

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

Kadri Pajo

**Prolüülendopeptidaasi roll neuronaalsete rakkude adhesioonimolekulide häirunud
ekspressioonis ja selle analüüsi metoodikate hindamine neuroblastoomi SH-SY5Y
rakuliinis**

Bakalaureusetöö

Juhendajad Dr. Med Külli Jaako

PhD Mariliis Klaas

TARTU 2015

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	6
1.1 Aju plastilisus ja rakkude adhesioon	6
1.1.2 Sünaptilised raku adhesioonimolekulid.....	6
1.2 Neuraalne raku adhesioonimolekul	7
1.2.1 NCAMi isovormid.....	7
1.2.2 NCAM-EC.....	8
1.2.3 PSA-NCAM	9
1.2.4 PSA-NCAMi paiknemine ja funktsioon.....	9
1.3 Aju plastilisuse häired neuropsühhiaatriliste häirete korral ja neuronaalsete adhesioonimolekulide roll nende tekkes.....	10
1.3.1 Skisofreenia	10
1.3.2 Depressioon	11
1.4 Maatriksi metalloproteinaasid	12
1.4.1 MMPd närvisüsteemi füsioloogilistes ja patoloogilistes protsessides.....	12
1.4.2 MMP-9 aktivatsioon ja struktuur.....	13
1.4.3 MMP-9 roll neuropatoloogiate kujunemisel.....	15
1.5 Prolüülendopeptidaas.....	15
1.5.1 PREPi roll ajus füsioloogilistes ja patoloogilistes tingimustes	16
2. EKSPERIMENTAALOSA	18
2.1 Töö eesmärgid	18
2.2 Materjal ja meetodika.....	18
2.2.1 SH-SY5Y neuroblastoomi rakuliin	18
2.2.2 Kasutatud antikehad	19

2.2.3 SDS-PAGE ja <i>Western blot</i>	19
2.2.4 Immunotsütökeemia	20
2.2.5 <i>In situ</i> sümograafia	21
2.2.6 Transfektsioon	21
2.2.7 Transfektsioon lipofektamiiniga.....	21
2.2.8 Elektroporatsioon	22
2.2.9 Andmete analüüs	22
2.3 Tulemused ja arutelu	23
2.3.1 Valgutasemete võrdlus <i>wt</i> ja PREP ü/e rakkudel	23
2.3.2 Želatinolüüs <i>wt</i> ja PREP ü/e rakkudel	25
2.3.3 PREPi taseme maha surumine transfektsiooni meetoditega.....	27
2.3.4 Tähtsus ja võimalikud edasised uurimissuunad.....	30
KOKKUVÕTE	32
SUMMARY	34
TÄNUAVALDUSED.....	35
KIRJANDUSE LOETELU.....	36
KASUTATUD VEEBIAADRESSID	47
LIHTLITSENTS.....	48

KASUTATUD LÜHENDID

AVP – arginiin-vasopressiin (ingl. k *arginine vasopressin*)

CAM – raku adhesioonimolekul (ingl. k *cell adhesion molecule*)

DAPI - 4',6-diamidino-2-fenüülindool (ingl. k *4',6-diamidino-2-phenylindole*)

GPI – glükosüülfosfatidüül inositool

IgSF – immunoglobuliini superperekond (ingl. k *immunoglobulin superfamily*)

MMP – maatriksi metalloproteinaas (ingl. k *matrix metalloproteinase*)

NCAM – neuraalne raku adhesioonimolekul (ingl. k *neural cell adhesion molecule*)

NCAM-EC – rakuväline lahustuv NCAM (ingl. k *extracellular neural cell adhesion molecule*)

PBS – fosfaatpuhvri lahus (ingl. k *phosphate buffered saline*)

PREP – prolüüendopeptidaas (ingl. k *prolyl endopeptidase*)

PSA – polüsiaalhape (ingl. k *polysialic acid*)

PST – polüsialüültransferaas

RVM – rakuväline maatriks

SDS-PAGE – naatrium-dodetsüülsulfaat polüakrüülamiid geelelektroforees (ingl. k *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*)

SEM – standardviga (ingl. k *standard error of the mean*)

shRNA – ingl. k *small hairpin RNA*

SP – substants P

STX – sialüültransferaas X

SynCAM – sünaptiline raku adhesioonimolekul (ingl. k *synaptic cell adhesion molecule*)

TBST – *Tris-buffered saline with Tween* (puhverlahus)

TIMP – metalloproteinaasi koeinhibiitor (ingl. k *tissue inhibitor of metalloproteinase*)

TRH – türotropiini vabastav hormoon (ingl. k *tyrotropin-releasing hormone*)

ü/e – üleekspressioon

wt – metsiktüüp (ingl. k *wild-type*)

SISSEJUHATUS

Aju plastilisust võib käsitleda kui aju võimet kohaneda sise- ja väliskeskkonnast tulevatele signaalidele, mis on vajalik närvisüsteemi toimimise pidevaks tagamiseks. Plastilisuse seisukohast on oluline närvirakkude ja rakuvälise keskkonna vahelised seosed, mis paljuski väljenduvad läbi adhesioonimolekulide toime. Neuropsühhiaatriliste haiguste patoloogiat uurides on täheldatud mitmete adhesioonimolekulide ajalis-ruumilises ja kvantitatiivses ekspressioonis häireid, mida on peetud nende haiguste mõningate sümptomite põhjuseks. Üheks enimuuritud adhesioonimolekuliks on neuraalne raku adhesioonimolekul (NCAM) ja selle polüsialüleeritud vorm (PSA-NCAM). NCAM ja PSA-NCAM omavad olulist rolli meeolelu ja kognitiivsete võimete regulatsioonis ning nende häirumist on näidatud mitmete neuropsühhiaatriliste ja neurodegeneratiivsete haiguste korral. Mainitud seisundite kujunemisel on oluline roll neuropõletikul, selle korral vabanevatel põletikumediaatoritel ning proteolüütilistel ensüümidel, mille aberrantne tegevus võib olla võtmetähtsusega patoloogia süvenemisel.

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks on uurida patoloogiliste seisundite korral liigselt vabaneva prolüülendopeptidaasi (PREP) rolli aju plastilisust reguleerivate neuronaalsete adhesioonimolekulide ekspressioonihäirete ühe võimaliku tekitajana. Töö viidi läbi PREPi üleekspressioonival (PREP ü/e) neuroblastoomi SH-SY5Y rakuliinil, et tuvastada võimalikud seosed PREPi ja maatriksi metalloproteinaas-9 aktivatsiooni või ekspressiooni suurenemise vahel. Töö teiseks eesmärgiks oli teha kindlaks, kas PREPi ekspressiooni mahasurumine transfektsiooni meetodil taastab normaalsetele rakkudele omase fenotüübi – see viitaks PREPile kui ühele võimalikule sihtmärgile plastilisusega seotud neuropsühhiaatriliste häirete ravis.

Töö eksperimentaalne osa teostati Tartu Ülikooli Arstiteaduskonna Bio- ja siirdemeditsiini instituudi farmakoloogia osakonnas. Käesolev bakalaureusetöö on osa teadusprojektist „Neuronaalsed raku adhesioonimolekulid kui potentsiaalsed terapeutilised sihtmärgid aju plastilisuse häirete korral“ (IUT 2-3).

Märksõnad: neuraalne raku adhesioonimolekul, polüsialüleeritud neuraalne raku adhesioonimolekul, maatriksi metalloproteinaas-9, prolüülendopeptidaas, aju plastilisus.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Aju plastilisus ja rakkude adhesioon

1.1.1 Aju plastilisuse vormid

Närvisüsteem on selle moodustumise hetkest kuni kõrge eani pidevas muutumises, mis on tingitud arvukatest füsioloogilistest ja psühholoogilistest impulssidest. Nii neurogenees, sünaptoogenees, kui sünapsite tugevnemist ja nõrgenemist tähistav sünaptiline plastilisus on sündmused, mille kaudu väljendub närvikoe plastilisus ehk võime muuta oma struktuuri ja funktsiooni vastusena organismisestele ja keskkonnast tulevatele signaalidele. Stiimuleid, mis ajus plastilisi reaktsioone esile kutsuvad, võib tinglikult jagada neljaks. Neist ulatuslikum on arenguline plastilisus, mis on valdavaks embrüonaal- ja lapseas (ülevaade Yin ja Yuan, 2015). Kuna iga ajuregioon omab kindlat rolli, on kirjeldatud ka aktiivsusest sõltuvat kompensatoorset plastilisust, mis esineb näiteks ühe meele kaotamisele järgneva vastava ajupiirkonna ümber lülitumisel teise meele töötlemiseks (ülevaade Lazzouni ja Lepore, 2014). Õppimise ja mälu seotud plastilisus toetub eelmisega osaliselt sarnastele mehhanismidele. Nendeks on molekulaarsete ja elektrofüsioloogiliste sündmuste poolt põhjustatud järkjärgulised muutused sünaptilises tugevuses ja morfoloogias. Teatud piirini on võimalik ka kahjustusele järgnev kahjustatud piirkonna taastamine neuraalsete tüvirakkude jagunemise abil, mida võib käsitleda adaptiivse plastilisusena (ülevaade Stuchlik, 2014).

1.1.2 Sünaptilised raku adhesioonimolekulid

Plastiliste protsesside eelduseks on võime reguleerida hulkraksetele organismidele aluseks olevat rakkudevahelist adhesiooni ehk seondumist. Adhesiooni toimumiseks on asendamatu tähtsusega rakkude pinnal paiknevad raku adhesioonimolekulid (ingl. k *cell adhesion molecules*, CAMid). CAMid on võimelised siduma lahustuva või membraan-seotud ligandi, algatades rakusisese signaaliülekanne. CAMide teiseks ülesandeks on mehhaaniliselt rakke koos hoida, mis tagab kudede moodustumise, spetsialiseerumise, alalhoiu ja toimimise (ülevaade Yang *et al.*, 2014).

Virgatsainete vahendatud signaaliülekanne edastavaid sünapse võib vaadelda kui spetsialiseeritud asümmeetrilisi rakk-rakk ühenduskohti. Sünapsi presünaptilise piirkonna eesmärgiks on vabastada virgatsaineid, mis järgnevalt postsünaptilise membraani retseptoritega seonduvad ja signaali üle kannavad. Sünapsis paiknevatel adhesioonimolekulidel on mitu ülesannet. Neist esimeseks on sünaptoogeneesi käigus aksonite poolse sihtmärkrakkude äratundmise vahendamine. Sellele järgnevalt võimaldavad CAMid

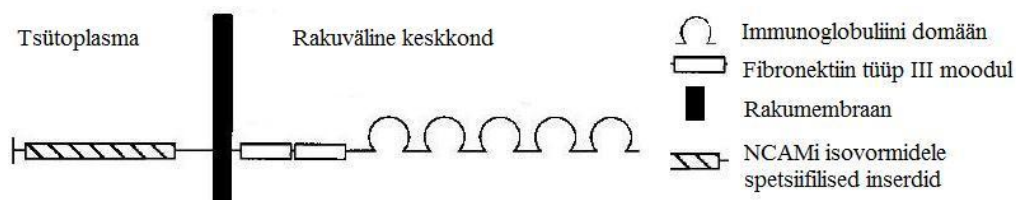
sünaptilise kontakti moodustamist läbi ulatusliku kahesuunalise signalisatsiooni. Teiseks ülesandeks on edaspidine ühenduse struktuuri säilitamine rakkude membraane lähestikku hoides. Sünapsitel levinumateks adhesioonimolekulideks on immunoglobuliini superperekonna (ingl. k *immunoglobulin superfamily*, IgSF) liikmed, kadheriinid ja kateniinid, integriinid, α - ja β -neureksiinid, β -neureksiinide ligandid neuroligiinid, efriinid jpt (ülevaade Yang *et al.*, 2014).

1.2 Neuraalne raku adhesioonimolekul

Immunoglobuliini perekonna liikmete ühiseks omaduseks on immunoglobuliini-sarnase domääni olemasolu. Närvisüsteemis olulisemateks IgSF CAMideks on sünaptiline raku adhesioonimolekul (ingl. k *synaptic cell adhesion molecule*, SynCAM), kontaktiinid, nektiinid, neuraalne raku adhesioonimolekul (ingl. k *neural cell adhesion molecule*, NCAM) ja L1 alamperekonna molekulid (ülevaade Yang *et al.*, 2014). NCAMi puhastasid 1974. aastal esimesena Jørgensen ja Bock ning 1977. aastal nimetasid Thiery *et al.* selle adhesioonimolekuliks. NCAM (tuntud ka kui N-CAM, CD56, D2) on immunoglobuliini domäänidega ning plasmamembraanile kinnituv neuraalne raku adhesioonimolekul. NCAMi on leitud enamikest kudedest, ekspresseerudes kõrgeimalt närvisüsteemis (Cunningham *et al.*, 1987; Jørgensen ja Bock 1974; Thiery *et al.*, 1977).

1.2.1 NCAMi isovormid

NCAMi transkriptsioon toimub geenilt NCAM1 (Jørgensen ja Bock, 1974). Esmaselt mRNA transkriptilt on valmimise järel võimalik alternatiivse splaissimise teel vähemalt 27 erinevat isovormi moodustada (Reyes *et al.*, 1991). Isovormid nimetatakse valgu molekulaarmassi järgi kilodaltonites. Neist põhilised, mis esimesena naatrium-dodetsüülsulfaat polüakrüülamiid geelelektroforeesi (ingl. k *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) teel lahutati, olid NCAM-180, NCAM-140 ja NCAM-120 (Rougon *et al.*, 1982). Neist kaks esimest on transmembraansed molekulid (Cunningham *et al.*, 1987), mis erinevad vaid rakusisese 267-aminohappelise domääni poolest (Barthels *et al.*, 1988). NCAM-120 kinnitub membraanile glükosüülfosfatidüül inositol (GPI-)ankruga (He *et al.*, 1986). Kõikide isovormide rakuvälisesse osasse kuuluvad viis N-terminaalses otsas paiknevat immunoglobuliini-sarnast domääni ja neist membraanile lähemal asetsevat kaks fibronektiini tüüp III moodulit (vt joonist 1.). Mainitud domäänid on kõigil isovormidel kodeeritud eksonites 1-14. NCAM-180 membraani läbiva ja rakusisese osa moodustavad eksonid 16-19 ning NCAM-140 puhul on nendeks eksonid 16, 17 ja 19. NCAM-120 membraanile kinnituvat järjestust kodeerib ekson 15 (Cunningham *et al.*, 1987).



Joonis 1. NCAMi domäänid. Modifitseeritud (Crossin ja Krushel, 2000).

Varieeruvuse suurendamiseks kasutatakse lisaeksoneid, mille lülitamine mRNA transkripti toimub alternatiivse splaissimise käigus (Small ja Akeson, 1990). NCAM esineb ka lahustunud isovormidena, mida on leitud seljaajuvedelikust (Jørgensen ja Bock *et al.*, 1975), seerumist (Krog *et al.*, 1992) ning *in vitro* katsete korral neuronite ja reetina rakkude söötmest (Thiery *et al.*, 1977). Kõigil isovormidel on võime vahendada homofiilset ehk NCAMi molekulide omavahelist (Soroka *et al.*, 2003) ning heterofiilset seondumist, mis leiab aset teiste raku pinnal ja rakuvälises keskkonnas leiduvate molekulidega seondudes (Probstmeier *et al.*, 1989).

1.2.2 NCAM-EC

Sekreteeritava NCAMi (ingl. k NCAM-*extracellular*, NCAM-EC) olemasolu on iseloomulik nii embrüonaalsele kui normaalsele täiskasvanud ajule (Jørgensen ja Bock, 1975). Põhiliste lahustuvate vormide molekulaarmassid paiknevad vahemikus 110-115 kDa ning vähemal määral on leitud ka 135-190 kDa suuruseid NCAM-ECsid (Krog *et al.*, 1992). Üheks nende moodustamise võimaluseks on lisaeksoni lisamine NCAMi mRNA 12. ja 13. eksoni vahele, mis annab translatsioonil enneaegse stoppkoodoni tõttu trunkeeritud sekreteeritava 115 kDa suuruse molekuli (Gower *et al.*, 1988). Lahustuvad vormid võivad pärineda ka proteiin lipaas C vahendatud NCAM-120 eemaldamisest GPI-ankru küljest (He *et al.*, 1986). Kolmandaks võimaluseks on NCAMi membraansete isovormide rakuvälise osa reguleeritud proteolüütiline lõikamine (Nybroe *et al.*, 1989). Leitud on ka terviklikke transmembraanseid lahustunud isovorme (Olsen *et al.*, 1993). Normaalingimustes toimuv NCAM-EC proteolüütiline lõikamine on NCAM-vahendatud neuriidi väljakasvuks asendamatu tähtsusega (Kalus *et al.*, 2006).

