

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

**Põrna Lgr5-positiivsete rakkude iseloomustamine**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Ekaterina Krassohhina

Juhendaja:  
Viljar Jaks, PhD

TARTU 2017

## **Põrna Lgr5-positiivsete rakkude iseloomustamine**

Põrn on oluline organ inimese immuunsüsteemi reguleerimisel ning ilma selleta immuunsus jääb nõrgaks. Organi paremaks funktsioneerimiseks ning kahjustuse korral ravimiks on vaja teada, millised rakud on põrnas ning millist funktsiooni nad täidavad. Tüvirakumarkeri LGR5 ekspresseerivaid rakke on tõestatud maos, käärsooles ja karvafolliikulis, ning tuli mõte uurida neid rakke ka põrnas. Käesoleva töö eesmärgiks oli LGR5-positiivsete rakkude identiteed põrnas. Oli teada, et uuritavad rakupopulatsioonid on põrnas olemas ilma kahjustuse tekitamata. Immuonofluorestsentsanalüüsi abil saime teada, et meid huvitav LGR5<sup>+</sup> rakupopulatsioon on positiivne koeresidentsete makrofaagi markeri CD68 ja CD169 ning kõhunääre ja maksa eellasrakkude Sox9 suhtes ning negatiivne makrofaagi markeri F4/80 suhtes. Need tulemused aitavad paremini kirjeldada LGR5<sup>+</sup> ekspressioonimustrit ning viitavad sellele, et tegu võiks olla valge pulbi makrofaagidega.

Märksõnad: põrn, põrna regeneratsioon, valge pulbi makrofaagid

CERCS kood : B450

## **Characterization of Lgr5-expressing cells in the spleen**

The spleen is an important organ in the regulation of the mammalian immune system and without it immune system is greatly weakened. For correct spleen functioning and good regeneration people want to understand from which types of cells spleen consist. For today is know that LGR5 is a confirmed adult stem cells marker in the intestines, stomach and hair follicle. The aim of the present bachelor work was to characterize the LGR5<sup>+</sup> cells expression pattern in the spleen. Through immunofluorescence analys we found out that spleen LGR5<sup>+</sup> cells stain positive for tissue macrophage markers CD68 and CD169 and pancreas and liver progenitor cells marker Sox9 but negative for macrophage marker F4/80. In this research revealed some new properties about spleen LGR5<sup>+</sup> cells and expression pattern suggest that LGR5<sup>+</sup> cells should be white pulp macrophages.

Keywords: spleen, spleen regeneration, white pulp macrophages

CERCS: B450

## SISUKORD

SISUKORD .....	3
KASUTATUD LÜHENDID .....	4
SISSEJUHATUS .....	5
1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	6
1.1 Põrn.....	6
1.1.2 Põrna funktsioonid .....	8
1.2 Põrna regeneratsioon .....	10
1.2.1 Põrna transplantatsioon .....	10
1.2.1 Põrna regeneratsioonis osalevad rakud .....	11
1.3 LGR5 üldiseloomustus .....	13
1.3.1 LGR5 molekulaarne roll.....	13
1.3.2 LGR5 – tüvi/eellasraku marker normaalsetes kudedes ja kasvajates.....	14
1.3.3 LGR5 hematopoeetiliste rakkude markerina.....	15
2 EKSPERIMENTAALOSA .....	16
2.1 Töö eesmärgid.....	16
2.2 Materjal ja meetodika .....	17
2.2.1 Kasutatud hiireliinid.....	17
2.2.2 Hiirte genotüüpiseerimine .....	18
2.2.3 X-galaktosidaasi töötlus .....	19
2.2.4 Immuunfluorestsentsanalüüs .....	20
2.3 Tulemused.....	22
2.3.1 LGR5 <sup>+</sup> rakud on CD68 <sup>+</sup> CD169 <sup>+</sup> Sox9 <sup>+</sup> F4/80 <sup>-</sup> CB11b <sup>-</sup> CD44 <sup>-</sup> CD45 <sup>-</sup> CD133 <sup>-</sup> CD166 <sup>-</sup> .....	22
2.4 Arutelu .....	27
KOKKUVÕTE .....	28
SUMMARY .....	29
TÄNUSÕNAD .....	30
KASUTATUD KIRJANDUS .....	31
LIHTLITSENTS.....	35

## KASUTATUD LÜHENDID

CD – *cluster of differentiation* , diferentseerumise klaster

DAPI – *4',6-diamidino-phenylindole*, 4',6-diamidiino-2-fenüülindool

(D)PBS – (*Dulbecco's phosphate buffered saline*, *Dulbecco* fosfaat-puhverdatud soolalahus

LGR5 – *leucine-rich repeat-containing G protein binding receptor 5*, leutsiinirikkaid kordusi sisaldav G-valguga seonduv retseptor 5

q(PCR) – (*quantitative*) *polymerase chain reaction*, (kvantitatiivne) polümeraasi ahelreaktsioon

X-gal = 5-bromo-4-kloro-3-indool- $\beta$ -D-galaktopüranosiid

## SISSEJUHATUS

Põrn on loomorganismis väga oluline immuunvastuse kujundamisel ning vere vormelementide hulga reguleerimisel. Imetaja põrn on parenhümatosne elund, milles paljunevad ja diferentseeruvad lümfotsüüdid. Lümfotsüüdid on peamised immuunsüsteemi rakud, mis tagavad humoraalse immuunsuse, rakulise immuunsuse ja reguleerivad teiste rakutüüpide aktiivsust. Seetõttu on väga oluline tagada põrna püsiv ja korrektne funktsioneerimine, ning kahjustuste korral efektiivne regenereerumine.

Põrna kude koosneb valgest ja punasest säisist ehk pulbist. Valge pulp asub väikeste arterite ümber. Seal moodustuvad lümfotsüüdid ja valmivad antikehad. Punane pulp asub veenide ümbruses. Punases pulbis leidub kõiki vere vormelemente (Nienstedt jt, 1972). Põrnas leiduvad leukotsüüdid jaotatakse T- ja B- lümfotsüütideks, dendriitrakkudeks ja makrofaagideks (Bronte ja Pittet, 2013). Iga rakutüüp ekspresseerib iseloomulikke pinnavalke.

Viimasel ajal on paljudes kudedes kindlaks tehtud kindel tüvirakumarkermarker LGR5, mistõttu otsustasime uurida ka selliste rakkude esinemist põrnas. Senini on põrna eellasrakke väga vähe uuritud ja seetõttu on vajalikud täiendavad uurimused nende rakkude olemasolu, oletatavate omaduste ja rolli selgitamiseks

Käesoleva töö kirjanduslik osa on jaotanud kaheks suuremaks peatükiks. Esimeses osas antakse ülevaade põrna histoloogilisest ehitusest, funktsioonidest ja LGR5 rollist rakkudes ning teises osas pühendatakse põrnas esinevate rakutüüpide kirjeldamisele. Töö eksperimentaalse osa eesmärgiks oli LGR5-positiivsete rakkude uurimine ja kirjeldamine. Ilmnes, et tegemist on valge pulbi makrofaagidega. Nende rakkude olemuse täpsemaks selgitamiseks on vajalikud edaspidised uuringud, kus sorditud LGR5+ rakke iseloomustatakse täpsemalt.

# 1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE

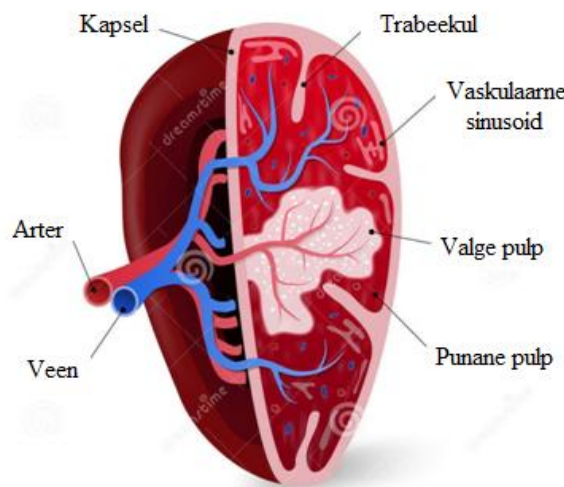
## 1.1 Põrn

Põrn on paaritu parenhümatosne organ ning suurim lümfoidne organ selgroogsetel. Põrn on peamine patogeensete mikroorganismide ja veres sisalduvate võõrantigeenide filter. Samuti omab põrn põhirolli organismi rauavahetuse ja erütrotsüütide homöostaasi säilitamisel (Brendolan jt, 2007). Kuigi põrn ei kuulu elutähtsate organite hulka, tema roll organismis on väga tähtis.

### 1.1.1 Põrna ehitus ja rakuline koosseis

Täiskasvanul inimesel on põrn 11 cm pikkune ja kaalub umbes 150 grammi. Elund on tume – sinakaspunane ja paikneb 9.-12. roiete all. Põrn paikneb kõhuõõne vasakul pool mao lähedal (Nienstedt jt, 1972).

Põrn koosneb säsist ehk pulbist, mis on ümbritsetud sidekoelise kapsliga (Joonis 1). Tal on kaarjas välispind ja nõgusal poolel on põrnavärat, milles veresooned väljuvad ja sisenevad. Kapsel ja trabeekulid moodustavad kontraktiilise aparraadi, mis hõlmab 5-7% põrna mahust. Trabeekulite vahel asub põrna pulp, mis jaotab omavahel kaheks punase pulbi ja valge pulbi (Brendolan jt, 2007).



