupiks: minimaal-domäänsed MMP-d, PEX-domääni sisaldavad MMP-d, želatiiniga seonduvad MMP-d, furiini poolt aktiveeritud sekreteeritud MMP-d ning vitronektiiniliku inserdiga MMP-d. Lisaks on tabelis esindatud ka membraanseoselised MMP-d (Karthikeyan jt, 2013)

Group	MMP species	Chromosome location	Relative molecular mass (kDa) proform-active
Collagenases	1, 8, 13	11q21, 11q22	55 to 72-45 to 66
Gelatinases	2, 9 ^a	16q13, 20q11-q13.1	72 to 92-66 to 86
Stromelysins	3, 10, 11, 19 ^b	11q23, 11q22.3-q23, 22q11.2, 12q14	57-44.5
Matrilysins ^c	7, 26	11q21-q22, 11p15	28-19
MTs ^d	14, 15, 16, 17, 24, 25	14q11-q12, 15q13-q21, 8q21	57 to 72-50 to 56
Others	12, 20, 22, 23, 28 ^e	Diverse	28 to 57-19 to 53

Abbreviations: MMP, matrix metalloproteinase; MT, membrane types; TIMP, tissue inhibitors of metalloproteinase.

^a MMP9 also acts on 'self-activates' (acting on pro-MMP9) and on pro-MMP-2.

^b MMP10 also acts on pro-MMPs 1, 8 and 10.

^c Characterised by lack of a haemopexin domain.

^d MMPs 14, 15, 16 and 24 (MT 1-3 and 5, respectively) are transmembrane, and MMPs 17 and 25 (MT 4 and 6) are anchored to glycosylphosphatidylinositol.

^e Also known as macrophage elastase or metalloelastase.

Substrates for all groups generically are collagens I, II, III, IV, V, VII, VIII, X, XI and XIV, aggrecan, gelatin, fibronectin, laminin and proteoglycan, although there is considerable intra- and intergroup specificities, for example, MMPs 1 and 2 have many substrates, MMPs 17 and 24, and act only on fibrin and gelatin, whereas MMP11 does not cleave collagen. Full substrate specificities of some are as yet unknown. Data pooled from references.^{13, 21, 101, 102, 103, 104}

LISA 3. Üldinfo TIMP-ide kohta (Baker jt, 2002).

	TIMP-1	TIMP-2	TIMP-3	TIMP-4
Protein kDa	28	21	24/27	22
N-glycosylation sites	2	0	1	0
Protein localization	Soluble	Soluble/cell surface	ECM	Soluble/cell surface
Pro-MMP association	pro-MMP-9	pro-MMP-2	pro-MMP-2/-9	pro-MMP-2
MMPs poorly inhibited	MT1-MMP	None	None	None
	MT2-MMP			
	MT3-MMP			
	MT5-MMP			
	MMP-19			
ADAM inhibition	ADAM 10	None	ADAM 12	None
			ADAM 17	
			ADAM 19	
			(ADAM 10)	
			ADAMTS-4, TS-5	
Cell proliferation	↑Erythroid precursors	↑Erythroid precursors	↑Smooth muscle cells and cancer cells	↑Mammary tumour cells
	↑Tumour cells	↑Tumour cells		↓Wilm's tumour cells
		↑Fibroblasts		
		↑Smooth muscle cells		
		↓Endothelial cells		
Apoptosis	↓Burkitt's lymphoma cells	↑Colorectal cancer cells	↑Smooth muscle cells	↑Cardiac fibroblasts
		↓Melanoma	↑Tumour cells	
			↑Retinal pigmented epithelial cells	
Tumour angiogenesis	↑Mammary	↓Melanoma	↓Melanoma	
	↓Liver	↓Mammary		
Angiogenesis in 3D collagen/fibrin gels	No effect	Inhibits	Inhibits	Inhibits
Tumourigenesis effects	Inhibits	Inhibits	Inhibits	Inhibits
Metastasis effects	Stimulates			Stimulates

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina Juri Juksar

(sünnikuupäev: 19.11.1990)

1. Annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose “**Rakkude kasvutihedus maatriksi metalloproteinaaside ekspressiooni reguleeriva faktorina**”, mille juhendajad on Viljar Jaks (PhD) ja Denis Belitškin (MSc),

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 01.07.2016 kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

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

Tartus, 26.05.2014