Lahustunud vormide nende lisamisel söötmesse on täheldatud NCAM-sõltuva adhesiooni vähenemist (Olsen *et al.*, 1993). NCAM-EC1 on säilinud võime seonduda oma retseptoritele ja membraansetele NCAMidele, takistades nende vahendatud adhesiooni või inhibeerides algatatud rakusisest signaalsiooni. NCAM-140 rakuvälise domääni proteolüütiline eemaldamine primaarsetes kortikaalneuronites võimaldab neuriidi hargnemist ja väljakasvu.

Selle liig võib aga rikkuda neuraalsed juhteteed, näidates võimaliku patoloogilistes tingimustes toimuva liigse proteolüüsi negatiivseid mõjusid (Hinkle *et al.*, 2006).

1.2.3 PSA-NCAM

Erinevatest translatsioonijärgsetest muudatustest, mida NCAM peab enne oma funktsionaalsuse saavutamist läbima, on oluliseimaks glükosüleerimine, millel on valkude struktuuri ja toimimise seisukohalt asendamatu roll (ülevaade Scott ja Panin, 2014). Levinuim liidetav süsivesik on kõrge negatiivse laenguga kuni 100 siaalhappe jäägiga ja α 2,8-seotud homopolümeer polüsiaalhappe (ingl. k *polysialic acid*, PSA). Selle olemasolu on tuvastatud kõigi peamiste NCAMi isovormide viiendalt Ig-domäänilt (Finne *et al.*, 1983; ülevaade Scott ja Panin, 2014). PSA-NCAM on ekspresseeritud peamiselt noortel diferentseerumata neuronitel, kuid seda leiduda ka gliia rakkudel (Theodosis *et al.*, 1991) ja NCAM-EC 120-180 kDa suurustel vormidel (Kalus *et al.*, 2006).

Sarnaselt teistele translatsioonijärgsetele modifikatsioonidele leiab PSA lisamine aset raku endoplasmaatilises retiikulumis või Golgi kompleksis (Alcaraz ja Goridis, 1991). PSA liitmist katalüüsivad Golgi kompleksiga seotud sialüültransferaas X ehk ST8SiaII (STX) (Livingston ja Paulson, 1995) ja polüsialüültransferaas ehk ST8SiaIV (PST, PST-1) (Eckhardt *et al.*, 1995). Tänu nende transkriptsiooni ja mRNA taseme kontrollile on sialüültransferaasidel erinevad ajalised ja piirkondlikud ekspressioonimustrid. STX teostab siaalhappe polümeerisatsiooni valdavalt embrüonaaleas, samas kui PST tase on tuvastatud enamjaolt konstantsena nii pre- kui postnataalses ajus (Angata *et al.*, 1997).

Vees hästi lahustuva PSA jäägi lisandudes moodustub NCAMi valgu ümber suur biofüüsikaliste mehhanismide abil homofiilset seondumist takistav negatiivse laenguga hüdratatsiooni pilv. PSA jäägid NCAMil mõjutavad ka teisi rakk-rakk ning rakk-substraat interaktsioone, näiteks L1 adhesioonimolekuli vahendatud rakkude agregatsiooni (Acheson *et al.*, 1991).

1.2.4 PSA-NCAMi paiknemine ja funktsioon

PSA-NCAM võib paikneda kas üle terve neuroni membraani, mida kohtab pigem raku varasemas arengus, või küpsemise käigus paikneda kindlatesse piirkondadesse (Uryu *et al.*, 1999), milleks on valdavalt dendriidid, aksonid ja närviterminalid (Theodosis *et al.*, 1991). Raku pinnal oleva PSA hulka reguleeritakse peamiselt läbi kahe mehhanismi. Neist esimeseks on PSA-NCAMi süntees sialüültransferaaside poolt (Angata *et al.*, 1997) ning teiseks võimaluseks on molekuli käitlus raku pinnal (Acheson *et al.*, 1991).

PSA-NCAMi põhiliseks ülesandeks on rakkude liikumise võimaldamine. PSA-NCAMi leidub palju arenevas närvisüsteemis, omades selle erinevates piirkondades spetsiifilist ekspressioonimustrit. Arengu käigus toimub diferentseerunud närvirakkude omavaheliste kontaktide loomine, mis paneb aluse staatilise närvirakkude võrgustiku tekkele. Sellega kaasneb üleminek mittepolaarsetele või vähese polaarsetele NCAMile ehk selle täiskasvanu vormile (Hoffman ja Edelman, 1983). NCAM-180le ainumase 18. eksoni deletsioonile järgnenud rakkude liikumise häired näitasid, et PSA liidetakse põhiliselt just sellele isovormile (Tomasiewicz *et al.*, 1993). Täiskasvanueas jätkub PSA-NCAMi ekspressioon vaid üksikutes füsioloogiliselt plastilistes kesknärvisüsteemi regioonides (Theodosis *et al.*, 1991). Heaks näiteks on hipokampus (Bonfanti *et al.*, 1992), mis on õppimises ja mälus võtmetähtsust omav ajupiirkond, kus täiskasvanueas toimub kõige aktiivsemalt uute neuronite teke ja nende integratsioon struktuuri töösesse (Altman ja Das, 1965; ülevaade Stuchlik, 2014).

1.3 Aju plastilisuse häired neuropsühhiaatriliste häirete korral ja neuronaalsete adhesioonimolekulide roll nende tekkes

Maailma Tervishoiu Organisatsiooni definitsioonile vastavalt iseloomustavad neuroloogilisi haigusi närvisüsteemi füsioloogilised häired, mis võivad mõjuda ka isiku psühholoogilisele käitumisele. Psühhiaatrilisi haigusi peetakse aga tavapäratuid tundeid ning mõtte- ja käitumismustreid põhjustavateks haigusteks¹. Seisundeid, mille puhul esinevad mõlemat tüüpi häired, tuntakse neuropsühhiaatriliste haigustena, milleks on depression, skisofreenia, obsessiiv-kompulsiivne ja bipolaarne häire, hallutsinatsioonid jpt. Nende ühiseks jooneks on ebakõlad informatsiooni töötlemises, mis viib vigadeni meelte tõlgendamisel ja muutunud käitumismustriteni. Info töötlemise vead saavad alguse sünaptilise ülekande patoloogilistest kõrvalekalletest ja häiretest neuronaalsetes juhteteedes. Häired sünaptilise töös on seotud neuralse plastilisusega (ülevaade Penzes *et al.*, 2013). Järgnev arutlus näitab kahe levinud neuropsühhiaatrilise haiguse, skisofreenia ja depressiooni näitel, kuidas nende plastilisuse häiretest lähtuv patofüsioloogia avaldub.

1.3.1 Skisofreenia

Mõtlemise ja taju häirete ning psühhooosi esinemise järgi defineeritud skisofreeniat² peetakse kindla tekkehüpooteesi puudumise tõttu multifaktoriaalseks haiguseks. Skisofreenia

¹ <http://www.who.int/features/qa/55/en/>

² <http://www.who.int/topics/schizophrenia/en/>

sümptomite taga arvatakse olevat häirunud sünaptiline signaaliülekanne ja aju eri piirkondade töö kooskõlastamise puudujäägid. See rikub omakorda neuraalset ja sünaptilist sünkroonsust, viies patoloogilise plastilisuseni (ülevaade Anticevic *et al.*, 2015). Teatud hulga skisofreenia haigete ajukoest on leitud põletikulisi markereid, mis näitavad, et vähemalt osadel juhtudel on haigus seotud immuunsüsteemiga (Kröschenhausen *et al.*, 1996).

Sünaptilisi adhesioonimolekule, mille puhul on suudetud välja tuua seoseid skisofreeniaga, on leitud mitmeid (Kirov *et al.*, 2008; Sakurai *et al.*, 2002). Nende seas on ka NCAM, PSA-NCAM ja sialüültransferaasid. Skisofreenia-haigete seerumist on mõõdetud kõrgemas koguses NCAM-EC fragmente, mille hulk on positiivses korrelatsioonis sümptomite raskusastmega (Lyons *et al.*, 1988). *Postmortem* ajude hipokampuses on tuvastatud vähenenud PSA-positiivsete rakkude hulk, samas kui NCAMi enda ekspressioonis muutusi ei täheldatud. Sellest lähtuvalt on PSA-NCAMi vähenemise põhjuseks molekuli translatsioonijärgne töötlemine. PSA-NCAMi languse tagajärjeks on hipokampaalse plastilisuse vähenemine (Barbeau *et al.*, 1995). Hipokampusest, eesajukoorest ja seljaajuvedelikust on suurenenud koguses mõõdetud proteolüüsi osaks saanud NCAM-180st moodustatud 105-115 kDa suuruseid NCAMi vorme, mis viitab rakuvälise keskkonna proteolüüsi regulatsiooni häiretele (Vawter *et al.*, 2001). Lisaks on STX (-/-) hiirtel aju patoloogilise arengu kõrval täheldatud skisofreeniale omaseid käitumismustreid, mis annab alust oletada, et sialüültransferaasi geneetiline varieeruvus võib panustada haiguse eelsoodumusse (Kröcher *et al.*, 2015).

1.3.2 Depressioon

Depressiooni iseloomustab pikaajaline meeleolu langus, masendus, madal enesehinnang ning huvi kaotamine nauditavate tegevuste vastu³. Arusaam haiguse etioloogiast ja neuropatoloogiast on lünklik, kuid traditsiooniliselt on selle põhjuseks peetud monoaminergilise ülekande puudulikkust. Teine levinum teooria viitab häiretele neuraalses plastilisuses. Avastatud arvukate immuunsüsteemi töö muutuste tõttu on depressiooni sarnaselt skisofreeniale viimasel kahel kümnendil palju seostatud ka põletikuga (ülevaade Cattaneo *et al.*, 2015). Plastilisuse häiretest lähtuvalt on depressioonile omaseks vähenenud hipokampuse neurogenees (Gould *et al.*, 1998) ning häired dendriitide ümberkorraldamises, sünaptiliste kontaktide tekkes ja säilitamises (Bessa *et al.*, 2009). Seda arvesse võttes on ka depressiooni neuropatoloogias oluliseks adhesioonimolekulid ja nende võimalikud regulatsioonihäired. Tõepoolest, ka depressiooni patsientide seerumile on omane suurenenud

³ <http://www.who.int/topics/depression/en/>

NCAM-EC fragmentide hulk (Lyons *et al.*, 1988), mis viitab sarnasusele skisofreeniaga (ülevaade Wędzony *et al.*, 2013). NCAM-defitsiitsetel hiirtel läbi viidud uuringud on näidanud depressioonilaadse fenotüübi esinemist ning häireid mälus ja õppimises (Aonurm-Helm *et al.*, 2008). Samuti on depressiooni põdevate patsientide mandeltuumas tuvastatud PSA-NCAMi ja teiste sünaptiliste markerite ekspressiooni langus (Varea *et al.*, 2012). Kortikosterooni manustamise abil põletikulist stressi modelleerides on tagajärjeks PSA-NCAM-immunoreaktiivsete rakkude langus loomudelitel hipokampuse hammaskäärus. See viitab molekuli võimalikule häirumisele ka põletikega seotud depressiooni juhtumites (Nacher *et al.*, 2004). Antidepressantravi järel on PSA-NCAMi tase plastilisusega seotud piirkondades tõusnud, mis näitab, et depressiooni raviks on vajalik plastilisuse suurendamine (Sairanen *et al.*, 2007).

1.4 Maatriksi metalloproteinaasid

Närvisüsteemi ja kõigi teiste kudede morfoloogia tagamises mängib olulist rolli rakke ümbritsev eksotsütoosi abil väljutatud molekulidest koosnev rakuväline maatriks (RVM). RVM on reeglina plastilisust takistav, vajades struktuursete muutuste toimumiseks proteolüütilisi ümberkorraldusi. RVMi komponentide modifitseerimise eest vastutavad arvukad rakuvälisesse degradooni kuuluvad proteaasid (ülevaade Bonnans *et al.*, 2014). Üheks selliseks proteaaside perekonnaks on tsink-sõltuvate endopeptidaasidena tuntud pea 30-liikmelised matriksiinid ehk maatriksi metalloproteinaasid (MMP). MMPsid on traditsiooniliselt peetud oluliseks kudede morfogeneesis, kuid hiljuti on jõutud järeldusele, et RVMi struktuuri ümberkorraldamine pole nende põhiliseks ülesandeks. MMPde peamise funktsioonina on viimasel ajal hoopiski nähtud erinevate sekreteeritud valkude translatsioonijärgset töötlemist (ülevaade Apte ja Parks, 2015). Patoloogiatest on MMPsid seostatud kasvajate levikuga (Bauer *et al.*, 1979), südame ja veresoonekonna haigustega (Vine *et al.*, 1991) ning põletikega (Apodaca *et al.*, 1990). See on omakorda viinud aktiivsele MMPde inhibiitorite otsingule (ülevaade Apte ja Parks, 2015). Rakkudes sünteesitakse ja väljutatakse MMPd inaktiivsete sümogeenidena, mis vajavad rakuvälise aktivatsiooni (Whitham *et al.*, 1986). MMPde aktiivsuse põhiliseks kontrollmehhanismiks on metalloproteinaaside koeinhibiitorite (ingl. *tissue inhibitor of metalloproteinase*, TIMP) abil toimuv MMP katalüütilise saidiga seotud vee molekuli eemaldamine ja seeläbi proteaasi inaktiveerimine (Gomis-Rüth *et al.*, 1997).

1.4.1 MMPd närvisüsteemi füsioloogilistes ja patoloogilistes protsessides

Rakuvälised ja membraan-seotud adhesioonimolekulid tagavad kontaktid kudesid moodustavate rakkude vahel. Neuraalsete CAMide töötlemisest võtavad teiste seas osa ka

MMPd, osaledes lahustuvate rakuväliste domäänide vabastamises, võimaldades neil ligandidena toimida ja aksonite liikumist juhtivatele signaalidele vastata (Beer *et al.*, 1999; ülevaade Levy *et al.*, 2014). Embrüonaalses arengus on näidatud MMPde vajalikkust neuraalrakkude diferentseerumiseks ja sünnijärgse apoptoosi võimaldamiseks (Vaillant *et al.*, 2003). Samuti on mRNA profiili hindamine näidanud mitmete MMPde ekspressiooni arengulist regulatsiooni (Ulrich *et al.*, 2005).