**Joonis 1.** Põrna ehitus. Põrn on ümbritsetud kapsliga. Trabeekulid ja kapsel moodustavad kontraktiilise aparraadi. Põrnal on olemas ka põrnas arter ja veen, mis moodustavad põrnas

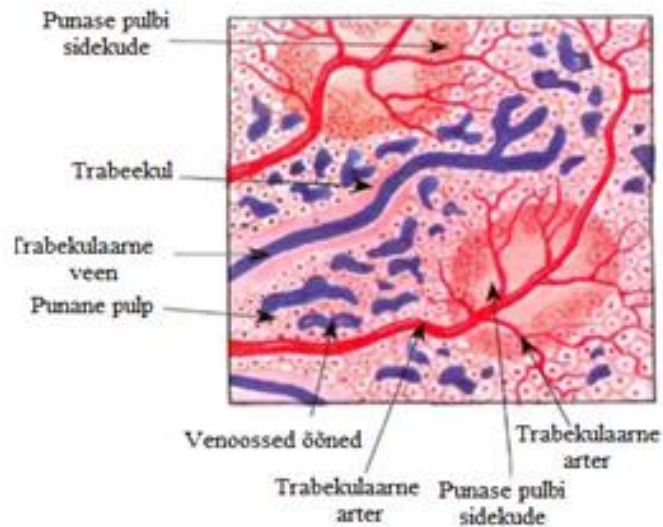
vaskulaarsed sinusoidid. Valges pulbis moodustuvad B- ja T- lümfotsüüdid ning punane pulp kontrollib erütrotsüütide ja trombotsüütide homöostaasi.

(Modifitseeritud, pilt: <https://www.anatomylibrary99.com/wp-content/uploads/2016/08/anatomy-of-stomach-and-spleen-human-spleen-anatomy-human-anatomy-diagram.jpg>)

Punane pulp moodustab umbes 80% põrna massist ja täidab erinevaid funktsioone. Näiteks kontrollib punane pulp erütrotsüütide ja trombotsüütide seisundit, eemaldab vajadusel vanad ja kahjustatud rakud, tagab lümfoidrakkude küpsemise ning monotsüütide diferentseerumise makrofaagideks (Brendolan jt, 2007).

Valge pulp moodustab umbes 20% põrna massist. Valge pulbi stroomat moodustab retikulaarne sidekude. Just valges pulbis küpsevad T- ja B-lümfotsüüdid. Seega, valge pulbi peamine funktsioon on immunfunktsioon. Valges pulbis toimub võõrkehade identifitseerimine ja antikehade moodustumine, mis vahendavad immuunvastust kehavõõrastele objektidele (bakterid, viirused, muutunud antigense struktuuriga valgud ja neid kandvad rakud)

Valge ja punase pulbi vahelisel piiril, marginaal sinuse kõrval asub marginaal ala. Sellele alale on iseloomulik spetsiifilised makrofaagid, mis osalevad organismi antibakteriaalses kaitses (Brendolan jt, 2007).



**Joonis 2.** Põrna mikrostruktuur. Põrnakude koosneb parenhüümist, mis jaotub valgeks ja punane pulbiks. Trabekulid, mis moodustavad põrna strooma koosnevad kollageenikiududest, mis tugevdavad parenhüümi ning neis asuvad veenid ja arterid.

(Modifitseeritud, pilt : <http://tardokanatomy.ru/sites/default/files/selezenka.png>)

### 1.1.2 Põrna funktsioonid

Inimorganismis on organid mille olemasolu ja funktsioonid on vältimatult vajalikud ja nende puudumine on letaalne. Põrn ei kuulu nende organite hulka, sest tema funktsioone saavad täita teised organid, kuigi nad teevad seda madalama kvaliteediga.

Põrna esmaaseks funktsiooniks on embrüonaalne vereloome. Peale sünni omandab põrn immuunvastust ja vereelementide homöostaasi reguleerivad funktsioonid.

Kõige oluline funktsioon, mis põrn täidab on immuunfunktsioon. See seisneb kahjulikke ainete kogumises ja töötlemises ning vere puhastamise erinevatest võõrorganismidest nagu bakterid ja viirused, ning esitleb neid immuunsüsteemile edasi immuunvastuse aktivatsiooniks.. Põrnas toimub võõrantigeenide esitlemine immuunkompetentsetele rakkudele (T ja B lümfotsüüdid), mis initsieerivad keeruka immuunvastuse. Selle üheks väljundiks on antigeeni spetsiifiliste

antikehade süntees küpsete B-rakkude poolt, mis omakorda tagavad sissetungija neutraliseerimise (Crosby, 1959). Seega kahjustatud põrna korral või selle eemaldamisel immuunsüsteemi võime organismi kaitsta langeb märgatavalt.

Oluline on ka tsirkuleerivate verevormelementide (erütrotsüütide ja trombotsüütide) homöostaasi kontrollfunktsioon. Erütrotsüütide füsioloogiline surm saabub kui nad saavutavad 120-päevase vanuse. Nendest erütrotsüütidest taaskasutavad põrnas olevad makrofaagid rauda, mis seostub oma transportvalguga transferriniga ning transporditakse uuesti luuüdissse. Seetõttu põrn osaleb rauavahetuses. Praeguseks ei ole veel teada, kuidas fagotsüüdid eristavad vanu ja elujõulisi rakke. On näidanud, et põrn omab võimet ära tunda ka vähem defektseid rakke (Crosby, 1959).

Ilma põrnata on võimalik elada, sest vastavaid funktsioone võivad täita ka teised organid (näiteks lümfisõlmed), aga selle elundi puudumisel on omad tagajärjed.

Põrna operatiivset eemaldamist nimetatakse splenektoomiaks. Splenektoomia peamiseks näidusteks on põrnarebend, mis tekib harilikult traumade tagajärjel, trombotsüütide või erütrotsüütide liigse lagundamisega seotud seisundid ja mõned vereloome kasvajalised haigused, millega kaasneb tugev põrna suurenemine ja põrnarebendi oht (Weledji, 2014).

Iga organi puudumine või eemaldamine toob oma tagajärgi.. Kuna põrna peamine funktsioon on immuunfunktsioon siis organismi võime ennast kaitsta langeb märgatavalt ning kasvab infektsiooni risk. Teiseks tagajärjeks võib olla trombide moodustumiste tõenäosuse tõus trombotsüütide hulga suurenemise tõttu, mis võib tekitada elutähtsate organite verevarustuse häireid ning raskemal juhul kaasa tuua letaalse lõppe. Lisaks võib põrna eemaldamine viia pankreatiidi ehk kõhunäärme põletiku tekkele, mille tagajärjel halveneb teiste organite seisund. Selleks, et neid probleeme vältida, tuleb pöörata suuremat tähelepanu õigele toitumisele, vaksineerida levinumate nakkushaiguste vastu ning tegeleda mõõdukalt spordiga.

## **1.2 Põrna regneratsioon**

Põrna suurenemine on harilikult tingitud teiste organite haigustest. Näiteks suureneb põrn sageli hepatiidi või maksatsirroosi korral. Põrna suurenemine on sel juhul reaktsioon põrna läbiva vere hulga suurenemisele, kuna maksahaiguse tõttu tekib pais alumis õõnesveeni süsteemis. Samuti põhjusteks võib nimetada vereloomekasvajaid, mis võivad lokaliseeruda põrnas ning põhjustada põrnaveeni tromboosi.

Põrna rebendid jaotuvad kaheks rühmaks, kas üksikuks või mitmeseks. Kui trauma tagajärjel toimub üksik rebend, siis alguses saab kahjustatud ainult parenhüüm (pulp), mille tagajärjel moodustub kapslialune hematoom. Kui trauma kordub, siis toimub kapsli rebend ning hematoom murrab läbi kõhuõõnde. Ajalooliselt on peamine põrna ravimeetod olnud splenektoomia, aga tänapäeval üritatakse võimalusel organ säilitada. Selleks kasutatakse osalist põrna eemaldamist (põrnareseksioon) ning põrnakapsli õblemist (Gamme jt, 2013).

### **1.2.1 Põrna transplantatsioon**

Põrnakude saab transplanteerida peaaegu kõigisse kehapiirkondadesse, aga kõhuõõs ja nahaalune kude pakuvad parimat põrnakoe implantatsiooniks parimat võimalust.. Arvatavasti on see seotud sellega, et seal on rikkas verevarustus (Holdsworth, 1991).

Tavassoli postuleeris, et põrna kasvu reguleerib humoraalne faktor, aga see ei ole siiani kindlaks tehtud (Holdsworth, 1991). Selle tõdemuseni viisid järgmised vaatlusandmed: transplanteeritud põrna fragmendid ei kasva kui põrn on olemas ning eksisteerib teatud maksimaalne suurus, milleni transplanteeritud põrnafragmendid kasvavad. Huvitaval kombel ei sõltu transplantaadi lõplik mass algsest implanteeritud koe mahust.

Põrnakoe transplantatsiooniks kasutatakse soovitatult oma eemaldatud põrna tükikesi (autotransplantatsioon). Põrna implantaate nimetatakse splenosoomideks ja on vajalik kunstlik ühendus organismi verevarustusega (Khan, 2014).