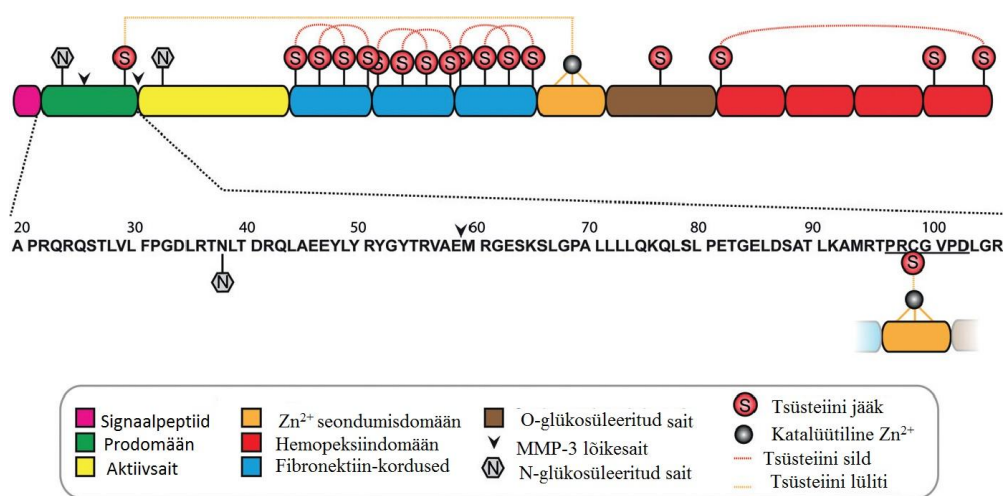
Küpsuse saavutanud ajus on RVM sarnaselt ülejäänud kudedele üldjoontes plastilisust takistav. Täiskasvanueas esinev struktuurne plastilisus on enamjaolt seotud sünaptilise plastilisusega ning aksonite ja dendriitide liikumise võimaldamiseks on vajalik RVMi komponentide proteolüüs. Täiskasvanud ajus on kõige kõrgemalt ekspresseeritud želatinoolüütilised MMP-2 ja -9 (ülevaade Levy *et al.*, 2014). *Drosophila* neuroneid uurides on hiljuti näidatud, et RVMi lagundamine MMP-2 abil on tõepoolest dendriite remodelleeriva efektiga (Yasunaga *et al.*, 2010). Ka sünaptilisest signaaliülekandest sõltuvad mälu ja õppimine toetuvad rohkemal või vähemal määral MMPdele. Nagy *et al.* näitasid, et MMP-9 ekspressiooni mahasurumine või farmakoloogiline inhibeerimine viib hipokampusest sõltuva mälu häirumiseni (Nagy *et al.*, 2006). Metalloproteinaasi inhibiitoreid rakendades on selgunud, et üheks mehhanismiks, mille kaudu metalloproteinaasid füsioloogilistes tingimustes plastilisust mõjutavad, on neuriidi väljakasvu juhtiva NCAM-EC moodustamine proteolüüsi teel (Kalus *et al.*, 2006). NCAMi eemaldamine kasvava neuriidi tipust vähendab adhesiooni liikumatu keskkonnaga, võimaldades neuriidi migratsiooni (Hübschmann *et al.*, 2005).

1.4.2 MMP-9 aktivatsioon ja struktuur

MMP-9 (želatinaas B) 707-aminohappeline prepropeptiid pärineb geenilt *MMP9*. Ensüüm sekreteeritakse 688-aminohappelise proMMPna, mille prodomääni kuulub konserveerunud PRCGVDP järjestus. Prodomäänis paiknev tsüsteiin on tuntud kui „tsüsteiini lüliti“, mis aktiivsaiidi Zn²⁺ sidudes ja aktiivsaiiti blokeerides molekuli inaktiivsuse säilitab (vt joonist 2.; Nagase *et al.*, 1992; Wilhelm *et al.*, 1989). Aktivatsiooni teostab N-terminaalset prodomääni eemaldav seriini või metalloproteinaas, mis seeläbi 82 kDa suuruse ensüümi moodustab (Pourmotabbed *et al.*, 1994). Aktivatsioon võib toimuda ka keemilise modifikatsiooni teel, takistades tsüsteiini poolset aktiivsaiidi steriilist inhibitsiooni, kuid säilitades esialgse tervikliku 92 kDa suuruse vormi. Selliste mehhanismidena on kirjeldatud S-glutatioleerimist (Okamoto *et al.*, 2001) ja S-nitrosüleerimist (Gu *et al.*, 2002). Tsüsteiini oksüdatsioonile järgnevalt võib toimuda autokatalüütiline prodomääni eemaldamine (Meli *et al.*, 2003). Aktiveerunud ensüümi aktiivsaiidi Zn²⁺ seob vaheetapina nõrgalt vee molekuli, olles edaspidi

võimeline osalema nii substraadi seondumises kui hüdrolyütilises katalüüsis (Kleifeld *et al.*, 2000). MMP-9 enim tuntud struktuursed substraadid on želatiin ning tüüp IV ja V kollageenid (Pourmotabbed *et al.*, 1994; Wilhelm *et al.*, 1989).

Aktiveerunud MMP-9 katalüütiline domään seob kolm Ca^{2+} ja kaks Zn^{2+} iooni. Üks Zn^{2+} ionidest on eelnevalt mainitud katalüütiline ioon, mis moodustab koordinatiivsed sidemed konserveerunud HEXXHXXGXXH motiivi histidiinidega (vt joonist 2.), samas kui ülejäänud ioonid on struktuursed (Elkins *et al.*, 2002; Wilhelm *et al.*, 1989). Metalloproteinaases domäänis asub aktiivsaiidi ja Zn^{2+} siduva saiidi vahel substraadi seondamiseks kolm olulist fibronektiin tüüp II motiivi kordust (Wilhelm *et al.*, 1989), millest iga neist moodustab kaks molekulisest disulfiidsilda (Elkins *et al.*, 2002). C-terminaalses otsas paikneb ellipsoidne hemopeksiini-sarnane domään (Wilhelm *et al.*, 1989), mille moodustavad α -heeliks ja neljaleheline β -propelleri struktuur. Lameda tasapinna moodustamise kaudu võimaldab β -propelleri struktuur valk-valk seoste moodustamist ning määrab substraadi spetsiifilisuse (Elkins *et al.*, 2002). Inimese MMP-9 esineb organismis glükosüleeritud kujul, sisaldades kolme seondumiskohta N-seotud glükaanidele. Neist üks asub prodomäänis ja kaks ülejäänut aktiivsaiidis (vt joonist 2.) (Elkins *et al.*, 2002; Wilhelm *et al.*, 1989).



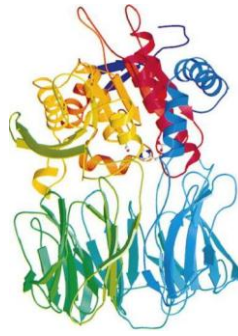
Joonis 2. MMP-9 domäänid ja propeptiidi järjestus. Propeptiidi C-terminuses paikneb „tsüsteini lülitina“ tuntud PRCGVPD konsensus (märgitud alla tõmmatud joonega), milles paikneb Zn^{2+} ioniga koordinatiivset sidet moodustav Cys99 jääk. Tekkinud side blokeerib aktiivsaiidi. MMP-3 katalüüsi teel toimuv aktivatsioon algab lõike tegemisega Glu59/Met60 vahele, tuues esile teise lõikesaiidi Arg106/Phe107 vahel. Modifitseeritud (Elkins *et al.*, 2002).

1.4.3 MMP-9 roll neuropatoloogiate kujunemisel

MMP-9 proteolüütilise aktiivsuse täpne kontroll tagab hipokampuses füsioloogiliselt normaalse sünaptilise plastilisuse. MMP-9 regulatsiooni häired võivad sellest tulenevalt olla võimalikud neuropatoloogia põhjused (Wiera *et al.*, 2013). MMP-9 sünteesi on võimelised esile kutsuma põletikumediaatorid, näiteks tuumori nekroosi faktor α (Okada *et al.*, 1990), või oksüdatiivne stress, mistõttu on molekul patoloogiate korral üles reguleeritud. Plastilistes protsessides osalevate substraatide hulka kuuluvad ka NCAMi isovormid (Fujita-Hamabe ja Tokuyama, 2012) ning MMP-9 ekspressioonihäired mõjutavad otseselt NCAMi funktsiooni. Isheemia korral esineva neuronite kahjustuse taga arvatakse olevat MMP-2 ja -9 vahendatud NCAM-180 lõikamine ning NCAM-EC fragmentide teke (Shichi *et al.*, 2011). Nende liigne moodustamine metalloproteinaaside suurendab (Hübschmann *et al.*, 2005) või vähendab (Hinkle *et al.*, 2006) neuriidi väljakasvu, sõltudes rakutüübist ja signalisatsioonirajast. See mõjutab omakorda neuraalset plastilisust, mille liig võib närvisüsteemi juhteteede struktuuri rikkuda. See on ka üks võimalikest mehhanismidest, mis neuraalsete ühenduste häireid neuropsühhiaatrilistes haigustes põhjustab (Kalus *et al.*, 2006). Sellest tulenevalt on vajalik selgeks teha põletikuliste protsesside korral esineva MMP-9 liigse aktivatsiooni põhjus ja mehhanism.

1.5 Prolüülendopeptidaas

Seriini proteaaside hulka kuuluv (Kato *et al.*, 1980a) 80 kDa suurune prolüülendopeptidaas (PREP, PE, PEP; tuntud ka kui prolüüloligopeptidaas POP) on üks väheseid proteaase, mis on võimeline katkestama peptiidideme proliini jäägi karboksüterminusest (Walter *et al.*, 1971). PREP on valdavalt tsütosoolne (Dresdner *et al.*, 1982), kuid seda võib sünapsites leida ka transmembraansel kujul (O'Leary ja O'Connor, 1995) või partikulaarsena (Kato *et al.*, 1980b). Hüdrofüüsima on PREP võimeline vaid –Pro-Xah- sidet, kus Xah on ükskõik milline aminohape peale proliini enda, kuna –Pro-Pro- sidet PREP lõhkuda ei suuda (Walter, 1976). Erinevalt teistest seriini proteaasidest on PREPil võime lõigata vaid lühikesi, kuni 30 aminohappe jäägi pikkuseid peptiide (Moriyama *et al.*, 1988). PREP-i kodeeriv geen paikneb inimesel 6. kromosoomis (Goossens *et al.*, 1996) ning kodeerib 710-aminohappelist valku (Shirasawa *et al.*, 1994). PREP moodustab silindrit meenutava struktuuri, mille sisemist tunnelit, kuhu suured molekulid ei pääse, ääristab painduvate külghelatega β -propelleri domään. Silindri struktuur võimaldab substraatidel põhjas asuva N- ja C-terminuste poolt moodustatud peptidaasse domääni Ser554, Asp641 ja His680 katalüütilise triaadini jõuda (vt joonist 3.). Sarnaselt teistele seriini proteaasidele hõlmab PREP-i katalüüsi mehhanism kovalentse atsüül-ensüüm vaheühendi moodustamist (Fülöp *et al.*, 1998).



Joonis 3. PREPi konformatsioon. Pildil üleval paiknev katalüütiline domään moodustub N-terminusest lugedes jääkidest 1-72 (sinine) ja 428-710 (punane ja kollane) ning on kovalentselt seotud jääkidest 73-427 moodustuva β -propelleriga (sinine ja roheline). Katalüütilised jäägid molekuli keskel on kujutatud pall-pulk mudelina (Fülöp *et al.*, 1998).

Kasutades -Pro-X-sidemega substraate, milles X tähistab mingit teatud fluorestseeruvat ühendit, on PREPi aktiivsuse mõõtmise katsed aidanud molekuli inimese eri kudedes ja organites tuvastada. PREPi poolse hüdrolyüsi toimumist on seeläbi jälgitud mitmetes perifeersetes kudedes ja kesknärvisüsteemis (Kato *et al.*, 1980a/b). *In vitro* on PREPi aktiivsust näidatud paljude eri peptiidide vastu (Greene *et al.*, 1982; Hersh ja McKelvy, 1979; Kato *et al.*, 1980a), kuid nende *in vivo* lõikamist on tõestatud vähestel juhtudel. Küll on aga selge, et PREPi roll eri kudedes või kudede alamstruktuurides erineb suuresti, mistõttu üldine konsensus molekuli füsioloogilise tähtsuse osas puudub (Myöhänen, 2008).

1.5.1 PREPi roll ajus füsioloogilistes ja patoloogilistes tingimustes

Arvukad närvisüsteemi hõlmavad PREPi aktiivsuse uuringud on näidanud peptidaasi kõrgeimat taset inimese suurajukoos ning väiksemal määral ajutüves, hipokampuses, väikeajus ja mandeltoomas (Irazusta *et al.*, 2002; Kato *et al.*, 1980b). PREPi immunoreaktiivsust on mõõdetud roti neuronite ja gliia rakkude seas, andes tugevama signaali just esimeste puhul (Mentlein *et al.*, 1990). PREPi mRNA profiili hindamise käigus toodi välja asjaolu, et mitmetes regioonides kattus selle levik paljude neuropeptiidide retseptorite jaotusega. See annab alust oletada, et nende võimalik inaktivatsiooni võib toimuda PREPi vahendusel (Bellemère *et al.*, 2004). Rakusiseselt on PREPi leitud tsütosoolselt, mitokondriaalselt, sünaptosomaalselt, nuklearselt ja mikrosomaalselt (Irazusta *et al.*, 2002).

Farmatseutiline huvi PREPi vastu sai alguse avastusest, et selle inhibiitorite rakendamine ajus leevendab skopolamiini poolt põhjustatud amneesiat (Yoshimoto *et al.*, 1987). PREPi inhibiitoreid kasutades on nii kesknärvisüsteemis kui perifeerias tuvastatud arvukalt oligopeptiidseid substraate (ülevaade García-Horsman *et al.*, 2007). Mõnedeks näideteks on türotropiini vabastav hormoon (TRH), luteniseerivat hormooni vabastav hormoon (LH-RH) (Hersh ja McKelvy, 1979), angiotensiinid (Greene *et al.*, 1982), oksütotsiin (Walter *et al.*,

1971) ja β -kasomorfiin (Hartrodt *et al.*, 1982). PREPi substraatid virgatsaine substants P (SP) (Kato *et al.*, 1980a), arginiin-vasopressiin (AVP) (Walter *et al.*, 1976) ja TRH on teada-tuntud õppimise ja mälu protsessides osalevad peptiidid ning nende lagundamine PREPi poolt viitab, et PREPil võib ka nendes sündmustes roll olla (ülevaade García-Horsman *et al.*, 2007). Veelgi enam, PREPi inhibiitori JTP-4819 puhul on näidatud vanusest tuleneva ruumilise mälu halvenemise vähendamist, mis toimub tõenäoliselt SP, AVP ja TRH lagundamise takistamise kaudu (Toide *et al.*, 1997). Lisaks väärrib märkimist PREPi aktiivsuse tipnemine just neis ajupiirkondades, mis on seotud õppimise ja mälu. See viitab omakorda võimalikule seosele neuralse plastilisusega (Irazusta *et al.*, 2002).

Patoloogiline PREPi aktiivsus on omane mitmetele neuropsühhiaatrilistele häiretele. Skisofreenia ja maania haigete veres on täheldatud PREPi aktiivsuse märgatavat tõusu, samas kui depressiooni korral on see tunduvalt langenud. See võib näidata, et PREPi suurenenud aktiivsus on seotud psühhootiliste seisunditega. Antidepressant-ravi järel täheldati depressiooni patsientide seerumis PREPi aktiivsuse märgatavat tõusu. Ka maania ravi neuroleptikumiga taastas PREPi aktiivsuse kontrolligrupiga sarnasele tasemele, kuid skisofreenia puhul antipsühhootikumid PREPi hulka ei mõjutanud (Maes *et al.*, 1995). Välja on pakutud ka PREPi võimalik roll immuunvastuse regulaatorina (Gaggari *et al.*, 2008), mille kinnituseks on molekuli ekspressiooni ja funktsiooni häired põletikuliste haiguste puhul. Selle näideteks on artriidile omane suurenenud membraanse PREPi hulk (Kamori *et al.*, 1991) või vähenenud PREPi tase hulgiskleroosi haigete vereplasmas (Tenorio-Laragana *et al.*, 2010).

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1 Töö eesmärgid

Käesolev bakalaureusetöö on osa Tartu Ülikooli Arstiteaduskonna Bio- ja siirdemeditsiini instituudi farmakoloogia osakonna teadusprojektist „Neuronaalsed raku adhesioonimolekulid kui potentsiaalsed terapeutilised sihtmärgid aju plastilisuse häirete korral“ (IUT 2-3). Projekti eesmärgiks on selgitada neuronaalsete adhesioonimolekulide sobivus terapeutiliste sihtmärkidena neuropsühhiaatriliste haigustega kaasnevate närvisüsteemi plastilisuse häirete korral. Käesoleva uurimistöö eesmärkideks on

- Selgitada, kas PREPi ekspresioonitaseme tõus ja suurenenud aktiivsus mõjutab neuronaalsete adhesioonimolekulide ekspresiooni, kasutades PREPi ü/e ja metsiktüüpi (*wt*) SH-SY5Y neuroblastoomi rakuliini;
- Selgitada välja võimalikud interaktsioonipartnerid, mille kaudu neuronaalsete adhesioonimolekulide lagundamist mõjutatakse;
- Hinnata SH-SY5Y neuroblastoomi rakuliinile sobivate parameetritega transfektsioonimeetodite sobivust.

2.2 Materjal ja meetodika

2.2.1 SH-SY5Y neuroblastoomi rakuliin

Töö eksperimentaalse osa läbi viimiseks kasutati PREPi üleekspresseerivat (edaspidi PREP ü/e) inimese neuroblastoomi SH-SY5Y rakuliini ja metsiktüüpi SH-SY5Y rakuliini (edaspidi *wt*). Rakuliinid pärinevad Antwerpeni Ülikoolist, prof Anne-Marie Lambeiri käest koostööprojekti Neuropro raames. PREPi üleekspressioon on saavutatud PREPi geeni kloonimisest Gerard *et al.* 2010 saadud α -sünukleiini ü/e rakuliini. Metsiktüüpi rakke kasvatati DMEM/GlutaMAX (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium* koos L-analüül-L-glutamiiniga; Invitrogen) söötmes, millele oli lisatud 10% veise looteserumit FBS (ingl. k *Fetal bovine serum*, Invitrogen), 0,3% gentamütsiini (50 $\mu\text{g/ml}$, KRKA) ja 1% NEAA (*Gibco® Non-essential amino acid*, Life Technologies). PREP ü/e rakkude jaoks kasutati sama söödet, kuhu oli lisaks lisatud hügramütsiini kontsentratsioonis 200 $\mu\text{g/ml}$ (*Hygromycin B from Streptomyces hygroscopicus*, Sigma-Aldrich). Rakke kultiveeriti polü-L-lüsiiniga (Sigma-Aldrich) kaetud plastik- või klaaspõhjaga tassidel (läbimõõt 3,5 cm), mida hoiti 5%-lise CO₂ sisaldusega inkubaatoris. Inkubaatori atmosfäär oli veeauruga küllastatud ja

temperatuur oli 37°C. Rakkude kasvatamisega tegeles põhiliselt juhendaja Külli Jaako, kuid töö käigus omandas ka töö autor rakukultuuri tehnikad ning töötas rakuliini kasvatamise ja jagamisega ka iseseisvalt.

2.2.2 Kasutatud antikehad

Tabel 1. *Western blot*’i ja immunotsütokeemia jaoks kasutatud antikehad.

Antikeha	Tootja	Lahjendus	Tüüp	Peremeesloom
Anti-MMP-9 (AB19016)	Millipore	1:1000	Primaarne	Küülik
Anti-NCAM (AB5032)	Millipore	1:1000	Primaarne	Hiir
Anti-PSA-NCAM (MAB5324)	Millipore	1:1000	Primaarne	Hiir
Anti-PREP	Dr. Arturo García-Horsman, Helsingi Ülikool	1:1000	Primaarne	Kana
Anti-β-actin IgG (926-42212)	LI-COR	1:1000	Primaarne	Hiir
Anti-Rabbit IgG konjugeeritud Zenon® Alexa Fluor® 594-ga (A11012)	Life Technologies	1:10000	Sekundaarne	Kits
Anti-Mouse IgM konjugeeritud Zenon® Alexa Fluor® 594-ga (A21044)	Life Technologies	1:10000	Sekundaarne	Kits

2.2.3 SDS-PAGE ja *Western blot*

Valkude detekteerimiseks antikehade abil kasutati *Western blot* meetodikat, mille jaoks esmalt valmistati lüüsi puhver, mis sisaldas 137 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1%

Nonidet® P-40 (Sigma-Aldrich), 50 mM NaF, 40 µl/ml proteaasi inhibiitorit (*cOmplete protease inhibitor cocktail tablets*, Roche) ja 20 µl/ml Na₃VO₄. Rakutassidelt eemaldati sõõde, pesti jääkülma fosfaatpuhvri lahusega (PBS), millele järgnevalt lisati igale tassile 120 µl lüüsipuhvrit. Rakud kraabiti koos lüüsipuhvriga tassi põhjast lahti, pipeteeriti tuubi, kus nad homogeniseeriti, inkubeeriti jää peal 20 minutit ja tsentrifuugiti 14 krpm 4°C juures (rootor AC2.14, Jouan CR3i). Saadud supernatantidele lisati laadimispuhvrit (*4x Protein loading buffer*, LI-COR) lõppmahus 25%, kuumutati 95°C juures 5 minutit ja tsentrifuugiti (13 krpm 5 minutit; *Centrifuge 5424*, rootor F-45-18-11, Eppendorf).

Vertikaalne SDS-PAGE teostati Bio-Rad *PowerPac™ Basic* aparaadiga 6%- ja 8%-lises geelis. Forees viidi läbi 120 V juures foreesipuhvris (pH 8,3), milles sisaldus 5 mM Tris, 34,8 mM glütsiin, 0,02% SDS ja 90% dH₂O. Valkude suuruse visuaalseks hindamiseks lisati valguredelit *Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder* (Fermentas). Pärast foreesi kanti proovid Bio-Rad *Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell* masina abil geelilt eelnevalt metanoolis niisutatud ja ülekandepuhvris (pH 8,3; 25 mM Tris, 192 mM glütsiin, 20% metanooli, 80% dH₂O) hoitud polüvinülideen fluoriid (PVDF) membraanile (*Immobilon®-FL*, Millipore). Ülekanne toimus ülekandepuhvris 1,5 h 100 V juures. Membraanid pesti TBSTs (ingl. k *Tris-buffered saline with Tween*) (pH 7,5; 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% *Tween 20* (Sigma-Aldrich)), millele järgnes blokeerimine *Odyssey® Blocking Buffer* (LI-COR) blokeerimislahuses ning inkubatsioon primaarse antikeha lahusega, mis lahjendati blokeerimislahuses. Membraanide inkubatsioonid primaarse antikehaga toimusid üleöö 4°C juures, millele järgnes kolm kümneminutilist pesukorda TBSTga ja tunnine inkubatsioon fluorokroomidega märgistatud sekundaarse antikehaga. Järgnevalt pesti membraani kolm korda 10 minutit. Seejärel asetati membraan kile vahele ja skaneeriti *Odyssey® CLx Infrared Imaging System* (LI-COR) masinaga, kasutades *Image Studio™* tarkvara (vabavara Internetis).

2.2.4 Immunotsütokeemia

PSA-NCAMi lokaliseerimiseks rakukultuuris viidi läbi immunotsütokeemiline märgistamine. Selleks kasvatati rakud klaaspõhjaga 2 ml-se mahutavusega tassidel (läbimõõt 3,5 cm), mis olid kaetud 0,01%-lise tüüp I kollageeni lahusega etaanhappes. Esmalt eemaldati rakutassilt sõõde, pesti PBSiga, millele järgnes 10-minutiline fikseerimine toatemperatuuril 4%-lise paraformaldehüüdiga. Järgnevalt pesti rakke kolm korda PBSga ning lisati toatemperatuuril tunniseks inkubatsiooniks 1 ml blokeerivat lahust, milles sisaldus 50 µl kitse seerumit (Vector Laboratories). Järgnes 96-tunnine rakkude inkubatsioon 1 ml-s primaarses antikeha lahuses, mis lahjendati suhtes 1:1000 PBS- või blokeerimislahuses ning lisati ka 5% kitse seerumit.

Seejärel viidi läbi kolm pesukorda PBSiga. Rakke inkubeeriti üks tund sekundaarse antikeha lahusega (lahjendus 1:2000), mille koostises oli 5% kitse seerumit PBS- või blokeerimislahuses. Edasi värviti tuumad 0,01%-lise DAPI lahusega (4',6-diamidino-2-fenüülindool, ingl. k *4',6-diamidino-2-phenylindole*) (Sigma-Aldrich) PBSis. PSA-NCAMi signaali detekteerimiseks hoiti rakke PBSis, teiste katsete korral blokeerimislahuses. Rakke vaadeldi Olympus IX70 fluorestsentsmikroskoobis. Mikrofotod tehti Olympus DP70 CCD kaameraga ning kasutati 20x PlanApo objektiivi ja 40x/0,90 WLSM PlanApo vesiimmersioonobjektiivi.

2.2.5 *In situ* sümograafia

MMPde proteinaasse aktiivsuse tuvastamiseks nii PREP ü/e kui *wt* rakukultuuris teostati *in situ* sümograafia, kasutades substraadina vastavalt tootjapoolsele protokollile fluorestseiiniga konjugeeritud DQTM želatiini (Life Technologies). Reaktsioon lõpetati 5 minuti möödudes, rakud fikseeriti 4%-lise formaliini lahusega ning rakutuumad visualiseeriti, kasutades DAPI 0,01%-list lahust, millega inkubeeriti rakke toatemperatuuril 5 minutit ja pesti kolm korda PBSga. Rakke vaadeldi fluorestsentsmikroskoobiga Olympus IX70. Mikrofotod tehti Olympus DP70 CCD kaameraga ning kasutati 20x PlanApo objektiivi ja 40x/0,90 WLSM PlanApo vesiimmersioonobjektiivi.

2.2.6 Transfektsioon

Rakkude transfektsioonil kasutati järgnevaid plasmide: inimese PREP shRNA (shPREP) (*SureSilencingTM*, SA Biosciences), negatiivse kontrolli shRNA (ncPREP) neomütsiini resistentsusega (0,18 µg/µl, *SureSilencingTM*, SA Biosciences), GFP (0,81 µg/µl, valmistatud Tartu Ülikooli Arstiteaduskonna Bio- ja siirdemeditsiini instituudi laboris).

2.2.7 Transfektsioon lipofektamiiniga

PREPi ekspressiooni maha surumiseks teostati transfektsioon esmalt lipofektamiini (*Lipofectamine[®]2000*, Invitrogen) kasutades. Selleks eemaldati 40%-lise katvusega klaaspõhjaga rakutassidelt (läbimõõt 3,5 cm) tavapärane DMEM/GlutaMAX sööde ning asendati transfektsiooniseguga, mis valmistati OptiMEM[®] I (ingl. k *Opti-Minimal Essential Medium*) (Invitrogen) söötmesse. Rakud transfektsioonil teostati vastavalt tootja poolsele protokollile, kasutades segusid, milles ühe tassi kohta sisaldus 0,8 µg plasmidi, 0,4 µg GFPd, 1,6 µg lipofektamiini ja 120 µl söödet. Tassid asetati kolmeks tunniks inkubaatorisse 37°C juurde (5% CO₂), millele järgnevalt lisati neile 2 ml tavapärasest söödet. 24 tunni möödudes hinnati transfektsiooni efektiivsust GFP-signaaliga rakkude järgi fluorestsents- ja

faaskontrastmikroskoobiga kasutades 20- ja 40-kordset objektiivi. Kolme ööpäeva pärast viidi PSA-NCAMi taastumise hindamiseks läbi immunotsütokeemiline detekteerimine ja analüüs.

2.2.8 Elektroporatsioon

Elektroporatsioon teostati 80%-lise katvusega rakutassidel. Tassidelt eemaldati vana sööde, pesti ühe korra DMEM/GlutaMAX söötmega, seejärel pipeteeriti rakud söötmega tassi põhjast lahti, pandi tuubi ning tsentrifuugiti 1000 rpm 2 minutit (*Centrifuge 5424*, rootor F-45-18-11, Eppendorf). Järgnevalt eemaldati lahus ning suspendeeriti rakud OptiMEM söötmes ja tsentrifuugiti uuesti, millele järgnevalt eemaldati lahus ning lisati uuesti OptiMEM söödet sellises koguses, et igasse tuubi saaks ühe tassi jagu rakke, mis sisalduvad 250 µl-s söötmes. Lahus asetati küveti (laius 0,4 cm) ning lisati GFPd kontsentratsiooniga 1,6 µg/µl ja kas shPREP või negatiivne kontroll lõppkontsentratsioonidega 3,2 µg/µl. Lahused elektroporeeriti Bio-Rad *Gene Pulser XCell*TM masinaga 190 V ja 230 V juures mahtuvusega 975 µF. Järgnevalt lasti segudel 5 minutit seista ja pipeteeriti tuubidesse, millesse oli lisatud sooja DMEM/GlutaMAX söödet. 15 minuti pärast tsentrifuugiti tuubid 1000 rpm 5 minutit (*Centrifuge 5424*, rootor F-45-18-11, Eppendorf) ja vahetati sööde ning kanti rakud tassidele, mis asetati 37°C juurde (5% CO₂). 24 tunni pärast vaadeldi transfektsiooni efektiivsust fluorestsentsmikroskoopi kasutades 20- või 40-kordse objektiivi all. NCAMi ja PSA-NCAMi taastumise hindamiseks viidi läbi *Western blot* analüüs vastavalt peatükis 2.2.3 kirjeldatud protokollile.

2.2.9 Andmete analüüs

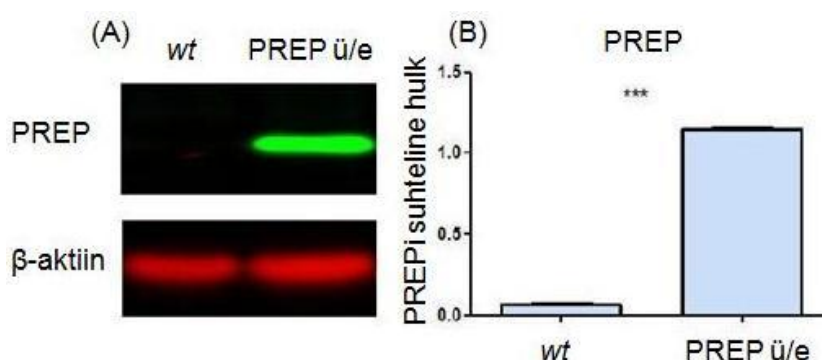
Katsed viidi valdavalt läbi kahes või kolmes korduses. *Western blot*'i abil saadud signaali tugevuse kvantifitseerimine teostati ImageJ programmiga (vabavara Internetis) ning saadud tulemuste analüüsiks kasutati GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software) tarkvara, mille abil teostati Studenti t-test. Analüüsi tulemused on esitatud keskmiste väärtustena, millele on lisatud standardviga (ingl. k *standard error of the mean*, SEM). Statistiliselt olulisena arvestati p-väärtust < 0,05.

2.3 Tulemused ja arutelu

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli uurida seoseid neuronaalsete raku adhesioonimolekulide NCAMi ja PSA-NCAMi languse ning prolüülendopeptidaasi ekspressiooni tõusu vahel. Samuti püüti välja selgitada PREPi võimalikke interaktsioonipartnereid adhesioonimolekulide lagundamisel. Selleks võrreldi *Western blot* meetodil PREP ü/e ja *wt* rakkudel vastavate molekulide suhtelist hulka ning teostati *in situ* sümograafia želatinoalüütilise aktiivsuse tuvastamiseks. PREP ü/e rakuliinil püüti hinnata adhesioonimolekulide taastumist peale PREPi taseme mahasurumist, kasutades erinevaid transfektsioonimeetodeid. Need meetodid antud rakuliini puhul häid tulemusi ei andnud.

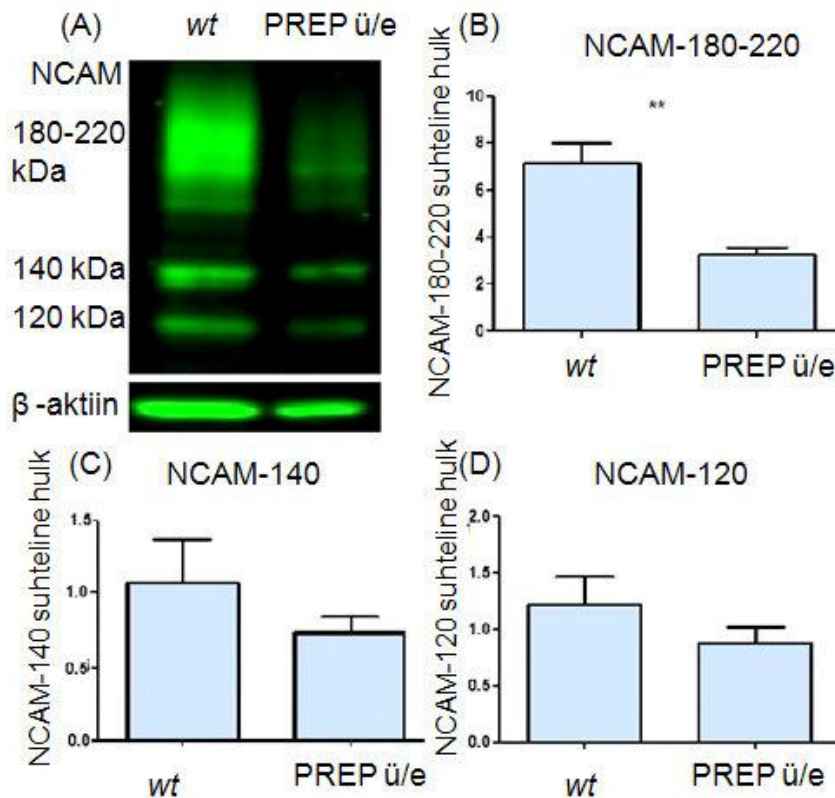
2.3.1 Valgutasemete võrdlus *wt* ja PREP ü/e rakkudel

Esmalt võrreldi *Western blot* analüüsi abil PREP ü/e ja *wt* SH-SY5Y neuroblastoomi rakkude PREPi suhtelist hulka. Nagu graafikust (B) joonisel 4. nähtub, on PREPi tase ü/e rakkudes ootuspäraselt tõusnud. Kuna PREP ü/e rakkude puhul on varasemalt uurimisrühma teiste liikmete poolt PREPi substraate kasutades näidatud peptidaasi kõrgemat aktiivsust, näitavad need tulemused üheskoos, et kasutatud rakuliin täidab tõepoolest oma eesmärgi. Proovid kanti geelile kõigis katsetes neljas korduses ning valgu hulk normaliseeriti β -aktiini suhtes.