Põrna replantatsioonil muutub transplantaadi kude hepatotsellulaarseks ning lümfoidne kude kaob. Lümfoidsed elemendid ilmuvad alles hilises regeneratsiooni staadiumis. Kui põrnatüki sidekoe võrgustik oli revaskulariseerunud siis lümfoidkude täitub ringlevate lümfotsüütide arvelt (Monsivais jt, 1985).

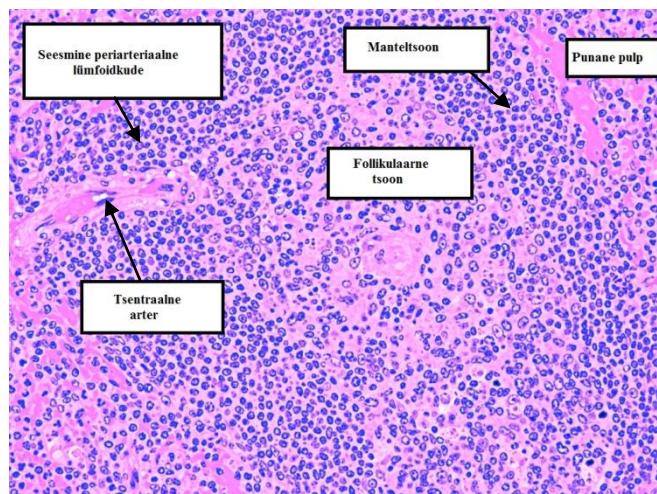
Esimese nelja päeva jooksul tekib osa siirdatud põrnakoe nekroos. Sellele järgneb sidekoe regeneratsioon ja diferentseerumine põrna retikulaarrakkudeks. Järgmise kaheksa päeva jooksul toimub veresoonte sissekasv ning lümfotsüütide infiltratsioon veresoonte ümbrusesse. Ja viimaseks toimub valge pulbi diferentseerumine viie nädala jooksul (Riera jt, 2009).

Tänu põrna transplantaadile väheneb trombotsütoosi risk, suureneb immuunoglobuliinide tase ja normaliseerub vere vormelementide arv (Connell jt, 2011).

### 1.2.2 Põrna regeneratsioonis osalevad rakud

Põrn on jaotatud kaheks pulbiks – valgeks ja punaseks (Joonis 2) ning nende pulbide vahel asub marginaalne tsoon. Valge pulp on moodustub erinevatest immuunvastuses osalevatest rakutüüpidest nagu lümfotsüüdid, plasmotsüüdid, makrofaagid ja dendriitrakud ning selle stroomaks on retikulaarne kude. Eelpool nimetatud rakkude kogumid moodustavad põrnafollikuli, mis omab 3 tsooni (Elmore, 2006) :

- 1) seesmine periarteriaalne lümfoidkude
- 2) follikulaarne tsoon koos reaktiivtsentriga
- 3) marginaal- ehk manteltsoon, kus asuvad antigeeni presenterivad rakud (APC – antigen presenting cells)



**Joonis 3.** Põrnafollikulis olevad tsoonid.

(pilt : [http://medcell.med.yale.edu/histology/immune\\_system\\_lab/spleen\\_white\\_pulp.php](http://medcell.med.yale.edu/histology/immune_system_lab/spleen_white_pulp.php))

Periarteriaalse tsooni moodustavad T-lümfotsüütide kogumid põrna arteri haru ümber ning selles tsoonis on ka palju makrofaage, mis on võimelised fikseerima enda pinnal antikeha-antigeen komplekse ja esile kutsuma T-lümfotsüütide küpsemist. Follikulaarne tsoon moodustub kompaktsel paiknevatest B-lümfotsüütidest ja väiksest kogusest T-lümfotsüütidest, plasmarakud ja makrofaagidest. Reaktiivtsenter asub lümfifolliikuli keskel, seal sisalduvad B-lümfoblastid, tüüpilised makrofaagid ja dendriittrakud. Reaktiivtsentrite esinemine on vastus antigeense stimulatsiooni peale. Marginaal tsoon on koht, kus valge pulp läheb üle punaseks pulbiks ning on moodustatud T- ja B- lümfotsüütidest, makrofaagidest ja on ümbritsetud sinusoidaalse kapillaaridega. Kui lümfotsüüdid on küpsenud siis toimub reaktiivtsentrist ning periarteriaaltsentrist üleminek marginaaltsooni ning edasi vereringesse (Guilliams jt, 2014).

Punane pulp moodustab 4/5 põrna mahust ning kujutab endast peamiselt punaliblede kogumit. Lisaks erütrotsüütide reservuaarile ning vanade erütrotsüütide elimineerimisele toimub punases pulbis ka B-lümfotsüütide transformatsioon plasmotsüütideks ning monotsüütide transformatsioon makrofaagideks. Hävinud erütrotsüütide hemoglobiin utiliseeritaks bilirubiiniks ja ning vabanenud raud seotakse transferriniga. Luuüdi makrofaagid püüavad vereringes olevad transferrini molekulid ning nendega seondunud rauda kasutatakse uuesti hemoglobiini sünteesiks uute erütrotsüütide tekkel (Davies jt, 2013).

### 1.3 LGR5 üldiseloostus

On kogunenud arvestatav hulk andmeid, mis lubavad väita, et LGR5 (*Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5*) on usaldusväärne täiskasvanud organismi tüvirakumarker (McDonalt jt, 1998). Uuringud näitasid, et LGR-5 positiivsed soolerakud on multipotentsed ja pikaealised (Barker jt, 2007). Seda markerit ekspresseeritakse erinevates kudedes näiteks jämesooles, peensooles, maos ja karvafolliikulis (Barker ja Clevers, 2010).

LGR5 avastati 1998 aastal, kui S. Hsu koos kolleegidega kloneerisid kaks geeni, mille produktid sarnanesid türoid stimuleeriva hormooni, folliikuleid stimuleeriva hormooni ja luteiniseeriva hormooni retseptoritele. Need valgud erinesid teistest retseptoritest selle poolest, et neil on suur N-terminaalne ekstratsellulaarne domään. LGR5 valku ektodomäänid sisaldavad 17 leutsiinirikast kordust, mille juurde külgnevad N- ja C-terminaalsed tsüsteiinirikad järjestused. Ektodomääni vastutab ligandi seondumise eest.

LGR5 retseptori ligand on R-spondiin 1 (Carmon jt, 2011). Lgr5 retseptori ja tema ligandi omavaheline seondumine on tähtis Wnt signaalirajas, kus interaktsiooni tulemusel võimendatakse signaali ülekannet (de Lau jt, 2011). Tüviraku enesetaastuse võimet ja multipotentsust (diferentseerimist erinevateks rakutüüpideks) reguleerivad erinevad kasvufaktorid ja Wnt valgud (Muñoz-Descalzo jt, 2012). Kogutud andmed näitavad, et Wnt signaalirada mängib põhilist rolli pluripotentsuse säilitamises ja somaatiliste rakkude ümberprogrammeerimise protsessides (Fernandes jt, 2014).

#### 1.3.1 LGR5 molekulaarne roll

Nagu mainitud, osaleb LGR5 Wnt signaalirajas. Wnt signaalirada reguleerib embrüogeneesi, rakkude diferentseerumist ning pahaloomuliste kasvujate arengut. Kindlasti ka mängib olulist rolli embrüonaalses arengus ning täiskasvanud tüvirakkude uuendamises ja hoolduses. Wnt rajas signaalide ülekande defektsusega olid seotud paljud haigused, nagu vähk, diabeet ja neurodegeneratiivsed haigused (Barker ja Clevers, 2010).

Wnt signaaliraja aktiivsust reguleerivad lisaks klassikalistele ligandidele (Wnt valgud) ka R-spondiinid, mis omavad pleiotroopseid funktsioone tüvirakkude aktiivsuse reguleerimisel. Selles

perekonnas on 4 esindajat: RSPO1-4. On näidatud, et RSPO1 seondub tugevalt LGR5-ga ka rakkude pinnal (Ruffner jt, 2012). RSPO1 omakorda ekspresseeritakse näiteks Panethi rakkudes, mis ümbritsevad LGR5+ rakke ja moodustavad neile rakunišši (Carmon jt, 2011). LGR5 signaliseerimine aitab limiteerida Wnt raja aktiivsust ja seega reguleerib tüvirakkude jagunemisaktiivsust

Teisalt on LGR5 Wnt raja märklaudgeen ning üleekspresseeritud mitmetes kasvajates, milles on leitud püsivalt aktiivne Wnt rada (maksakasvajad, munasarjakasvajad) (McDonald jt, 1998). Tema roll kasvaja tekkes ja arengus ei ole veel välja selgitatud.

### **1.3.2 LGR5 – tüvi/eellasraku marker normaalsetes kudedes ja kasvajates**

LGR5 on tüviraku marker soolestikus, maos ja karvafolliikulis (Barker ja Clevers, 2010). Mao tüvirakkude arvatavaks asukohaks on maonäärme põhi, on küll ka teisi arvamusi, aga puuduvad paremad rakumarkerid, mis aitaksid seda küsimust lahendada. Tehtud uuringud näitasid, et vastündinud hiirel on LGR5-positiivsed rakud üle kogu areneva mao, kuid täiskasvanul hiirel leidub LGR5-positiivseid rakke vaid kindlates mao piirkondades. Maos olevad tüvirakud, mis ekspresseerivad *Lgr5* tagavad mao epiteeli uuenemise (Barker ja Clevers, 2010).