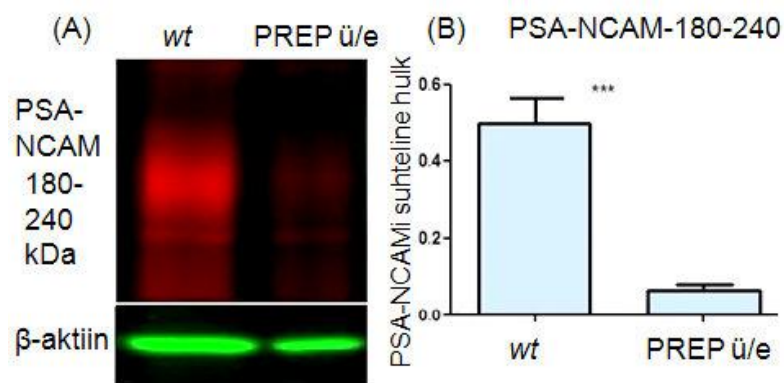
Joonis 4. (A) Illustratiivne *Western blot* valguriiba, mis näitab PREPi suhtelist taset metsiktüüpi (*wt*) ja PREP ü/e neuroblastoomi SH-SY5Y rakuliini lüsaatides. (B) PREPi valgutaseme kvantitatiivne analüüs *wt* ja PREP ü/e rakkudes (Studenti t-test $p < 0,001$, tulemused on esitatud keskmiste väärtustena + SEM, $n=4$).

NCAMi taseme kvantitatiivne analüüs näitas, et PREP ü/e rakkude lüsaatides on NCAMi valgu hulk vähenenud ning langus oli statistiliselt oluline vaid NCAM-180-220 kDa suuruste isovormide puhul. NCAM-140 analüüsil oli nähtav trend languse suunas ning NCAM-120 puhul oluline erinevus puudus (vt joonist 5.).



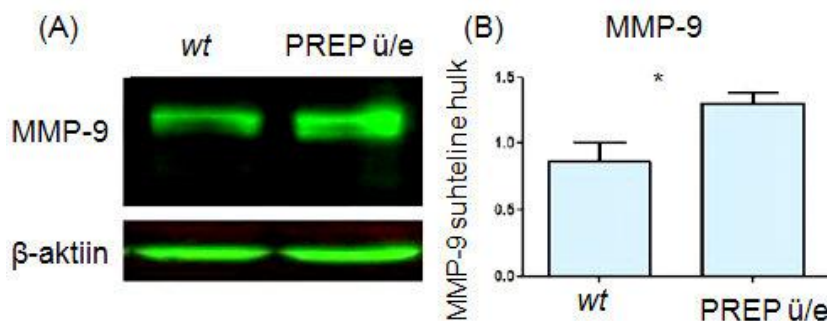
Joonis 5. (A) Illustriativne *Western blot* valguriiba, mis näitab NCAMi põhiliste isovormide suhtelist taset metsiktüüpi (*wt*) ja PREP ü/e neuroblastoomi SH-SY5Y rakuliini lüsaatides. (B) NCAM-180-220 valgutaseme kvantitatiivne analüüs *wt* ja PREP ü/e rakkudes (Studenti t-test $p < 0,01$, tulemused on esitatud keskmiste väärtustena + SEM, $n=4$). (C) NCAM-140 valgutaseme kvantitatiivne analüüs *wt* ja PREP ü/e rakkudes (Studenti t-test $p > 0,05$, tulemused on esitatud keskmiste väärtustena + SEM, $n=4$). (D) NCAM-120 valgutaseme kvantitatiivne analüüs *wt* ja PREP ü/e rakkudes (Studenti t-test $p > 0,05$, tulemused on esitatud keskmiste väärtustena + SEM, $n=4$).

PSA-jääkide hulk NCAMi molekulidel võib varieeruda, mistõttu on PSA-NCAMi molekulid erineva suurusega, andes foreesil suure valguriiba, mis jääb tavaliselt vahemikku 180-240 kDa. Illustriatiivsel valguriibal on näha oluliselt nõrgemat PSA-NCAMi signaali PREP ü/e rakkudel ning β-aktiini suhtes normaliseeritud valguriiba kvantitatiivne analüüs näitas statistiliselt olulist langust ($p < 0,001$) PSA-NCAMi tasemes PREP ü/e rakuliinil (vt joonist 6.).



Joonis 6. (A) Illustratiivne *Western blot* valguriiba, mis näitab PSA-NCAMi suhtelist taset metsiktüüpi (*wt*) ja PREP ü/e neuroblastoomi SH-SY5Y rakuliini lüsaatides. (B) PSA-NCAMi valgutaseme kvantitatiivne analüüs *wt* ja PREP ü/e rakkude (Studenti t-test $p < 0,001$, tulemused on esitatud keskmiste väärtustena + SEM, $n=4$).

MMP-9 taseme analüüsist selgus, et võrreldes *wt* rakkudega on PREP ü/e rakkudel MMP-9 ekspressioon tõusnud ning tulemus on statistiliselt oluline (vt joonist 7.). Kuna antikeha seondub nii aktiivsele kui inaktiivsele vormile, siis statistiline test arvestab mõlemat.

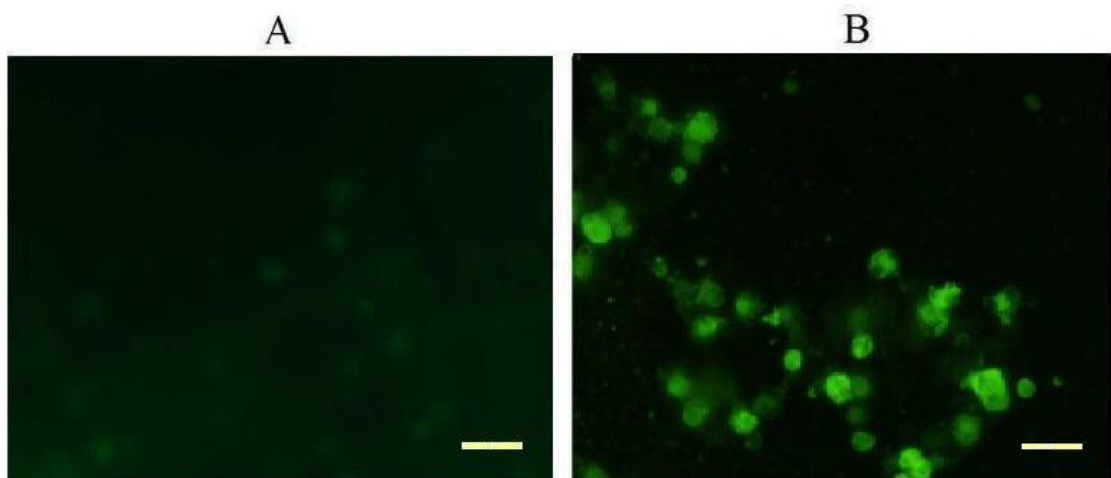


Joonis 7. (A) Illustratiivne *Western blot* valguriiba, mis näitab MMP-9 suhtelist taset metsiktüüpi (*wt*) ja PREP ü/e neuroblastoomi SH-SY5Y rakuliini lüsaatides. (B) MMP-9 valgutaseme kvantitatiivne analüüs *wt* ja PREP ü/e rakkudes (Studenti t-test $p < 0,05$, tulemused on esitatud keskmiste väärtustena + SEM, $n=4$).

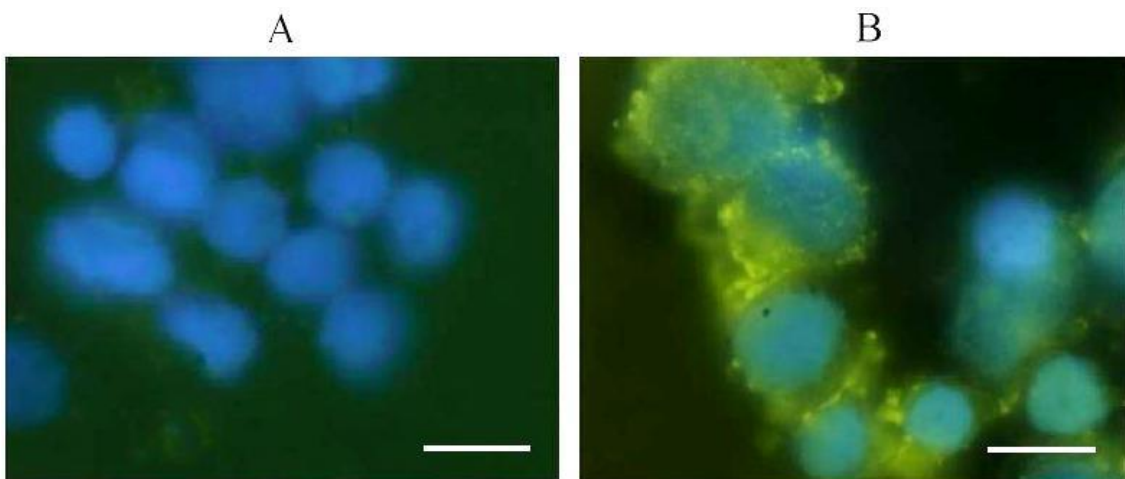
2.3.2 Želatinolüüs *wt* ja PREP ü/e rakkudel

Kuna MMP-9 on želatiini hüdrolyüsiv ensüüm, siis MMP-9 vabanemise ja aktiivsuse hindamiseks rakendati *in situ* sümograafiat. Selles kasutatava substraadi ensümaatilisel lagundamisel vabaneb fluorestseeruv produkt, mille teket *wt* ja PREP ü/e rakkudel hinnati. *Wt* ja PREP ü/e rakkude fluorestsentsignaali visuaalne võrdlus näitas, et PREP ü/e rakkudel toimub želatiini hüdrolyüs tunduvalt ulatuslikumalt (vt jooniseid 8.-9.). Hoolimata 40x suurenduse kasutamisest ning eelnevast rakutuumade värvimisest, pole võimalik teha järeldusi MMP-9 signaali täpse päritolu kohta ning selgusetuks jääb, kas reaktsiooni käigus toimub MMP-9 aktivatsioon tsütoplasmas või väljaspool rakku (vt joonist 9.). Eelnevate

Western blot katsete tulemusena leiti küll suurenenud MMP-9 valgutase PREP ü/e rakkudel, kuid kuna kasutatav kit võimaldas tuvastada ka teisi želatinolüütilisi MMPsid, on võimalik, et signaalis omas tähtsust ka teine želatinolüütiline MMP, täpsemalt MMP-2. Käesolevast katsest saame aga järeldada, et PREP ü/e rakkudel on suurenenud nende vabanemise või aktivatsiooni kineetika. Signaali vähese spetsiifilisuse probleemi lahendamiseks rakendati tööühma poolsetes edaspidistes uuringutes MMP-spetsiifilisi inhibiitoreid ja aktivaatoreid. Mõõttes ajas fluorestsentsignaali intensiivsust, hinnati täpsemalt MMP-9 vabanemise kineetikat. Positiivseid tulemusi saades näidati, et nähtud signaali tugevuse tõusu taga on tõepoolest suurenenud MMP-9 aktiivsus.



Joonis 8. Illustratiivne mikrofoto *wt* rakkudest (A) ja PREP ü/e rakkudest (B) *in situ* sümograafia teostamise järgselt. Roheline fluorestseeruv signaal viitab rakkudel toimuva želatinolüüsi suhtelist aktiivsust. Mõõtkava on 25 μ m.

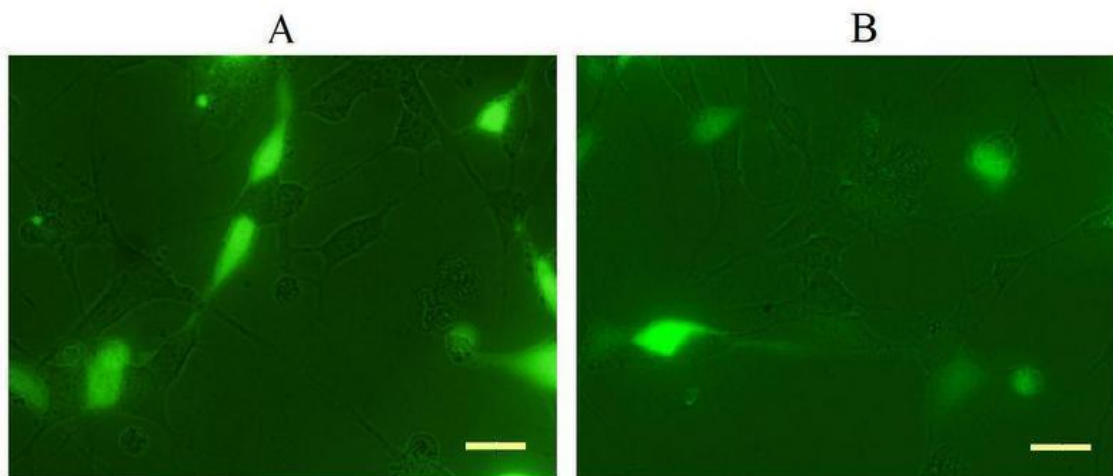


Joonis 9. Illustratiivne mikrofoto *wt* rakkudest (A) ja PREP ü/e rakkudest (B) *in situ* sümograafia teostamise järgselt. Roheliselt fluorestseeruv signaal viitab rakkudel toimuva želatinolüüsi suhtelist aktiivsust. Tuumad on DAPIga värvitud siniseks. Mõõtkava on 25 μ m.