Soolestikus on leitud, et LGR5 on sooleepiteeli tüvirakkude marker. *Lgr5* avaldub tüvirakkudes, mida nimetatakse krüpti põhja sammasrakkudeks ehk CBC-rakud (H.Cheng ja C.P. Leblond, 1974), (Barker jt, 2007). Need krüpti sammasrakud erinevad Panethi rakkudest selle poolest, et neil on suur rakutuum ning väike tsütoplasma hulk. Tänu sellele võib neid rakke eristada teistest rakutüüpidest (Cheng, ja Leblonf, 1974).

Karvafolliikulites olevad tüvirakud asuvad piirkonnas, mida nimetatakse karvasibulaks (Cotsarelis jt, 1990). Just karvasibulas olevad multipotentsed tüvirakud ekspresseerivad *Lgr5* valku. Karvafolliikuli areng toimub kolmes faasis: kasvufaas, taandarengufaas ja puhkefaas. Eelpoolt nimetatud tüvirakud paljunevad aktiivselt kasvufaasis ning nad saavad diferentseeruda kõikideks karvafolliikuli rakutüüpideks (Cotsarelis jt, 1990; Jaks jt, 2008).

Kui vaadata LGR5 mitte normaalses koes vaid kasvajates, siis võib näha, et terves koes on LGR5+ rohkem, kui kasvajates (Curcio jt, 2015). Kui aga uuriti pärasoolevähi teket, siis leiti, et LGR5 kadumisel tegelikult suureneb kasvaja risk ning invasiivsus. LGR5 üleekspresseerimisel kasvaja risk muutus väiksemaks. See tähendab, et LGR5 ei ole onkogeen, vaid kasvaja supressor geen ja tema peamiseks ülesandeks on piirata tüvirakkude paljunemist nende vastavates niššides (Walker, 2011).

### **1.3.3 LGR5 hematopoeetiliste rakkude markerina**

Hematopoeetiline tüvirakk ehk vereloome tüvirakk on punases lüüdis paiknev multipotentne vereloomerakk, mis areneb embrüonaalsetest hematopoeetilistest tüvirakkudest (Birbrair ja Frenette, 2016).

On teada, et hematopoeetilised tüvirakud paljunevad *in vivo* inimese organismis üks kord neljakümne nädala jooksul. Nad on vererakkude algused eelkäijad, mis annavad alguse kõikidele teistele vererakkudele ja pärinevad ise hemangioblastidest ja prehemangioblastidest. Nad annavad alguse nii müeloid rakkudele kui ka lümfoid-rakkudele. Viimase 50 aasta jooksul on just hematopoeetilise tüvirakkude uurimine andnud tõe kogu tüvirakkude uurimisele ning lisaks on nende avastamine teinud võimalikuks hematopoeetiliste rakkude transplantatsioonil pahaloomuliste kasvaja ravimise (Birbrair ja Frenette, 2016).

Lgr5 ekspressiooni kohta vereloomekoes on kirjanduses vaid üksikuid näiteid. Lisaks on teada, et Lgr5+ rakud tsirkuleerivad veresüsteemis ja neid leidub ka seljaajus ning nad võivad funktsioneerida peaaegu kõikides koetüüpides (Barker ja Clevers, 2010).

Liu ja kolleegid näitasid, et Lgr5 märgib multipotentseid kuid lühiealisi hematopoeetilisi tüvirakke embrüonaalsetes vereloomeorganites (Liu jt., 2014).

## **2 EKSPERIMENTAALOSA**

### **2.1 Töö eesmärgid**

Käesolev bakalaureuse töö on osa Viljar Jaksi töörühmast läbiviidavast uurimistööst, mille käigus iseloomustatakse LGR5 markerit kandvaid rakke erinevates organites. Kuna varasmate uuringute käigus ilmnes, et põrnas on LGR5-positiivsed rakud (Lõhmussaar, 2014) – siis käesoleva lõputöö eesmärgiks oli määrata LGR5 - positiivsete rakkude täpne identiteet.

## 2.2 Materjal ja meetodika

### 2.2.1 Kasutatud hiireliinid

Käesoleva bakalaureusetöös kasutati LGR5- positiivsete rakkude kirjeldamiseks mõlemast soost LGR5<sup>LacZ</sup> heterosügootseid hiiri, mis saadi tabelis 1 väljatoodud hiireliinide omavahelisel ristamisel.

**Tabel 1.** Kasutatud hiireliinid.

<b>Hiireliin</b>	<b>Kirjeldus</b>	<b>Saamise meetod</b>	<b>Päritolu</b>
LGR5 <sup>LacZ</sup> wt	C56/B16 geneetiliselt modifitseerimata hiireliin	<i>knock-in</i>	TÜMRI vivaarium

Katseloomi hoiti ja paljundati Tartu Ülikooli Molekulaar- ja Rakubioloogia Instituudis. Eluruumis oli õhutemperatuur  $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ , ning loomad elasid 12 tundi valguses ja 12 tundi pimeduses režiimil. Juurdepääs toidule ja veele oli vaba. Kuna töö autor ei omanud katseloomade käsitlemise luba siis külmutatud põrna preparaadid valmistas ette Rakubioloogia õppetooli doktorant Janeli Viil.

## 2.2.2 Hiirte genotüpiseerimine

Selleks, et katseloomi omavahel eristada anti igale sündinud järglasele unikaalne kood, mis koosnes hiire pesakonna- ja järjekorranumbrist. Genotüpiseerimise läbiviimiseks oli vaja DNA-d, mis eraldati hiirte sabadest. Selleks, et eraldada DNA, iga sabatükk pandi tuubi, sinna lisati 75µl lüüsipuhvrit (25 mM NaOH, *AppliChem* ja 0,2 mM EDTA pH8.0, *Sigma-Aldrich*) ning inkubeeriti proove 95°C juures 40-60 minutit. Selle etapi lõppemisel lisati tuubidesse täiendavalt 75µl neutralisatsioonipuhvrit (40 mM Tris·HCl pH~5, *Reahim*). Viimaseks segati tuub 1 minut vortexil. Saadud DNA lahuseid külmutati -20°C juures.

LGR5<sup>+</sup> genotüüpide kindlakstegemiseks kasutati polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR, *polymerase chain reaction*). Tabelis 2 on välja toodud kasutatud praimerite järjestused, eeldatav produktide pikkus ning sihtmärk.

**Tabel 2.** Kasutatud PCR-i praimerid. F-pärisuunaline; R-vastassuunaline; wt-positiivne kontroll ehk metsiktüüp; bp – aluspaar.

Praimerite komplekt	Praimeri järjestus 5' → 3' suunas	Produkti pikkus	Tuvastab
LGR5	F 5'-CCTCTTTGCTAAACCTCACC-3'	673 bp	wt
	R 5'-ACGAGTCTTCTCACTATGGG-3'		
LGR5	F 5'-GCAGCGCATCGCCTTCTATC-3'	467 bp	LGR5-LacZ mutant
	R 5'-ACGAGTCTTCTCACTATGGG-3'		

Iga PCR-iks valmistati 20 µl lõppmahuga reaktsioonisegu. Segu sisaldas 4µl 5x FIREPol® Master Mix puhvrit (Solis BioDyne), 50 pg praimereid, 2 µl DNA-d ning lõppmahtuni viidi lisades mQ-vett. PCR-i läbiviimiseks kasutati Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler (Life Technologies) PCR aparati.

PCR protokoll:

<b>Etapid</b>	<b>Temp.</b>	<b>Aeg</b>	
1. Algne denaturatsioon	94°C	5 min	
2. Denateratsioon	94°C	30 sek	} 30 tsükli
3. Praimerite seondumine	64°C	30 sek	
4. Elongatsioon	72°C	30 sek	
5. Lõplik ekstensioon	72°C	5 min	

PCR-i produktide pikkuse hindamiseks kasutati agaros-geeleelektroforeesi. Selleks valmistati 1,7%) agarosgeel (Lonza), millele lisati UV-lainpikkusel fluorestseeruvat etiidiumbromiidi lõppkontsentratsioon on 0,01µg/µl. DNA fragmentide pikkuste kindlaksmääramiseks kasutati kindla pikkusega DNA fragmentidest koosnevat markerit (50 bp DNA ladder, Thermo Scientific).

### 2.2.3 X-galaktosidaasi töötlus

Selle töötluse läbiviimiseks olid pestud klaasidele eelfikseeritud koe lõigud. Neid pesti 2 korda 5 min Rinse puhvris. Järgmiseks etapiks oli vajalik X-gal lahjenduspuhver, mis sisaldas 2 mM MgCl<sub>2</sub> (AppliChem) ja 0,01% Nonidet® P40 (AppliChem) 1x PBS-is. Eelpool nimetatud lahjenduspuhver oli vajalik spetsiaalse töölause valmistamiseks, milles inkubeeriti koelõike.

Enne töölause kasutamist lisati lahjenduspuhvri 5 mM lõppmolaarsusega K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> ja K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> (Sigma-Aldrich) ning X-gal-i (5-bromo-4-kloro-3-indool-β-D-galaktropüranosiid) 20mg/ml (Sigma-Aldrich) lahust N,N-dimetüülformamiidis (DMF; Acros Organics) suhtes 1:40-le.

Klaasid koetükkidega fikseeriti teipiga aluse peale ning peale pandi valmistatud töölause. Inkubatsioon toimus 24 tundi pimedas niiskes kambris 37°C juures. Järgmisel päeval eemaldati

koetükidelt X-gal töölahus, pesti 2 korda 5 minutit Rinse puhvris, mille järel sulundati klaasid sulundusvedelikuga (*Dako*) või jätkati immuunfluorestsentsanalüüsiga.

#### **2.2.4 Immuunfluorestsentsanalüüs**

X-gal'i töötuse läbinud klaase koelõikedega pesti 2 korda 5 min Rinse puhvris. Peale pesu pandi igale koetükile peale 100 µl 1-list% lõssilahust (*AppliChem*), mis sisaldas 0,1% TritonX-100 (*AppliChem*) et blokeerida antikehade mittespetsiifilist seondumist. Eelpoolt nimetatud lahust inkubeeriti toatemperatuuril 10 min. Järgnevalt eemaldati lõssilahus ja teostati koeproovide täiendav blokeerimine 4% eesli seerumi-PBS lahuses 60 min toatemperatuuril. Peale blokeerimist inkubeeriti koelõike primaarsete antikehadega (Tabel 3).niisutatud kambris 4°C juurde üleöö.

Järgmisel päeval eemaldati koelõikudelt primaarse antikeha lahus ning pesti neid 1x PBS-iga 3 korda 5 minutit. Peale pesemist inkubeeriti koelõike sekundaarse antikeha (Tabel 3) lahusega 1 tund pimedas. Järgmiseks pesti koelõike pimedas 3 korda 5 minutit 1x PBS-is ning värviti tuumad DAPI lahusega (lõpp kontsentratsioon on 1µg/ml, *Sigma*) 1x PBS-is 2 minutit ning peale seda teostati viimane pesu 1x PBS 2 minutit. Viimaseks viidi läbi sulustamine *Fluorescent Mounting Medium* lahusega (*Dako*). Valmis preparaate vaadeldi ja pildistati Olympus BX51 fluorestsentsmikroskoobiga, kujutisi töödeldi Hokawo pilditöötuse programmiga (*Hamamatsu Inc.*). Et paremini visualiseerida X-gal töödeldud rakke liitpiltidel, siis kasutati nende loomisel X-gal värvitud kujutiste negatiivne.

**Tabel 3.** Kasutatud antikehad ja nende lahjendused

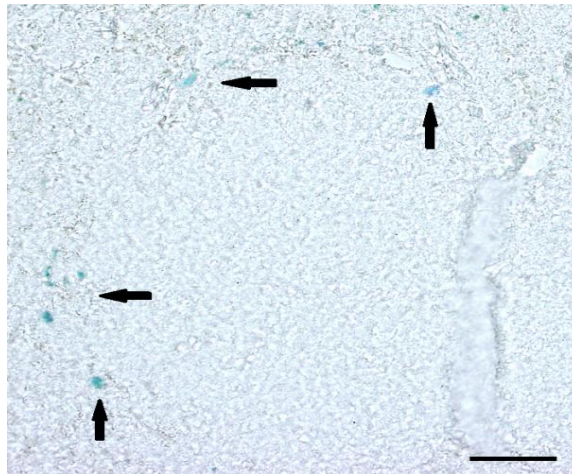
<b>Primaarsed antikehad</b>	<b>Peremees-organism</b>	<b>Lahjendus</b>	<b>Märklaud</b>	<b>Päritolu</b>
CD68-PE	rott	1:100	hiire makrofaagid	<i>eBioscience</i>
CD11b-PE	rott	1:100	hiire makrofaagid	<i>BD Biosciences</i>
F4/80	rott	1:50	hiire makrofaagid	<i>Novus Biologicals</i>
SMA	küülik	1:500	hiire tähtrakud	<i>R&amp;D Systems</i>
Desmiin	kits	1:100	hiire tähtrakud	<i>R&amp;D Systems</i>
CD44-PE	rott	1:100	hiire tüvirakud	<i>Invitrogen</i>
CD45-PE	rott	1:100	hiire vereloomerakud	<i>eBioscience</i>
CD133-PE	rott	1:100	hiire tüvirakud	<i>eBioscience</i>
CD166-PE	rott	1:100	hiire sapiteelerakud	<i>eBioscience</i>
CD169-PE	rott	1:500	hiire makrofaagid	<i>eBioscience</i>
SOX 9	küülik		hiire sapiteelerakud	<i>Millipore</i>
<b>Sekundaarsed antikehad</b>	<b>Peremees-organism</b>	<b>Lahjendus</b>	<b>Märklaud</b>	<b>Päritolu</b>
D $\alpha$ R-Alexa 594	eesel	1:1000	roti antigeen	<i>Life Technologies</i>
D $\alpha$ R-Alexa 647	eesel	1:1000	roti antigeen	<i>Jackson Immuno Research</i>
D $\alpha$ G-Alexa 488	eesel	1:1000	kitse antigeen	<i>Life Technologies</i>
D $\alpha$ Rb-Alexa 488	eesel	1:1000	küüliku antigeen	<i>Life Technologies</i>

D $\alpha$ R = donkey-anti-rat; D $\alpha$ G = donkey-anti-goat; D $\alpha$ Rb = donkey-anti-rabbit.

## 2.3 Tulemused

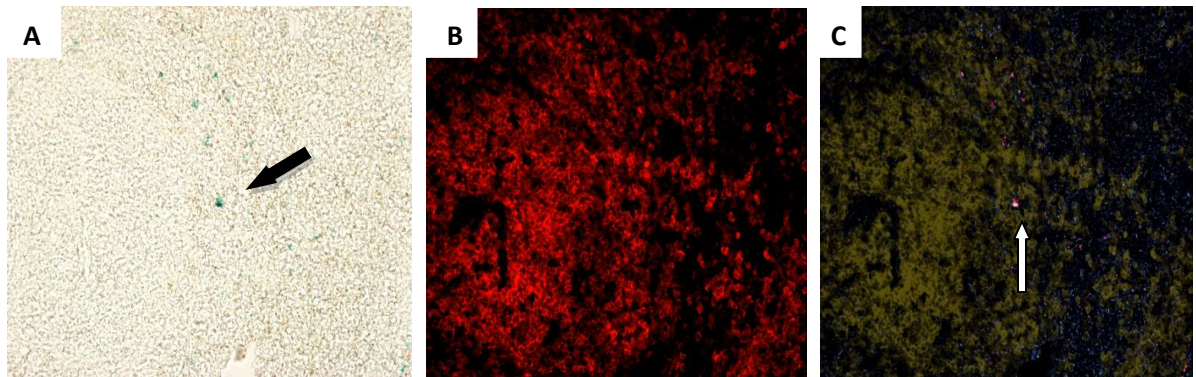
### 2.3.1 LGR5<sup>+</sup> rakud on CD68<sup>+</sup>CD169<sup>+</sup>Sox9<sup>+</sup>F4/80<sup>-</sup>CD11b<sup>-</sup>CD44<sup>-</sup>CD45<sup>-</sup>CD133<sup>-</sup>CD166<sup>-</sup>

Et uurida LGR5<sup>+</sup> rakkude identiteedi põrnas kasutati raku pinnamarkerite immunofluorestsentsanalüüsi kombineerituna X-gal värvimisega (Joonis 4). See meetod võimaldab meid huvitava populatsiooni kõige paremat iseloomustamist. Sellel analüüsil kasutati peamiselt makrofaagide alampopulatsioonide vastaseid antikehi, kuna varasematest katsetest meie grupis oli teada, et maksas on LGR5<sup>+</sup> rakkude pinnal ekspresseeritud makrofaagide markerid.

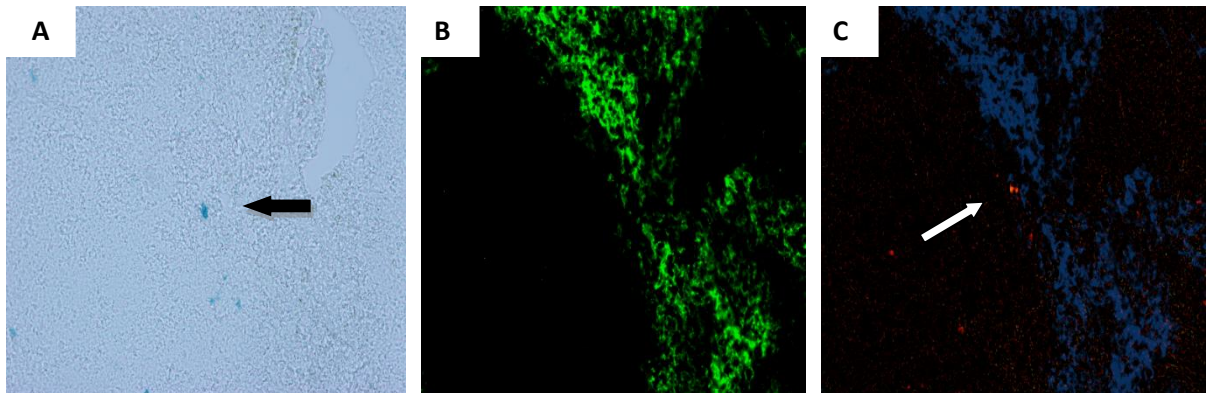


**Joonis 4.** LGR5<sup>+</sup> rakud asuvad põrna folliikuli marginaalsoonis. X-gal'i töötluse läbinud preparaadi pilt. Nooled osutuvad LGR5<sup>+</sup> rakkudele. Mõõtlõik 80 µm.