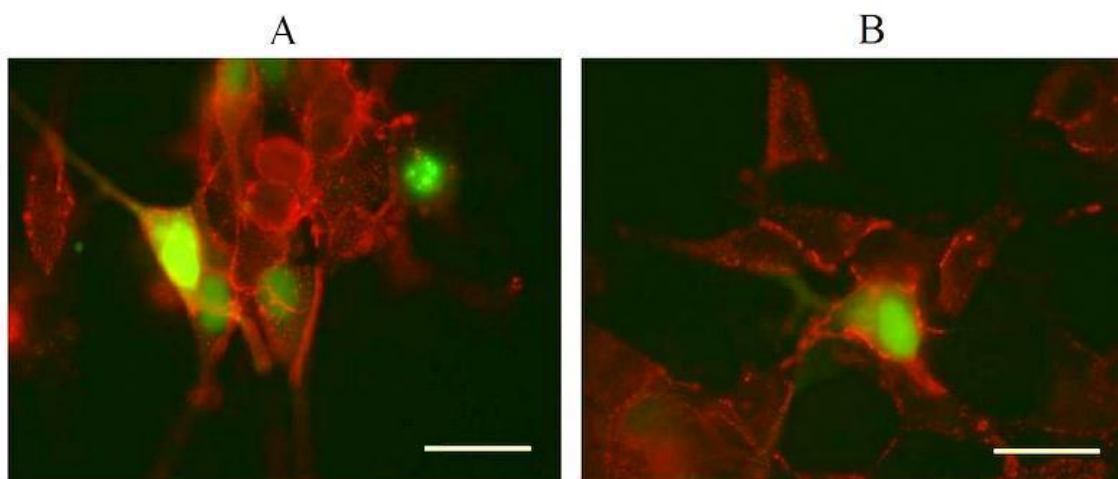
2.3.3 PREPi taseme mahasurumine transfektsiooni meetoditega

Kuna töö autori ja teiste uurimisrühma liikmete poolt oli PREPi üleekspressiooni korral korduvalt näidatud adhesioonimolekulide taseme langust, oli järgmiseks sammuks teha kindlaks, kas PREPi ekspressiooni vähendamine võiks taastada PREP ü/e rakkudel PSA-NCAMi taseme. Selleks püüti transfektsiooni meetodil läbi viia PREPi *knockdown*. Selle käigus viiakse rakku vektor, mis DNAsse integreerudes toodab lühikesi shRNAsid. shRNAd seonduvad endaga komplementaarsetele RNA järjestustele ning kutsuvad esile nende lagundamise. Tulemuseks on vastava geeni vaigistamine (Elbashir *et al.*, 2001)

Esmalt viidi püstitatud ülesande teostamiseks läbi lipofektamiin-transfektsioon, kasutades negatiivse kontrolli (ncPREP) ja PREPi *knockdown* (shPREP) vektoreid. Transfektsiooni viidi läbi kaks korda ning mõlemal juhul jäi mõlema rakutüübi puhul efektiivsus alla 50% (vt joonist 10.). Edasisel jagunemisel saavad eelise aga mittetransfekteerunud rakud ning madala efektiivsuse tõttu pole *Western blot* meetodil võimalik erinevusi PSA-NCAMi tasemes tuvastada. Seda on näidatud teiste uurimisrühma liikmete poolt. Seetõttu teostati käesoleva katse raames PSA-NCAMi immunotsütokeemia, mis erinevusi ncPREP ja shPREP vahel siiski ei näidanud (vt joonist 11.). Põhjuseks võib olla madalast transfektsiooni efektiivsusest tingitud mittetransfekteerunud rakkude intensiivsem jagunemine, mis suurendab PREPi sekretsiooni rakuvälisesse keskkonda. Kasvanud PREPi sekretsioon võib omakorda suurendada MMP-9 taset ja see vähendab ka transfekteerunud rakkude eeldatavat PSA-NCAMi taastumist, mistõttu selgeid erinevusi ncPREP ja shPREPi vahel polnud võimalik näidata. Teised uurimisrühma liikmed rakendasid hilisemalt sama metoodikat, kuid PSA-NCAMi visualiseerimiseks rakkudel kasutati laserkonfokaalmikroskoopiat, mille käigus skaneeriti üksikut transfekteerunud GFP-positiivset rakku 1 µm haaval, millest hiljem pandi kokku 3D pildid. PSA-NCAM-positiivse signaali analüüs üksikraku tasandil kinnitas, et PREPi mahasurumine taastas PSA-NCAMi ekspressiooni raku pinnal.

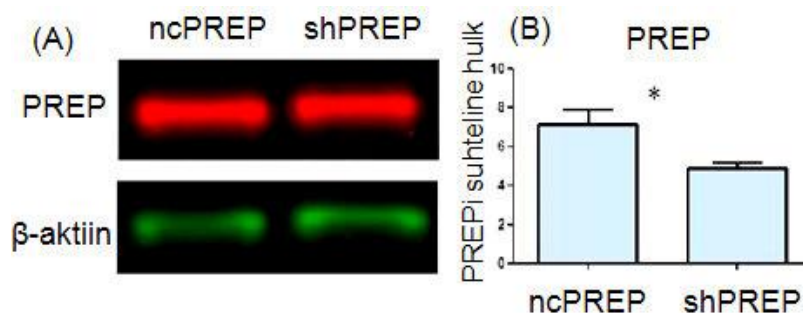


Joonis 10. Illustratiivne mikrofoto negatiivse kontrollvektoriga (A) ja PREPi alla suruva vektoriga (B) transfekteeeritud rakkudest 24 h pärast lipofektamiin-transfektsiooni. Roheliselt fluorestseeruv GFP-signaali näitab transfektsiooni efektiivsust. Mõõtkava on 25 μ m.



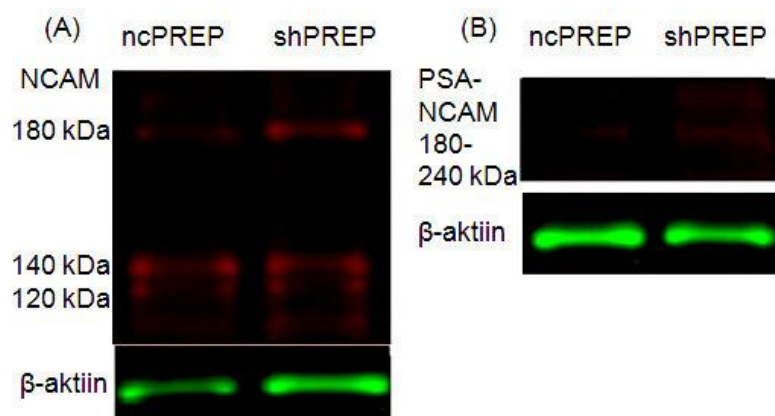
Joonis 11. Illustratiivne mikrofoto negatiivse kontrollvektoriga (A) ja PREPi alla suruva vektoriga (B) transfekteeeritud rakkudest 72 h pärast lipofektamiin-transfektsiooni. Punaselt fluorestseeruva PSA-NCAMi signaali näitab rakkude PSA-NCAMi suhtelist hulka. Transfekteeerunud rakud on tänu GFP-signaali värvunud roheliseks. Mõõtkava on 25 μ m.

Transfektsiooni efektiivsuse suurendamise lootuses teostati see järgnevalt elektroporatsiooni meetodil ning üritati PSA-NCAMi signaali detekteerida ka *Western blot*'iga. Eelkatset otsustati meetodi potentsiaali testimiseks läbi viia kaks korda, kasutades kolme ncPREP ja kolme shPREP proovi. Mõlemal korral jäi kõigi proovide efektiivsus alla 50%. Esimese katse ajal kasutati selle rakuliini jaoks liiga suurt voltaaži, mistõttu rakkude elulemus kannatas oluliselt. Teise katse raames teostati elektroporatsioon madalama voltaažiga ning rakkude elulemust ja jagunemist sai hinnata rahuldavaks. Valguriba visuaalse vaatluse teel pole võimalik öelda, kas kahe erineva vektoriga transfekteeerides PREPi tasemes muutusi esines, kuid valgutaseme kvantitatiivne analüüs teatavat vähenemist siiski näitas (vt joonist 12.).



Joonis 12. (A) Illustratiivne *Western blot* valguriba, mis näitab PREPi suhtelist taset elektroporatsiooni teel negatiivse kontrollvektori (ncPREP) ja shPREP vektoriga transfekteeritud rakkude lüsaatides. (B) PREPi valgutaseme kvantitatiivne analüüs shNC ja shPREP vektoritega elektroporeeritud rakkudes (Studenti t-test $p < 0,05$, tulemused on esitatud keskmiste väärtustena + SEM, $n=3$).

Et hinnata, kas elektroporatsiooni meetodit kasutades pärast transfekteerimist ncPREPi ja shPREPiga on võimalik tuvastada muutused NCAMi ja tema polüsialüleeritud vormis, teostati NCAMi *Western blot* analüüs. Selle tulemusena leiti, et NCAMi kõigi kolme isovormi kitsad valguribad olid membraanil väga vähesel määral nähtavad. Joonisel 4. on näha, et tavapäraselt on NCAM-180-220 smäärise isovormina, kuid joonisel 13. on selle asemel näha NCAM-180 kitsast ja selgepiirilist valguriba. PSA-NCAMi taseme muutusi *Western blot* meetodil visualiseerida ei õnnestunud ning 5. joonisel nähtavat smäärset valguriba ei tekkinud, mis viitab, et PSA-jääkide liitmist NCAMile ei toimunud. Küll aga on nõrgalt võimalik näha üksikuid kitsaid valguribasid, mis võib viidata meetodi elektrilisest aktiivsusest tingitud PSA-NCAMi lagundamisele (vt joonist 13. (B)). Mainitud probleemidest lähtuvalt polnud transfekteerimise teel NCAMi ja PSA taastumist võimalik edasi uurida.



Joonis 13. (A) Illustratiivne *Western blot* valguriba, mis näitab NCAMi isovormide suhtelist taset elektroporatsiooni teel negatiivse kontrollvektori (ncPREP) ja shPREP vektoriga transfekteeritud rakkude lüsaatides. (B) Illustratiivne *Western blot* valguriba, mis näitab PSA-NCAMi suhtelist taset elektroporatsiooni teel negatiivse kontrollvektori (ncPREP) ja shPREP vektoriga transfekteeritud rakkude lüsaatides.

2.3.4 Tähtsus ja võimalikud edasised uurimissuunad

Eelmainitud tulemustest järeldub, et PREPi liigne ekspressioon kutsub esile muutusi NCAMi ja PSA-NCAMi ekspressioonis. Varasemalt on teiste tööühma liikmete poolt näidatud ka neureksiini ja neuroliigiini taseme langust. Neuraalsed ja sünaptilised adhesioonimolekulid on olulised stabiilsete närviringete tagamisel, ühendades rakke teiste rakkude ja RVMga. Samuti on neil võtmetähtsus rakkudevaheliste sünaptiliste kontaktide kaudu toimuva signaalsüsteemi vahendamises (ülevaade Yang *et al.*, 2014). NCAMi ja tema polüsialüleeritud vormi tasakaal on oluline ning muutused selles võivad viia häirunud aju plastilisuseni (Aonurm-Helm *et al.*, 2008; Varea *et al.*, 2012). NCAMi ja PSA-NCAMi toimimise häireid ning muutusi sünaptiliste adhesioonimolekulide ekspressioonimustris seostatakse mitmete neuropsühhiaatriliste ja neurodegeneratiivsete häiretega (Barbeau *et al.*, 1995; Varea *et al.*, 2012). Seetõttu on oluline teha kindlaks mehhanismid, mis reguleerivad neuraalsete adhesioonimolekulide tasakaalu nii füsioloogilistes tingimustes kui patoloogiate korral. Mehhanismide ja võimalike terapeutiliste ründepunktide tundmine võimaldab välja töötada uusi biomarkereid ning ravimikandidaate, mida oleks võimalik häiritud plastilisuse korral rakendada. Käeolevas uurimistöös oli ühe võimaliku sihtmärgina selgitamisel PREPi roll NCAMi ja tema polüsialüleerimise tasakaalu häirimisel ning võimalike interaktsioonipartnerite leidmine. Kuna teadaolevalt on PREP võimeline proteolüüsi teostama vaid kuni 30 aminohappe pikkustel peptiididel (Moriyama *et al.*, 1988), peavad peptidaasil olema interaktsioonipartnerid, mis NCAMi ja PSA-NCAMi lagundamist teostavad. *Western blot* ja *in situ* sümograafia näitasid MMP-9 ekspressiooni ja želatinoosilise aktiivsuse kasvu PREPi ü/e tingimustes. See viitab metalloproteiinaaside võimalikule rollile adhesioonimolekulide lagundamises või rakuväliste domäänide vabastamises, mida on varasemalt näidatud L1 adhesioonimolekuli puhul (Beer *et al.*, 1999). Sellest lähtuvalt vajaks lähemat uurimist rakkude söötimest võimalike NCAMi proteolüütiliste produktide tuvastamine, mis võimaldaks kinnitada või täpsemalt kindlaks teha selle eest vastutavad proteaasid. Hetkel käib uurimisrühmas edasine sümograafilise meetodi valideerimine, kasutades PREPi ja MMP-9 inhibiitoreid, mis võimaldavad kindlaks teha konkreetsete molekulide aktiivsuse. Tarvilik oleks ka uurida, kas MMP inhibiitorite rakendamisele järgneb adhesioonimolekulide taseme taastumine, mis annaks tuge inibiitorite farmakoloogilise potentsiaali katsetamiseks. Samuti võimaldaks PREPi ja MMP-9 täpse interaktsioonimehhanismi kindlaks tegemine tuvastada veelgi võimalikke sündmusi või molekule, mille inhibeerimine oleks adhesioonimolekule taastava mõjuga.

Oluline aspekt, mis lisaks käesoleva projekti raames uurimist vajab, on PSA-NCAMi ekspressiooni häirete muude põhjuste välistamine. Kuna sialüültransferaasid on PSA-NCAMi ekspressiooni tagamiseks vajalikud, uuriti immunotsütokeemiat kasutades uurimisrühma teiste liikmete poolt nende aktiivsust ja lokaliseerimist rakus. Erinevusi metsiktüüpi ja PREP ü/e rakkudel puhul ei leitud. Varasemalt on aga näidatud, et häired sialüültransferaaside töös võivad olla PSA-NCAMi häiretest tulenevate patoloogiate taga (Kröcher *et al.*, 2012).

Kui eelnevalt on seostatud PREPi ja selle inhibiitorite mõju õppimisele ja mälule eelkõige neuropeptiide lagundava toimega (Toide *et al.*, 1997), siis PREPi ja tema interaktsioonipartnerite toime NCAMi ekspressioonile võib olla uus mehhanism, mille kaudu neuropsühhiaatriliste haiguste korral NCAMi häirumine aset leiab. Nimelt on PSA-NCAM ja NCAM-180 vajalikud sünaptilises plastilisuses, mida peetakse mälu ja õppimise aluseks. Kuna PSA-NCAMi esineb palju ka täiskasvanud aju neurogeensetes piirkondades, kus sel on oluline tähtsus uute tekkinud rakkude liikumises, diferentseerumises ja neuriitide väljakasvus (ülevaade Scott ja Panin, 2014), siis PREPi roll täiskasvanueas toimuva neurogeneesi mõjutamises vajab täpsemaid uuringuid.

Üks aspekt, mida käesoleva uurimistöö tulemuste tõlgendamisel silmas tuleb pidada, on see, et katsed viidi läbi diferentseerumata neuroblastoomi rakkudel. Kuna tegemist on kasvajakudega, siis on tõenäoline, et MMPde ekspressioon on selles kõrgem kui *in vivo* neuronitel. Teisalt tekitab see küsimuse, kas NCAM võiks vähendada kasvajakude liikumist ja kas PREPi kaudu võiks see endast kujutada ka võimalikku terapeutilist sihtmärki.

Käesoleva uurimistöö viimaseks eesmärgiks oli leida ja sobivusel ka valideerida meetod, mida rakendada PREPi ekspressiooni mahasurumiseks, ning mida kasutada PSA-NCAMi ekspressiooni taastumise hindamiseks. Transfektsioonimeetodid osutusid kasutatavale rakuliinile mittesobivateks. PSA-NCAMi langust tuleks aga uurida ka primaarkultuurides, mille söötmesse on lisatud rekombinantset PREPi.

KOKKUVÕTE

Käesoleva bakalaureusetöö kirjanduse ülevaade käsitles neuropatoloogiate korral kaasnevaid raku adhesioonimolekulide ekspressiooni ja toimimise häireid. Põhjalikumalt tutvustati närvisüsteemi plastiliste sündmuste võtmevalku neuraalset raku adhesioonimolekuli ja selle polüsialüleeritud vormi. Arutlusega patoloogiliste seisundite ja mainitud molekulide häirete, kui võimalike põhjuste üle, näidati rakuvälise keskkonna häirunud proteolüüsi kui ühte selle taga olevat mehhanismi. Uurimisrühmas, kus antud töö teostati, on varasemalt prolüülendopeptidaasi näidatud, kui ühte NCAMi ekspressiooni negatiivselt mõjutavat proteaasi. Kuna avastatud seoste kohta pole eelnevalt ühtegi publikatsiooni ilmunud, näidati käesolevas töös *Western blot* meetodil neuronaalsete raku adhesioonimolekulide NCAMi, PSA-NCAMi hulga vähenemist PREP ü/e neuroblastoomi rakkudel. PREPi eelnevalt teadaolevaid ülesandeid arvestades ei ole peptidaas otseselt võimeline adhesioonimolekule lõikama, viies tema interaktsioonipartnerite otsingule. Selle tulemusena leiti uurimisrühmas, et maatriksi metalloproteinaas-9 tase on oluliselt suurenenud PREPi ü/e tingimustes. Ka käesoleva töö raames leidis nimetatud leid kinnitust. Et teha kindlaks, kas MMP-9 kui želatinolüütilise ensüümi aktiivsus on samuti suurenenud, teostati *in situ* sümograafia, mis näitas, et želatinolüüs toimub tõepoolest tunduvalt suuremas ulatuses neis rakkudes, kus PREPi ekspresseeritakse liias. Antud katsete piiranguid arvestades pole võimalik öelda, kas tegemist on vaid MMP-9 aktiivsusega või panustab sellesse ka mõni teine sarnase funktsiooniga ensüüm, näiteks MMP-2.

PREPi üle- ja PSA-NCAMi alaekspressiooni lõplikuks tõestamiseks viidi läbi PREPi *knockdown* molekuli üleekspresseerivas rakuliinis. Selleks teostati esmalt lipofektamiin-transfektsioon, mis madala efektiivsuse tõttu oodatud PSA-NCAMi taastumist ei võimaldanud. Töö autori soovitusel prooviti SH-SY5Y neuroblastoomi rakkudele rakendada ja sobivusel valideerida elektroporatsiooni. Selle transfekterimise efektiivsus osutus olevat sarnases suurusjärgus lipiid-meetodiga. Lisaks leiti, et *Western blot* abil tuvastatud niigi vähene PSA-NCAMi valguriba polnud nähtav, mis viitab, et see meetod PSA-NCAMi uurimiseks ei sobi.

Kokkuvõtteks võib käesoleva töö põhjal teha järgnevad järeldused:

1. PREP ü/e SH-SY5Y neuroblastoomi rakuliinis, kus esines suurenenud PREPi ekspressioonitase ja aktiivsuse tõus, leiti metsiktüüpi rakkudega võrreldes oluline langus neuraalse raku adhesioonimolekuli ja selle polüsialüleeritud vormi hulgas.

2. PREP ü/e SH-SY5Y neuroblastoomi rakuliinis, kus esines suurenenud PREPi ekspressioonitase ja aktiivsuse tõus, leiti oluliselt suurem MMP-9 ekspressioonitase ning želatinolüütiline aktiivsus, kui metsiktüüpi rakkudes.
3. Kasutatud transfektsioonimeetodid ei andnud küll soovitud tulemusi katsete läbiviimise seisukohast, kuid siiski saadi olulisi teadmisi selle meetodika protseduuriliste piirangute kohta.

The role of prolyl endopeptidase in altered neuronal cells' adhesion molecule expression and the evaluation of its analysis methods in neuroblastoma SH-SY5Y cell line

Kadri Pajo

SUMMARY

Altered brain plasticity seems to be one of the most common features among numerous neuropsychiatric disorders. The concept of plasticity falls back on the interactions between cells and the extracellular matrix that are mediated by adhesive forces through specialized proteins called cell adhesion molecules. One of the most prominent adhesion molecules in the nervous system is the neural cell adhesion molecule (NCAM) and its polysialylated form (PSA-NCAM). According to the previous work carried out in The Department of Pharmacology within The Faculty of Medicine at University of Tartu, PSA-NCAM and other synaptic adhesion molecules with similar functions are deprived in neuroblastoma cell lines that are overexpressing a peptide bond cleaving enzyme called prolyl endopeptidase (PREP). As PREP is only able to hydrolyze short peptide sequences its effects were theoretized to be mediated by other proteinases of the extracellular degradome which led to the discovery of a positive correlation between the expression of PREP and the matrix metalloproteinase-9 (MMP-9).

The first aim of the current bachelor thesis was to verify the previous discoveries of the negative correlations between PREP and neural cell adhesion molecules and the positive effect of PREP on MMP-9 expression by conducting Western blot assays. The results corresponded to the ones achieved earlier. In order to ascertain the possible rise in MMP-9 activity *in situ* zymography was carried out with gelatin and showed a considerable growth in overall gelatinase activity. Thirdly, in hopes of re-establishing the expression of neural cell adhesion molecules PREP knockdown through lipid transfection and electroporation were conducted. Due to low transfection efficiency no promising results were yielded.

TÄNUAVALDUSED

Soovin kannatliku meele ja hea nõu eest tänada oma juhendajat Külli Jaakot ning tänusõnad edastada ka kaasjuhendaja Mariliis Klaasile. Igakülgse toe ja usina kaasaelamise eest tänan südamest ka enda isa Risto Kivi. Moraalse toe ja minu lõputu muretsemise välja kannatamise eest ei saa samuti tänamata jätta kursusekaaslaseid Rahel Palootsa, Louise Injarabiani, Mikk Toomingut ja Kerstin Peedosaart.

KIRJANDUSE LOETELU

A) Ajakiri

Acheson, A., Sunshine, J. L., Rutishauser, U. (1991). NCAM polysialic acid can regulate both cell-cell and cell-substrate interactions. *J. Cell Biol.* 114: 143-153.

Alcaraz, G., Goridis, C. (1991). Biosynthesis and processing of polysialylated NCAM by AtT-20 cells. *Eur. J. Cell Biol.* 55: 165-173.

Altman, J., Das, G. D. (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J. Comp. Neurol.* 124: 319-335.

Angata, K., Nakayama, J., Fredette, B., Chong, K., Ranscht, B., Fukuda, M. (1997). Human STX polysialyltransferase forms the embryonic form of the neural cell adhesion molecule. Tissue-specific expression, neurite outgrowth, and chromosomal localization in comparison with another polysialyltransferase, PST. *J. Biol. Chem.* 272: 7182-7190.

Anticevic, A., Murray, J. D., Barch, D. M. (2015). Bridging levels of understanding in schizophrenia through computational modeling. *Clin. Psychol. Sci.* 3: 433-459.

Aonurm-Helm, A., Jürgenson, M., Zharkovsky, T., Sonn, K., Berezin, V., Bock, E., Zharkovsky, A. (2008). Depression-like behavior in neural cell adhesion molecule (NCAM)-deficient mice and its reversal by an NCAM-derived peptide, FGL. *Eur. J. Neurosci.* 28: 1618-1628.

Apodaca, G., Rutka, J. T., Bouhana, K., Berens, M. E., Giblin, J. R., Rosenblum, M. L., McKerrow, J. H., Banda, M. J. (1990). Expression of metalloproteinases and metalloproteinase inhibitors by fetal astrocytes and glioma cells. *Cancer Res.* 50: 2322-2329.

Apte, S. S., Parks, W. C. (2015). Metalloproteinases: A parade of functions in matrix biology and an outlook for the future. *Matrix Biol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.matbio.2015.04.005>

Barbeau, D., Liang, J. J., Robitaille, Y., Quirion, R., Srivastava, L. K. (1995). Decreased expression of the embryonic form of the neural cell adhesion molecule in schizophrenic brains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92: 2785-2789.

Barthels, D., Vopper, G., Wille, W. (1988). NCAM-180, the large isoform of the neural cell adhesion molecule of the mouse, is encoded by an alternatively spliced transcript. *Nucleic Acids Res.* 16: 4217-4225.

- Bauer, E. A., Uitto, J., Walters, R. C., Eisen, A. Z. (1979). Enhanced collagenase production by fibroblasts derived from human basal cell carcinomas. *Cancer Res.* 39: 4594-4599.
- Beer, S., Oleszewski, M., Gutwein, P., Geiger, C., Altevogt, P. (1999). Metalloproteinase-mediated release of the ectodomain of L1 adhesion molecule. *J. Cell Sci.* 112: 2667-2675.
- Bellemère, G., Vaudry, H., Mounien, L., Boutelet, I. Jégou, S. (2004). Localization of the mRNA encoding prolyl endopeptidase in the rat brain and pituitary. *J. Comp. Neurol.* 471: 128-143.
- Bessa, J. M., Ferreira, D., Melo, I., Marques, F., Cerqueira, J.J., Palha, J. A., Almeida, O. F., Sousa, N. (2009). The mood-improving actions of antidepressants do not depend on neurogenesis but are associated with neuronal remodeling. *Mol. Psychiatry.* 14: 764-773.
- Bonfanti, L., Olive, S., Poulain, D. A., Theodosis, D. T. (1992). Mapping of the distribution of polysialylated neural cell adhesion molecule throughout the central nervous system of the adult rat: an immunohistochemical study. *Neuroscience.* 49: 419-436.
- Bonnans, C., Chou, J., Werb, Z. (2014). Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15: 786-801.
- Cattaneo, A., Macchi, F., Plazzotta, G., Veronica, B., Bocchio-Chiavetto, L., Riva, M. A., Pariante, C. M. (2015). Inflammation and neuronal plasticity: a link between childhood trauma and depression pathogenesis. *Front. Cell. Neurosci.* 9: 40 <http://dx.doi.org/10.3389/fncel.2015.00040>.
- Crossin, K. L., Krushel, L. A. (2000). Cellular signaling by neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *Dev. Dyn.* 218: 260-279.
- Cunningham, B. A., Hemperly, J. J., Murray, B. A., Prediger, E. A., Brackenbury, R., Edelman, G. M. (1987). Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation, and alternative RNA splicing. *Science.* 236: 799-806.
- Dresdner, K., Baker, L. A., Orłowski, M., Wilk, S. (1982). Subcellular distribution of prolyl endopeptidase and cation-sensitive neutral endopeptidase in rabbit brain. *J. Neurochem.* 38: 1151-1154.
- Eckhardt, M., Mühlhoff, M., Bethe, A., Koopman, J., Frosch, M., Gerardy-Schahn, R. (1995). Molecular characterization of eukaryotic polysialyltransferase-1. *Nature.* 373: 715-718.

- Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., Tuschl, T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*. 411: 494-498.
- Elkins, P. A., Ho, Y. S., Smith, W. W., Janson, C. A., D'Alessio, K. J., McQueney, M. S., Cummings, M. D., Romanic, A. M. (2002). Structure of the C-terminally truncated human ProMMP9, a gelatin-binding matrix metalloproteinase. *Acta. Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 58: 1182-1192.
- Finne, J., Finne, U., Deagostini-Bazin, H., Goridis, C. (1983). Occurrence of alpha 2-8 linked polysialosyl units in a neural cell adhesion molecule. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 112: 482-487.
- Fujita-Hamabe, W., Tokuyama, S. (2012). The involvement of cleavage of neural cell adhesion molecule in neuronal death under oxidative stress conditions in cultured cortical neurons. *Biol. Pharm. Bull.* 35: 624-628.
- Fülöp, V., Böcskei, Z., Polgár, L. (1998). Prolyl oligopeptidase: an unusual beta-propeller domain regulates proteolysis. *Cell*. 94: 161-170.
- Gaggar, A., Jackson, P. L., Noerager, B. D., O'Reilly, P. J., McQuaid, D. B., Rowe, S. M., Clancy, J. P., Blalock, J. E. (2008). A novel proteolytic cascade generates an extracellular matrix-derived chemoattractant in chronic neutrophilic inflammation. *J. Immunol.* 180: 5662-5669.
- García-Horsman, J. A., Männistö, P. T. Venäläinen, J. I. (2007). On the role of prolyl oligopeptidase in health and disease. *Neuropeptides*. 41: 1-24.
- Gerard, M., Deleersnijder, A., Daniëls, V., Schreurs, S., Munck, S., Reumers, V., Pottel, H., Engelborghs, Y., Van den Haute, C., Taymans, J. M., Debyser, Z., Baekelandt, V. (2010). Inhibition of FK506 binding proteins reduces alpha-synuclein aggregation and Parkinson's disease-like pathology. *PLoS One*. 5: 2454-2463.
- Gomis-Rüth, F. X., Maskos, K., Betz, M., Bergner, A., Huber, R., Suzuki, K., Yoshida, N., Nagase, H., Brew, K., Bourenkov, G. P., Bartunik, H., Bode, W. (1997). Mechanism of inhibition of the human matrix metalloproteinase stromelysin-1 by TIMP-1. *Nature*. 389: 77-81.

- Goossens, F. J., Wauters, J. G., Vanhoof, G. C., Bossuyt, P. J., Schatteman, K. A., Loens, K., Scharpé, S. L. (1996). Subregional mapping of the human lymphocyte prolyl oligopeptidase gene (PREP) to human chromosome 6q22. *Cytogenet. Cell Genet.* 74: 99-101.
- Gould, E., Tanapat, P., McEwen, B. S., Flügge, G., Fuchs, E. (1998). Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 3168-3171.
- Gower, H. J., Barton, C. H., Elsom, V. L., Thompson, J., Moore, S. E., Dickson, G., Walsh, F. S. (1988). Alternative splicing generates a secreted form of N-CAM in muscle and brain. *Cell.* 55: 955-964.
- Greene, L. J., Spadaro, A. C., Martins, A. R., Perussi De Jesus, W. D., Camargo, A. C. (1982). Brain endo-oligopeptidase B: a post-proline cleaving enzyme that inactivates angiotensin I and II. *Hypertension.* 4: 178-184.
- Gu, Z., Kaul, M., Yan, B., Kridel, S. J., Cui, J., Strongin, A., Smith, J. W., Liddington, R. C., Lipton, S. A. (2002). S-nitrosylation of matrix metalloproteinases: signaling pathway to neuronal cell death. *Science.* 297: 1186-1190.
- Hartrodt, B., Neubert, K., Fischer, G., Demuth, U., Yoshimoto, T., Barth, A. (1982). Degradation of beta-casomorphin-5 by proline-specific-endopeptidase (PSE) and post-proline-cleaving-enzyme (PPCE). Comparative studies of the beta-casomorphin-5 cleavage by dipeptidyl-peptidase IV. *Pharmazie.* 37: 72-73.
- He, H.-T., Barbet, J., Chaix, J.-C., Goridis, C. (1986). Phosphatidylinositol is involved in the membrane attachment of NCAM-120, the smallest component of the neural cell adhesion molecule. *EMBO J.* 5: 2489-2494.
- He, H.-T., Finne, J., Goridis, C. (1987). Biosynthesis, membrane association, and release of N-CAM-120, a phosphatidylinositol-linked form of the neural cell adhesion molecule. *J. Cell Biol.* 105: 2489-2500.
- Hersh, L. B., McKelvy, J. F. (1979). Enzymes involved in the degradation of thyrotropin releasing hormone (TRH) and luteinizing hormone releasing hormone (LH-RH) in bovine brain. *Brain Res.* 168: 553-564.
- Hinkle, C. L., Diestel, S., Lieberman, J., Maness, P. F. (2006). Metalloprotease-induced ectodomain shedding of neural cell adhesion molecule (NCAM). *J. Neurobiol.* 66: 1378-1395.

- Hoffman, S., Edelman, G. M. (1983). Kinetics of homophilic binding by embryonic and adult forms of the neural cell adhesion molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80: 5762-5766.
- Hübschmann, M. V., Skladchikova, G., Bock, E., Berezin, V. (2005). Neural cell adhesion molecule function is regulated by metalloproteinase-mediated ectodomain release. *J. Neurosci. Res.* 80: 826-837.
- Irazusta, J., Larrinaga, G., González-Maeso, J., Gil, J., Meana, J. J., Casis, L. (2002). Distribution of prolyl endopeptidase activities in rat and human brain. *Neurochem. Int.* 40: 337-345.
- Jørgensen, O. S., Bock, E. (1974). Brain specific synaptosomal membrane proteins demonstrated by crossed immunoelectrophoresis. *J. Neurochem.* 23: 879-880.
- Jørgensen, O. S., Bock, E. (1975). Synaptic plasma membrane antigen D2 measured in human cerebrospinal fluid by rocket-line Immunoelectrophoresis. Determination in psychiatric and neurological patients. *Scand. J. Immunol.* 4: 25-30.
- Kalus, I., Bormann, U., Mzoughi, M., Schachner, M., Kleene, R. (2006). Proteolytic cleavage of the neural cell adhesion molecule by ADAM17/TACE is involved in neurite outgrowth. *J. Neurochem.* 98: 78-88.
- Kamori, M., Hagihara, M., Nagatsu, T., Iwata, H., Miura, T. (1991). Activities of dipeptidyl peptidase II, dipeptidyl peptidase IV, prolyl endopeptidase, and collagenase-like peptidase in synovial membrane from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Biochem. Med. Metab. Biol.* 45: 154-160.
- Kato, T., Nakano, T., Kojima, K., Nagatsu, T., Sakakibara, S. (1980a). Changes in prolyl endopeptidase during maturation of rat brain and hydrolysis of substance P by the purified enzyme. *J. Neurochem.* 35: 527-535.
- Kato, T., Okada, M., Nagatsu, T. (1980b). Distribution of post-proline cleaving enzyme in human brain and the peripheral tissues. *Mol. Cell Biochem.* 32: 117-121.
- Kirov, G., Gumus, D., Chen, W., Norton, N., Georgieva, L., Sari, M., O'Donovan, M. C., Erdogan, F., Owen, M. J., Ropers, H. H., Ullmann, R. (2008). Comparative genome hybridization suggests a role for NRXN1 and APBA2 in schizophrenia. *Hum. Mol. Genet.* 17: 458-465.