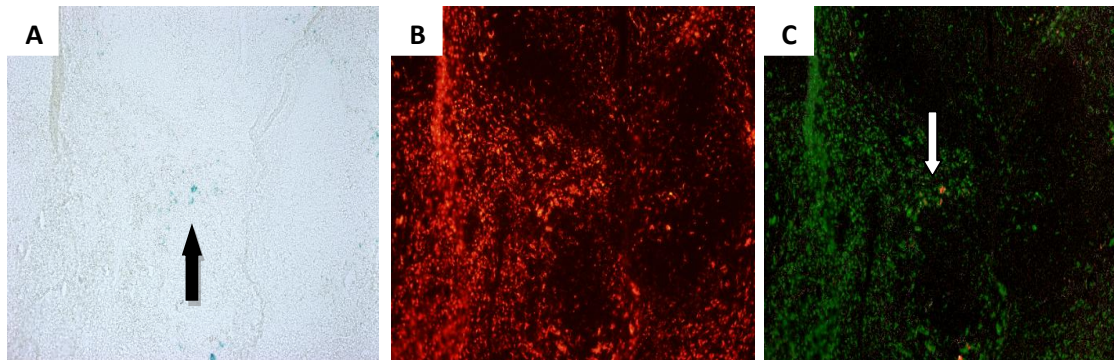
Immunofluorestsentsmeetodi abil sain teada, et meid huvitavad LGR5<sup>+</sup> rakud on positiivsed CD68, CD169 ja Sox9 suhtes (Joonis 7,8,10) ning negatiivsed CD45, F4/80 suhtes (Joonis 5,6). Käesolevasse uuringusse olid kasutatud ka SMA (Joonis 8) ja Desmin (Joonis 9) antikehad, mis on vastavalt müofibroblastide ja tähtrakkude markerid, ning vajalikud põrna strooma visualiseerimiseks.



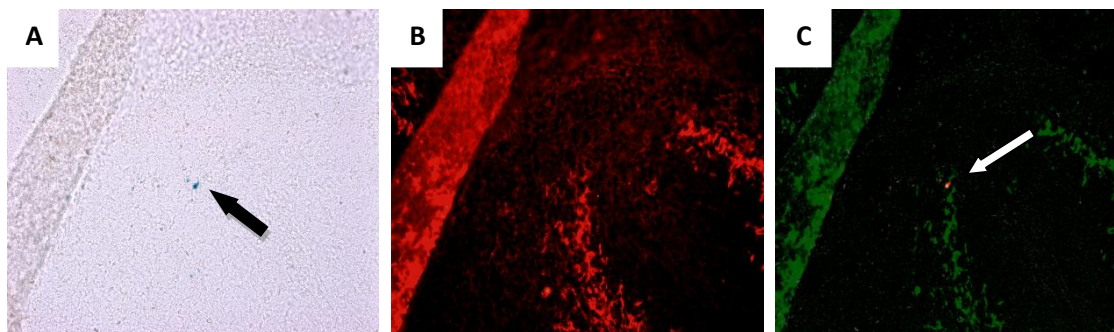
**Joonis 5.** LGR5+ rakud CD45 antikehaga töötlemisel. A. LGR5-positiivsed rakud on rohekassinised tänu x-gal töötlusele. B. Immuunofluorestsentsanalüüs CD45 antikehaga, mis on vereloomkoe marker (Li jt, 2014). C. LGR5+ rakud ei ole CD45-positiivsed. Mustad nooled osutuvad LGR5+ rakkudele. Mõõtlõigud 100  $\mu$ m (A, B ja C).



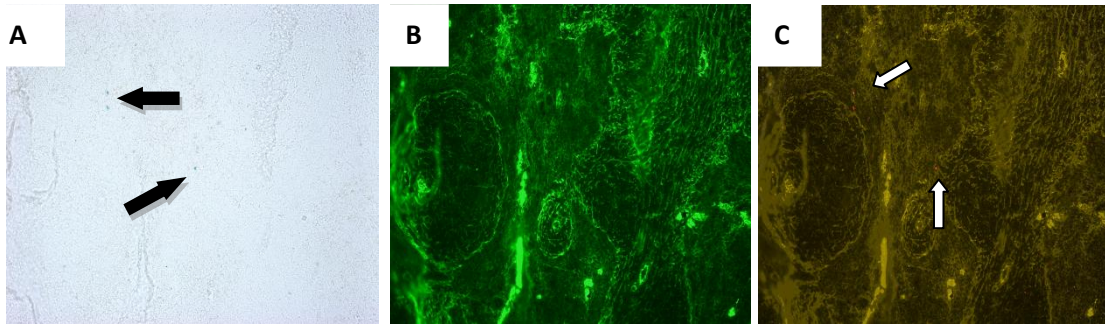
**Joonis 6.** LGR5+ rakkude immunofluorestsentsanalüüs F4/80 antikehaga. X-gal värving hiire põrnal, must nool osutab LGR5<sup>+</sup> rakkudele (A). Immuunofluorestsentsanalüüs F4/80 antikehaga, mis on makrofaagide marker (B) (Austyn ja Gordon, 1981). X-gal (LGR5) ja F4/80 antikehaga värvingu ja liitpilt (C). Mõõtlõik 100 $\mu$ m (A, B ja C)



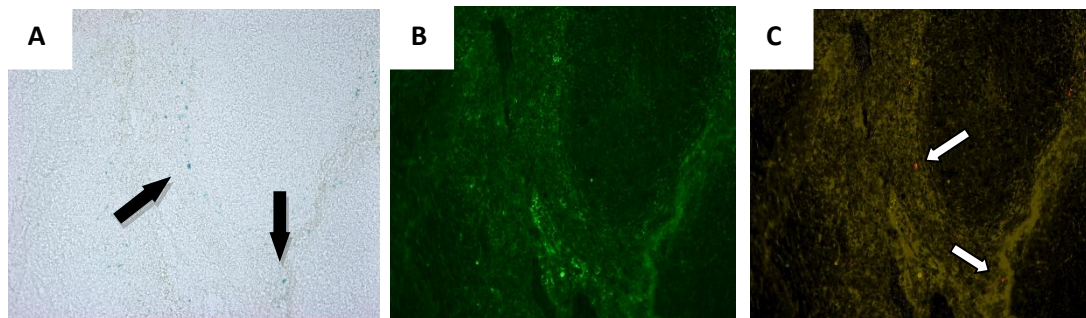
**Joonis 7.** LGR5+ rakud CD68 positiivsed. A. Rohekassinised LGR5-positiivsed rakud tänu X-gal värvingule (must nool). B. Immunofluorestsentsanalüüs CD68 antikehaga, mis on koeresidentsete makrofaagide marker (Chistiakov jt, 2016) C. Liitpilt, kus on näha, et LGR5+ rakk on positiivne CD68 suhtes. Mõõtlõik 100 $\mu$ m (A, B ja C).



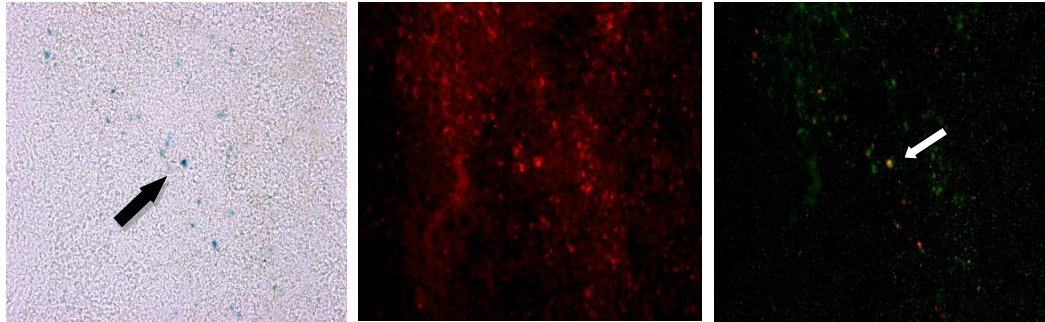
**Joonis 8.** LGR5+ rakud on CD169 positiivsed. Oli tehtud X-gal värvimine põrna lõigul ning must nool osutub LGR5+ rakule (A). Teostatud immunofluorestsentsanalüüs CD169 antikehaga, mis on koeresidentsete makrofaagide marker (B) (Chavez-Galan jt, 2015). Pildid A ja B liidetud, et näidata tekkinud signaali (C). Mõõtlõik 100 $\mu$ m (A, B ja C).