- Kleifeld, O., Van den Steen, P. E., Frenkel, A., Cheng, F., Jiang, H. L., Opdenakker, G., Sagi, I. (2000). Structural characterization of the catalytic active site in the latent and active natural gelatinase B from human neutrophils. *J. Biol. Chem.* 275: 34335-34343.
- Krog, L., Olsen, M., Dalseg, A. M., Roth, J., Bock, E. (1992). Characterization of soluble neural cell adhesion molecule in rat brain, CSF, and plasma. *J. Neurochem.* 59: 838-847.
- Kröcher, T., Malinovskaja, K., Jürgenson, M., Aonurm-Helm, A., Zharkovskaya, T., Kalda, A., Röckle, I., Schiff, M., Weinhold, B., Gerardy-Schahn, R., Hildebrandt, H., Zharkovsky, A. (2015). Schizophrenia-like phenotype of polysialyltransferase ST8SIA2-deficient mice. *Brain Struct. Funct.* 220: 71-83.
- Kröschenhausen, D. A., Hampel, H. J., Ackenheil, M., Penning, R., Müller, N. (1996). Fibrin degradation products in post mortem brain tissue of schizophrenics: a possible marker for underlying inflammatory processes. *Schizophr. Res.* 19: 103-109.
- Laumonnier, F., Bonnet-Brilhault, F., Gomot, M., Blanc, R., David, A., Moizard, M. P., Raynaud, M., Ronce, N., Lemonnier, E., Calvas, P., Laudier, B., Chelly, J., Fryns, J. P., Ropers, H. H., Hamel, B. C., Andres, C., Barthélémy, C., Moraine, C., Briault, S. (2004) X-linked mental retardation and autism are associated with a mutation in the NLGN4 gene, a member of the neuroligin family. *Am. J. Hum. Genet.* 74: 552-557.
- Lazzouni, L., Lepore, F. (2014). Compensatory plasticity: time matters. *Front. Hum. Neurosci.* 8: 340. <http://dx.doi.org/10.3389/fnhum.2014.00340>
- Levy, A. D., Omar, M. H., Koleske, A. J. (2014). Extracellular matrix control of dendritic spine and synapse structure and plasticity in adulthood. *Front. Neuroanat.* 8: 116. <http://dx.doi.org/10.3389/fnana.2014.00116>
- Livingston, B. D., Paulson, J. C. (1993). Polymerase chain reaction cloning of a developmentally regulated member of the sialyltransferase gene family. 268: 11504-11507.
- Lyons, F., Martin, M. L., Maguire, C., Jackson, A., Regan, C. M., Shelley, R. K. (1988). The expression of an N-CAM serum fragment is positively correlated with severity of negative features in type II schizophrenia. *Biol. Psychiatry.* 23: 769-775.
- Maes, M., Goossens, F., Scharpé, S., Calabrese, J., Desnyder, R., Meltzer, H. Y., (1995). Alterations in plasma prolyl endopeptidase activity in depression, mania, and schizophrenia:

effects of antidepressants, mood stabilizers, and antipsychotic drugs. *Psychiatry Res.* 58: 217-225.

Meli, D. N., Christen, S., Leib, S. L. (2003). Matrix metalloproteinase-9 in pneumococcal meningitis: activation via an oxidative pathway. *J. Infect. Dis.* 187: 1411-1415.

Mentlein, R., von Kolszynski, M., Sprang, R., Lucius, R. (1990). Proline-specific proteases in cultivated neuronal and glial cells. *Brain Res.* 527: 159-162.

Moriyama, A., Nakanishi, M., Sasaki, M. (1988). Porcine muscle prolyl endopeptidase and its endogenous substrates. *J. Biochem.* 104: 112-117.

Nacher, J., Gomez-Climent, M. A., McEwen, B. (2004). Chronic non-invasive glucocorticoid administration decreases polysialylated neural cell adhesion molecule expression in the adult rat dentate gyrus. *Neurosci. Lett.* 370: 40-44.

Nagase, H., Barrett, A. J., Woessner, J. F. Jr. (1992). Nomenclature and glossary of the matrix metalloproteinases. *Matrix Suppl.* 1: 421-424.

Nagy, V., Bozdagi, O., Matynia, A., Balcerzyk, M., Okulski, P., Dzwonek, J., Costa, R. M., Silva, A. J., Kaczmarek, L., Huntley, G. W. (2006). Matrix metalloproteinase-9 is required for hippocampal late-phase long-term potentiation and memory. *J. Neurosci.* 26: 1923-1934.

Nybroe, O., Linnemann, D., Bock, E. (1989). Heterogeneity of soluble neural cell adhesion molecule. *J. Neurochem.* 53: 1372-1378.

Okada, Y., Tsuchiya, H., Shimizu, H., Tomita, K., Nakanishi, I., Sato, H., Seiki, M., Yamashita, K., Hayakawa, T. (1990). Induction and stimulation of 92-kDa gelatinase/type IV collagenase production in osteosarcoma and fibrosarcoma cell lines by tumor necrosis factor alpha. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 171: 610-617.

Okamoto, T., Akaike, T., Sawa, T., Miyamoto, Y., van der Vliet, A., Maeda, H. (2001). Activation of matrix metalloproteinases by peroxynitrite-induced protein S-glutathiolation via disulfide S-oxide formation. *J. Biol. Chem.* 276: 29596-29602.

O'Leary, R. M., O'Connor, B. (1995). Identification and localisation of a synaptosomal membrane prolyl endopeptidase from bovine brain. *Eur. J. Biochem.* 227: 277-283.

- Olsen, M., Krog, L., Edvardsen, K., Skovgaard, L. T., Bock, E. (1993). Intact transmembrane isoforms of the neural cell adhesion molecule are released from the plasma membrane. *Biochem. J.* 295: 833-840.
- Penzen, P., Buonanno, A., Passafaro, M., Sala, C., Sweet, R. A. (2013). Developmental vulnerability of synapses and circuits associated with neuropsychiatric disorders. *J. Neurochem.* 126: 165-182.
- Pourmotabbed, T., Solomon, T. L., Hasty, K. A., Mainardi, C. L. (1994). Characteristics of 92 kDa type IV collagenase/gelatinase produced by granulocytic leukemia cells: structure, expression of cDNA in *E. coli* and enzymic properties. *Biochim. Biophys. Acta.* 1204: 97-107.
- Probstmeier, R., Kühn, K., Schachner, M. (1989). Binding properties of the neural cell adhesion molecule to different components of the extracellular matrix. *J. Neurochem.* 53: 1794-1801.
- Reyes, A. A., Small, S. J., Akeson, R. (1991). At least 27 alternatively spliced forms of the neural cell adhesion molecule mRNA are expressed during rat heart development. *Mol. Cell Biol.* 11: 1654-1661.
- Rougon, G., Deagostini-Bazin, H., Hirn, M., Goridis, C. (1982). Tissue- and developmental stage-specific forms of a neural cell surface antigen linked to differences in glycosylation of a common polypeptide. *EMBO J.* 1: 1239-1244.
- Sairanen, M., O'Leary, O. F., Knuutila, J. E., Castrén, E. (2007). Chronic antidepressant treatment selectively increases expression of plasticity-related proteins in the hippocampus and medial prefrontal cortex of the rat. *Neurosci.* 144: 368-374.
- Sakurai, K., Migita, O., Toru, M., Arinami, T. (2002). An association between a missense polymorphism in the close homologue of L1 (CHL1, CALL) gene and schizophrenia. *Mol. Psychiatry.* 7: 412-415.
- Scott, H., Panin, V. M. (2014). The role of protein N-glycosylation in neural transmission. *Glycobiology.* 24: 407-417.
- Shichi, K., Fujita-Hamabe, W., Harada, S., Mizoguchi, H., Yamada, K., Nabeshima, T., Tokuyama, S. (2011). Involvement of matrix metalloproteinase-mediated proteolysis of

neural cell adhesion molecule in the development of cerebral ischemic neuronal damage. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 338: 701-710.

Shirasawa, Y., Osawa, T., Hirashima, A. (1994). Molecular cloning and characterization of prolyl endopeptidase from human T cells. *J. Biochem.* 115: 724-729.

Small, S. J., Akesson, R. (1990). Expression of the unique NCAM VASE exon is independently regulated in distinct tissues during development. *J. Cell Biol.* 111: 2089-2096.

Soroka, V., Kolkova, K., Kastrup, J. S., Diederichs, K., Breed, J., Kiselyov, V. V., Poulsen, F. M., Larsen, I. K., Welte, W., Berezin, V., Bock, E., Kasper, C. (2003). Structure and interactions of NCAM Ig1-2-3 suggest a novel zipper mechanism for hemophilic adhesion. *Structure.* 11: 1291-1301.

Stuchlik, A. (2014). Dynamic learning and memory, synaptic plasticity and neurogenesis: an update. *Front. Behav. Neurosci.* 8: 106. <http://dx.doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00106>.

Tenorio-Laragana, J., Coret-Ferrer, F., Casanova-Estruch, B., Burgal, M., García-Horsman, J. A. (2010). Prolyl oligopeptidase is inhibited in relapsing-remitting multiple sclerosis. *J. Neuroinflammation.* 7: 23 <http://dx.doi.org/10.1186/1742-2094-7-23>.

Theodosios, D. T., Rougon, G., Poulain, D. A. (1991). Retention of embryonic features by an adult neuronal system capable of plasticity: polysialylated neural cell adhesion molecule in the hypothalamo-neurophysial system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88: 5494-5498.

Thiery, J.-P., Brackenbury, R., Rutishauser, U., Edelman, G. M. (1977). Adhesion among neural cells of the chick embryo. II. Purification and characterization of a cell adhesion molecule from neural retina. *J. Biol. Chem.* 252: 6841-6845.

Toide, K., Shinoda, M., Fujiwara, T., Iwamoto, Y. (1997). Effect of a novel prolyl endopeptidase inhibitor, JTP-4819, on spatial memory and central cholinergic neurons in aged rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 56: 427-434.

Tomasiewicz, H., Ono, K., Yee, D., Thompson, C., Goridis, C., Rutishauser, U., Magnuson, T. (1993). Genetic deletion of a neural cell adhesion molecule variant (N-CAM-180) produces distinct defects in the central nervous system. *Neuron.* 11: 1163-1174.

Ulrich, R., Gerhauser, I., Seeliger, F., Baumgärtner, W., Alldinger, S. (2005). Matrix metalloproteinases and their inhibitors in the developing mouse brain and spinal cord: a

reverse transcription quantitative polymerase chain reaction study. *Dev. Neurosci.* 27: 408-418.

Uryu, K., Butler, A. K., Chesselet, M. F. (1999). Synaptogenesis and ultrastructural localization of the polysialylated neural cell adhesion molecule in the developing striatum. *J. Comp. Neurol.* 405: 216-232.

Vaillant, C., Meissirel, C., Mutin, M., Belin, M. F., Lund, L. R., Thomasset, N. (2003). MMP-9 deficiency affects axonal outgrowth, migration, and apoptosis in the developing cerebellum. *Mol. Cell Neurosci.* 24: 395-408.

Varea, E., Guirado, R., Gilabert-Juan, J., Martí, U., Castillo-Gomez, E., Blasco-Ibáñez, J. M., Crespo, C., Nacher, J. (2012). Expression of PSA-NCAM and synaptic proteins in the amygdala of psychiatric disorder patients. *J. Psychiatr. Res.* 46: 189-197.

Vawter, M. P., Usen, N., Thatcher, L., Ladenheim, B., Zhang, P., VanderPutten, D. M., Conant, K., Herman, M. M., van Kammen, D. P., Sedvall, G., Garver, D. L., Freed, W. J. (2001). Characterization of human cleaved N-CAM and association with schizophrenia. *Exp. Neurol.* 172: 29-46.

Vine, N., Powell, J. T. (1991). Metalloproteinases in degenerative aortic disease. *Clin. Sci. (Lond).* 81: 233-239.

Walter, R., Shlank, H., Glass, J. D., Schwartz, I. L., Kerenyi, T. D. (1971). Leucylglycinamide released from oxytocin by human uterine enzyme. *Science.* 173: 827-829.

Walter, R. (1976). Partial purification and characterization of post-proline cleaving enzyme: enzymatic inactivation of neurohypophyseal hormones by kidney preparations of various species. *Biochim. Biophys. Acta.* 422: 138-158.

Wędzony, K., Chocyk, A., Maćkowiak, M. (2013). Potential roles of NCAM/PSA-NCAM proteins in depression and the mechanism of action of antidepressant drugs. *Pharmacol. Rep.* 65: 1471-1478.

Whitham, S. E., Murphy, G., Angel, P., Rahmsdorf, H. J., Smith, B. J., Lyons, A., Harris, T. J., Reynolds, J. J., Herrlich, P., Docherty, A. J. (1986). Comparison of human stromelysin and collagenase by cloning and sequence analysis. *Biochem. J.* 240: 913-916.

Wiera, G., Wozniak, G., Bajor, M., Kaczmarek, L., Mozrzymas, J. W. (2013). Maintenance of long-term potentiation in hippocampal mossy fiber-CA3 pathway requires fine-tuned MMP-9 proteolytic activity. *Hippocampus*. 23: 529-543.

Wilhelm, S. M., Collier, I. E., Marmer, B. L., Eisen, A. Z., Grant, G. A., Goldberg, G. I. (1989). SV40-transformed human lung fibroblasts secrete a 92-kDa type IV collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophages. *J. Biol. Chem.* 264: 17213-17221.

Yang, X., Hou, D., Jiang, W., Zhang, C. (2014). Intercellular protein-protein interactions at synapses. *Protein Cell*. 5: 420-444.

Yasunaga, K., Kanamori, T., Morikawa, R., Suzuki, E., Emoto, K. (2010). Dendrite reshaping of adult *Drosophila* sensory neurons requires matrix metalloproteinase-mediated modification of the basement membranes. *Dev. Cell*. 18: 621-632.

Yin, J., Yuan, Q. (2015). Structural homeostasis in the nervous system: a balancing act for wiring plasticity and stability. *Front. Cell Neurosci.* 8: 439. <http://dx.doi.org/10.3389/fncel.2014.00439>.

Yoshimoto, T., Kado, K., Matsubara, F., Koriyama, N., Kaneto, H., Tsuru, D. (1987). Specific inhibitors for prolyl endopeptidase and their anti-amnesic effect. *J. Pharmacobiodyn.* 10: 730-735.

B) Raamat

Myöhänen, T. 2008. Distribution of prolyl oligopeptidase and its colocalizations with neurotransmitters and substrates in mammalian tissues, p. 13-14, Kuopio University Publications A. Pharmaceutical Sciences 110.

KASUTATUD VEEBIAADDRESSID

1. <http://www.who.int/features/qa/55/en/> (11.05.2015)
2. <http://www.who.int/topics/schizophrenia/en/> (11.05.2015)
3. <http://www.who.int/topics/depression/en/> (11.05.2015)

LIHTLITSENTS

Mina, Kadri Pajo (sünnikuupäev 11.08.1991)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose "Prolüülendopeptidaasi roll neuronaalsete rakkude adhesioonimolekulide häirunud ekspressioonis ja selle analüüsi meetodikate hindamine neuroblastoomi SH-SY5Y rakuliinis", mille juhendajad on Külli Jaako ja Mariliis Klaas,
 - 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 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

Tartus, 25.05.2015