**Joonis 8.** Strooma ja müofibroblastide marker SMA. Mustad nooled osutuvad LGR5+ rakkudele (A). On välja kujunenuid folliikulid ning ka strooma (B) (Lehman ja Morgan, 2012). LGR5+ rakud paiknevad folliikuli marginaaltsoonis (C). Mõõtlõik. 100 $\mu$ m (A, B ja C)



**Joonis 9.** Strooma ja peritsüütide marker Desmin. Mustad nooled osutuvad LGR5+ rakkudele (A). Strooma ja folliikulite visualiseerimiseks kasutatud desmini antikeha, mis on ka peritsüütide marker (B) (Arentz jt, 2011). Folliikuli marginaaltsoonis asuvad desmiin-negatiivsed LGR5+ rakud (C). Mõõtühik 100 $\mu$ m (A, B ja C)



**Joonis 10.** LGR5<sup>+</sup> rakud on Sox9 positiivsed. Mustad nooled osutuvad LGR5<sup>+</sup> rakkudele, (A). Immuunofluorestsentsanalüüs Sox9 antikehaga, mis on kõhunäärme ja maksa eellasrakkude marker (B) (Tarlow jt, 2014). A ja B liitpilt mis näitab LGR5<sup>+</sup>/Sox9 kaksikpositiivseid rakke (C). Mõõtlõik 100µm (A, B ja C)

Käesolevas uurimuses kasutati antikehi, mis tunnevad ära makrofaagide markerit CD11b, normaalsete ja kasvaja tüvirakkude markereid CD44 ja CD113 ning sapiteede markerit CD166, kuid uuritav rakupopulatsioon näitas negatiivsust nende markerite suhtes. Kuna eelpool nimetatud markeritest LGR5<sup>+</sup> rakkude ekspresioonipaneeli ei kuulunud, siis otsustati uurida erineva päritoluga raku tüüpide markerite suhtes.

Tulemustest selgus, et uuritav rakupopulatsioon näitas positiivsust koeresidentsete makrofaagi markeri CD68 ja CD169 ning kõhunäärme ja maksa eellasrakkude Sox9 suhtes (Joonis 7-8, 10). Tänu värvingule SMA ja Desmini antikehadega kinnitati, et LGR5<sup>+</sup> rakud asuvad follikulite marginaalsoonis (Joonis 8-9). Nendest tulemustest võib järeldada, et põrnas olevad LGR5<sup>+</sup> rakud kuuluvad valge pulbi makrofaagide hulka.

## 2.4 Arutelu

Põrn on huvitav ja kasulik organ, mille immuunfunktsioon organismis on väga oluline. Põrna regeneratsioonis osalevad mitmed rakutüübid ning selleks, et paremini mõista põrna regeneratsiooni rakulisi aspekte on vaja teada millised need rakud on ja kuidas nad funktsioneerivad. Eeldatavasti osalevad põrna regeneratsioonis ka tüvi või eellasrakkude sarnased rakud, kuid senini ei ole neid isoleerida õnnestunud.

Viimase 10 aasta jooksul on üha rohkem uuritud rakkude pinnavalku LGR5, mis märgistab tüvi- ja eellasrakke täiskasvanud organismi mitmetes organites nagu näidatud peensooles ja nahas. (Jaks jt, 2008; Barker jt, 2007). Seda markerit ekspresseerivaid rakke on uuritud ka maksas ning jõudnud järeldusele, et terves koes LGR5+ rakke ei esine, need ilmuvad ainult kahjustuste korral kuid siiski omavad mitmeid eellasrakkude iseloomulikke omadusi (Huch jt, 2013) . LGR5+ rakkude päritolu maksas on senini teadmata.

Käesoleva bakalaureusetöö esmaseks uurimisorganiks oli maks, kuid kuna ka põrnas leidub LGR5+ rakke siis fokuseeruti sellele organile. Lõputöö käigus selgitati põrnas olevate LGR5-positiivsete rakkude rakuline identiteed.

Põrna LGR5+ rakke iseloomustati immuunofluorestsentsmeetodi abil. Tehtudtöö tulemusel selgus, et uuritav rakupopulatsioon ei seonu F4/80, CB11b, CD44, CD45, CD133 ja CD166 markeritega, kuid on positiivne makrofaagi spetsiifilise markeri CD68, koeresidentsete makrofaagide CD169 ning maksa sapiteede markeri Sox9 suhtes.

Kuigi LGR5<sup>+</sup> on olemas normaalses kahjustamata põrnas esinevad need rakupopulatsioonid ainult täiskasvanulhiirel põrnafolliikulite marginaaltsoonis (käesolev töö Lõhmussaar 2014). Kuna need rakud omavad põrna valge pulbi makrofaagide iseloomulikku pinnamolekuli mustrit CD68<sup>+</sup>CD169<sup>+</sup>F4/80<sup>-</sup> erinevalt punase pulbi makrofaagidest (F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>) (Davies L.C. jt 2013), siis esitatud tulemused viitavad sellele, et põrna LGR5-positiivsed rakud ei osale regeneratsioonis vaid on tõenäoliselt diferentseerunud valge pulbi makrofaagid. Sellised rakud omavad spetsiifilisemaid ülesandeid. Näiteks on valge pulbi makrofaagid võimelised fikseerima enda pinnal antigeen-antikeha komplekse ning esile kutsuma T-lümfotsüütide proliferatsiooni ja küpsemist (Davies L.C. jt 2013)

## KOKKUVÕTE

Põrna funktsioone ja regeneratsioonivõimet ning nendes protsessides osalevaid rakke on küll uuritud, aga ei ole see tänapäevani jõudnud täieliku arusaamani. Uueks võimalikuks uurimisobjektiks on rakupopulatsioonid, mis ekspresseerivad LGR5 markerit. LGR5-positiivsetel rakupopulatsioonidel üritatakse leida ühiseid spetsiifiliseid omadusi somaatiliste tüvirakudega. Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli uurida põrnas olevate LGR5-positiivsete rakkude identiteeti ning kirjeldada nende rakkude ekspressioonimustrit.

Uurimustöö käigus:

- kinnitati, et LGR5<sup>+</sup> rakud on detekteeritavad normaalses kahjustamata LGR5<sup>LacZ</sup> genotüüpiga täiskasvanud hiirte põrnas.
- uuriti immuunofluorestsentsmetoodika abil LGR5<sup>+</sup> rakkude positiivsust nii makrofaagi omaduste markeri CD68, koeresidentsete makrofaagi markeri CD169, ning ka sapiteede markeri Sox9 ekspressiooni suhtes, mis viitas sellele, et uuritavad rakupopulatsioonid kuuluvad valge pulbi makrofaagide hulka.
- analüüsi ka teisi markereid ja saadi teada, et erinevalt LGR5<sup>+</sup> rakkudest maksas on põrnas olevad rakud on makrofaagi markeri F4/80 suhtes negatiivsed.

LGR5<sup>+</sup> rakke põrnas pole üldse uuritud ning käesolev uurimustöö täiendas seniseid teadmisi põrna rakulisest koosseisust. Nende tulemustest lähtuvalt võib teha uusi uuringuid ning rohkem teada saada meid huvitavast rakupopulatsioonist.

## Characterization of Lgr5-expressing cells in the spleen

Ekaterina Krassohhina

### SUMMARY

The spleen is one of the most important organs in a mammalian immune system. This organ is not vital for functioning of a mammalian organism, but without it body is prone to various diseases due to the decrease in the immune function. Today there are many ways to treat spleen and one of such is transplantation of spleen tissue. The spleen consists of many different cell types that are responsible for its function and regeneration. As LGR5 is a well-established adult stem cell marker in the spleen. We found that LGR5-expressing spleen cells are positive for several macrophage markers, appear as white pulp macrophages and presumably do not act as spleen progenitors.

The aim of the present bachelor work was to characterize the LGR5<sup>+</sup> cells expression pattern in the spleen. Firstly, was chosen just that organ, because LGR5<sup>+</sup> cells are present in the healthy spleen and it should not be damaged as liver.

Next we hypothesized that LGR5<sup>+</sup> cells in the spleen may belong to macrophages of whit pulp. At the beginning was applied LGR5<sup>LacZ</sup> reporter assay by using qPCR application. After that was used immunofluorescence analysis to characterize the studied cell population more thoroughly. It was revealed that spleen LGR5<sup>+</sup> cells stain positive for tissue macrophage markers CD68 and CD169 and pancreas and liver progenitor cells marker Sox9. Such expression pattern suggests that LGR5<sup>+</sup> cells should be white pulp macrophages.

In this research revealed some new properties about spleen LGR5<sup>+</sup> cells. In connection with the fact that LGR5<sup>+</sup> population in the spleen had not been previously studied, are required further studies to determine the functional role of LGR5<sup>+</sup> cells in the spleen.

## TÄNUSÕNAD

Käesolev bakalaureusetöö on valminud tänu kolleegide ja sõprade suurele abile ning toele. Suurimat tänu tahan avaldada minu juhatajale Viljar Jaksile. Tänan antud võimaluse eest töötada teie töörühmas ning osaleda teie projektis. Tänan, et tekkinul küsimusel leidsite kiiresti aega minuga rääkida, kõik ilusti ja korrektselt läbi seletada ning lihtsalt väliste toredate teemade peale vestelda. Kõige rohkem tahan tänada selle eest, et te suutsite näha minu negatiivsetes tulemustes positiivseid aspekte, ning ergutada ja motiveerida mind. Tänan, et võtsite väga suure osa selle lõputöö kirjeldamisel, et alati kontrollisite ja andsite tagasiside, kuidas teha õigesti ning ei andnud mulle alla anda.

Suured tänusõnad minu labori kolleegile Mikk Toomingule, keda võiks tegelikult nimetada minu abijuhendajaks. Tänan, et olid esimesest päevast kõrval ning esimeseks näpunäidete andjaks uute meetodi omandamisel. Tänan, et alati aitasid mind, kui esimesest korrast ei saanud kõik ilusti tehtud ning kogu aeg motiveerisid ja olid positiivne minu suhtes. Tänan, et alati kutsusid mind vaadata sinu tehtuid katseid ning seletasid neid ka mulle. Selline osavõtlik ning abistav labori kolleeg on ülisuureks vedamiseks igale tudengile.

Lisaks tahan tänada TÜMRI inimese molekulaargeneetika teaduri Marina Grigorovat, kes on aidanud mind ülikoolis 3 aasta jooksul, alati mind toetanud, aidanud erinevate projektide ja tööde tegemisega ning tõlgendamise ja kontrollimisega. Tänan, et soovitasid mulle valida just selle eriala ülikooli sisseastumisel. Tänan sind toredate vestluste ning suure motivatsiooni eest. Väga oluline omada sellist inimest, kes alati aitab ja abistab rasketes momentides.

Lisaks tahan tänada enda perekonna, kes on olnud minu õpinguid igati toetavad. Kõige rohkem minu tänulikkust väärib minu kaksikõde, kes kõikides olukordades toetas mind ning andis mulle aru saada, et mina saan kõigiga hakkama.

Lõpuks tahan tänada enda kursusekaaslaseid, kes olid alati nõus aidata ning sobivatel hetkedel mõtted laboritööst ja õppetöölt eemale juhtida.

Suured tänud kõigile!

## KASUTATUD KIRJANDUS

- Nienstedt, W., Hänninen, O., Arstila, A., Björkqvist, S.-E. ja WSOY. (1972). „INIMESE füsioloogia ja anatoomia“, Eesti Maaülikooli Kirjastus, lk 250.
- Bronte, V. ja Pittet, M.J. (2013). The spleen in local and systemic regulation of immunity. *Immunity*. **39(5)**: 806–818.
- Brendolan, A., Rosado, M.M., Rita Carsetti, Selleri, L. ja Dear, N. (2007). Development and function of the mammalian spleen. *BioEssays* **29**:166–177, 2007.
- Nienstedt, W., Hänninen, O., Arstila, A., Björkqvist S.-E. ja WSOY. 1972. „INIMESE füsioloogia ja anatoomia“, Eesti Maaülikooli Kirjastus, lk 249.
- Crosby, W.H. (1959). Normal Function of the Spleen Relative Red Blood Cells: A Review. *Blood*. **14**:399-408.
- Weledji, E.P. (2014). Benefits and risks of splenectomy. *E.P. Weledji / International Journal of Surgery 12 (2014)*. **12(2)**: 113-9.
- Gamme, G., Birch, D.W. ja Karmali, S. (2013) Minimally invasive splenectomy: an update and review. *Can J Surg*.**56(4)**: 280-285.
- Holdsworth, R. J. (1991) Regeneration of the spleen and splenic autotransplantation. *British Journal of Surgery*. 1991, **78(3)**: 270-8.
- Khan, Z.A.J. (2014) Return of a normal functioning spleen after traumatic splenectomy. *Journal of the Royal Society of Medicine 2004*, **97**:391–392
- Monsivais, J., Seaber, A. ja Urbaniak, J.R. (1985). Debridement and replantation of the spleen with microsurgical restoration of blood flow. **6(2)**: 97-102.
- Riera, M., Buczacki, S. ja Khan, Z. (2009) Splenic regeneration following splenectomy and impact on sepsis: a clinical review. *Journal of The Society of Medicine 2009*: **102**: 139–142.
- Connell, N., Brunner, A., Kerr, C. ja Schiffman, F. (2011) Splenosis and sepsis: The born-again spleen provides poor protection. *Virulence*, **2**:1, 4-11.

- Elmore, S.A. (2006). Enhanced Histopathology of the Spleen. *Toxicol Pathology* 2006, **34(5)**: 648-655.
- Guilliams, M., Ginhoux, F., Jakubzick, C., Naik, S.H., Onai, N., Schraml, B.U., Segura, E., Tussiwand, R. ja Yona, S. (2014). Dendritic cells, mocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nature Reviews Immunology*. **14**, 517-578.
- Davies, L.C., Jenkins, S. J., Allen, J. E. ja Taylor P. R. (2013). Tissue-resident macrophages. *Nature Immunology*. **14(10)**: 986-95.
- McDonald, T., Wang, R., Bailey, W., Xie, G., Chen, F., Caskey, CT. ja Liu, Q. (1998). "Identification and cloning of an orphan G protein-coupled receptor of the glycoprotein hormone receptor subfamily". *Biochem Biophys Res Commun*. **247** (2): 266–70
- Barker, N. ja Clevers, H. (2010) Leucine-Rich Repeat-Containing G-protein-Coupled Receptors as Markers of Adult Stem Cells. *Gastroenterology*. **138(5)**:1681-96
- Cheng, H. ja Leblonf, C.P. (1974). Origin, Differentiation and Renewal of the Four Main Epithelial Cell Types in the Mouse Small Intestine. V. Unitarian Theory of the origin of the four epithelial cell types. *American Journal of Anatomy*.**141(4)**:537-61.
- Cotsarelis, G., Sun, T.T. ja Lavker, R.M. (1990). Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: Implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis. *Cell*. **61(7)**:1329-37.
- Hsu, SY., Kudo, M., Chen, T., Nakabayashi, K., Bhalla, A., van der Spek, P.J., van Duin, M. ja Hsueh A.J. (2000) The three subfamilies of leucinerich repeat-containing G protein coupled receptors (Lgr): identification of Lgr6 and Lgr7 and the signaling mechanism for Lgr7. *Molecular Endocrinology* 2000; **14(8)**:1257–71.
- Carmon, K.S., Gong, X., Lin, Q., Thomas, A. ja Liu, Q. (2011). R-spondins function as ligands of the orphan receptors LGR4 and LGR5 to regulate Wnt/beta-catenin signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **108**: 11452-7.
- Ruffner, H., Sprunger, J., Charlat, O., Leighton-Davies, J., Grosshans, B. et al. (2012) R-

- Spondin Potentiates Wnt/b-Catenin Signaling through Orphan Receptors LGR4 and LGR5. *PLoS ONE* **7**(7): e40976.
- Curcio, C., Lanzini, M., Calienno, R., Mastropasqua, R. ja Marchini G. (2015) The expression of LGR5 in healthy human stem cell niches and its modulation in inflamed conditions. *Molecular Vision* 2015; **21**:644-648
- Walker, F., Zhang, H.H., Odorizzi, A. ja Burgess, A.W. (2011). LGR5 is a negative regulator of tumorigenicity, antagonizes Wnt signalling and regulates cell adhesion in colorectal cancer cell lines. *PLoS ONE*. **6** (7): e22733.
- Birbrair, A. ja Frenette, P. S. (2016). "Niche heterogeneity in the bone marrow". *Annals of the New York Academy of Sciences*. **1370**: 82–96.
- « Hematopoietic Stem Cells.» Stem Cell Information. National Institutes of Health, U.S. Department of Health and Human Services. (2011).
- Liu, D., He, X.C., Qian, P., Barker, N., Trainor, P.A., Clevers, H., Liu, H. ja Li, L. (2014). Leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled Receptor 5 marks short-term hematopoietic stem and progenitor cells during mouse embryonic development. *J Biol Chem*. **289**(34): 23809-16.
- Li, J., Xin, J., Zhang, L., Wu, J., Jiang, L., Zhou, Q., Guo, J., Cao, H. ja Li, L. (2014). Human hepatic progenitor cells express hematopoietic cell markers CD45 and CD109. *International journal of medical sciences*. **11**: 65-79.
- Austyn, J.M. ja Gordon, S. (1981). F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. *Eur J Immunol*. **11**: 805-815.
- Chistiakov, D., Killingsworth, M., Myasoedova, V., Orekhov, A., ja Bobryshev, Y. (2016). CD68/macrosialin: not just a histochemical marker. *Laboratory Investigation*. **97**, 4–13.
- Chavez-Galan, L., Olleros, M.L., Vesin, D. ja Garcia, I. (2015). Much More than M1 and M2 Macrophages, There are also CD169(+) and TCR(+) Macrophages. *Front Immunol*. **6**:263.
- Lehman, W. ja Morgan, K.G. (2012). Structure and Dynamics of the Actin-Based Smooth Muscle Contractile and Cytoskeletal Apparatus. *Journal of Muscle Research and cell*

*Motility*.**33(6)**: 461-469.

Arentz, G., Chataway, T., Price, T.J., Izwan, Z., Hardi, G., Cummins, A.G. ja Hardingham, J.E.(2011). Desmin expression in colorectal cancer stroma correlates with advanced stage disease and marks angiogenic microvessels. *Clin Proteomics*. 2011; **8(1)**: 16.

Tarlow, B.D., Finegold, M.J. ja Grompe, M. (2014). Clonal tracing of Sox9<sup>+</sup> liver progenitors in mouse oval cell injury. *Hepatology* . **60**: 278-89.

Davies, L.C., Jenkins, S. J., Allen, J. E. ja Taylor P. R. (2013). Tissue-resident macrophages. *Nature Immunology*. **14(10)**: 986-95.

## LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina Ekaterina Krassohhina

(sünnikuupäev: 09.11.95)

Annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose *Põrna Lgr5-positiivsete rakkude iseloomustamine*, mille juhendaja on Viljar Jaks (PhD)

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

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

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

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

Tartus, 29.05.2016