

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

Kaspar Eigi

LGR5 ja kasvajaseoselised signaalirajad

Bakalaureusetöö

Juhedajad:
MSc Kristina Mäemets-Allas
PhD Viljar Jaks

TARTU 2014

SISUKORD

SISUKORD	2
KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	5
KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	6
1.1 G-valguga seotud retseptorid	6
1.1.1 GPCR toimemehhanism	6
1.2 LGR valgud.....	7
1.2.1 LGR5 karvafolliikulis.....	8
1.2.2 LGR5 soolestiku tüvirakkudes	10
1.2.3 LGR5 kasvajates.....	11
1.3 LGR5 ja kanooniline Wnt signaalirada	12
1.4 Kasvajate ja tüvirakkudega seotud signaalirajad	14
1.4.1 Hedgehog signaalirada	15
1.4.2 Notch signaalirada	16
2. EKSPERIMENTAALNE OSA	19
2.1 Töö eesmärk.....	19
2.2 Materjal ja meetodika	19
2.2.1 Kasutatud rakuliin	19
2.2.2 Ekspressioonivektorid	19
2.2.3 Plasmidse DNA transformatsioon	21
2.2.4 Plasmidse DNA restriksioonianalüüs ja geelelektroforees	21
2.2.5 Rakkude transfekteerimine	22
2.2.6 RNA ja valgu eraldamine transfekteeritud rakkudest.....	22
2.2.7 Valkude ekspressiooni analüüs <i>Western blot</i> meetodil	23
2.2.8 RNA töötlus DNaaS-I-ga ja cDNA süntees	24
2.2.9 Praimerite disain	24

2.2.10	Praimerite kontroll polümeraasi ahelreaktsiooniga	25
2.2.11	Kvantitatiivne reaalaaja PCR	26
2.3	Tulemused ja arutelu	27
2.3.1	LGR5 plasmiidide kontroll	27
2.3.2	LGR5 valgu ekspressioon	28
2.3.3	Kvantitatiivne reaalaaja PCR	29
KOKKUVÕTE		33
SUMMARY		34
TÄNUSÕNAD		35
KASUTATUD KIRJANDUS		36
KASUTATUD VEEBILEHEKÜLJED		48
Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks		49

KASUTATUD LÜHENDID

ADAM – *a disintegrin and metalloproteinase*

APC – *adenomatous polyposis coli*, kooloni adenomatoosne polüpoos

BMP – *bone morphogenetic protein*

CBC – *crypt base columnar*, krüpti põhja sammasrakud

CK1 α – *casein kinase 1 α* , kaseiini kinaas 1 α

CSC – *cancer stem cells*, vähi tüvirakud

EGFP – *enhanced green fluorescent protein*

FBS – *fetal bovine serum*, veise loote seerum

FSHR – *follicle-stimulating hormone receptor*, folliikuleid stimuleeriva hormooni retseptor

GPCR – *G-protein coupled receptor*, G-valguga seotud retseptor

GSK3 β – *glycogen synthase kinase 3 β* , glükogeeni süntaasi kinaas 3 β

HCC – *hepatocellular carcinoma*, hepatotsellulaarne kartsinoom

HPRT1 – *hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1*

HSC – *hematopoietic stem cell*, hematopoieetiline tüvirakk

LB – *Luria-Bertani medium*, Luria-Bertani sööde

LGR – *leucine-rich repeat containing G-protein coupled receptor*, leutsiinirikkaid kordusi sisaldav G-valguga seotud retseptor

LHR – *leutenizing hormone receptor*, luteniseeriva hormooni retseptor

LRP – *lipoprotein receptor-related proteins*, lipoproteiini retseptoriga sarnane valk

MAML – *mastermind like protein*

MCL – *mantle cell lymphoma*

ORS – *outer root sheath*, juure välimine regioon

PC – *primary cilium*, primaarne ripse

PKA – *protein kinase A*, proteiin kinaas A

RBPJ – *Recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region*

RGS – *regulator of G protein signaling*

RSPO – *R-spondin*, R-spondiin

SDS – *sodium dodecyl sulfate*, naatriumdodetsüülsulfaat

TCF/LEF – *T-cell factor/lymphoid-enhancing factor*

TGN – *trans-Golgi network*, trans-Golgi võrgustik

TLE1 – *transducin-like enhancer protein 1*

TSHR – *thyroid-stimulating hormone receptor*, kilpnääret stimuleeriva hormooni retseptor

ZPA – *zone of polarizing activity*, polariseeruva aktiivsusega tsoon

SISSEJUHATUS

LGR5 ehk leutsiinirikkaid kordusi sisaldav G-valguga seotud retseptor 5 kuulub GPCR perekonna rodopsiini sarnaste retseptorite alamklassi. Aastal 1998 avastatud molekulil on mitmeid tähelepanuväärseid omadusi. *LGR5* promootor on aktiivne täiskasvanud organismi kiiresti uuenevates kudedes nagu peensooles ja karvafolliikulis. Lisaks täiskasvanud tüvirakkudele on LGR5 ekspressiooni täheldatud ka mitmetes vähkkasvaja rakkudes. LGR5 kõrget ekspressiooni on nähtud näiteks glioblastoomi tüvirakkudes, mis võib viidata LGR5 olulisusele kasvaja tekkes ja arengus. LGR5 on Wnt/ β -kateniin signaaliraja fakultatiivne koretseptor. See tähendab seda, et ta on võimeline Wnt signaali võimendama, kuid mitte initsieerima. Wnt signaalirada on väga konserveerunud ja sellel on mitmeid funktsioone embrüonaalses arengus, tüvirakkude omaduste säilimises ja rakkude diferentseerumises. Wnt signaaliraja aktiivsust on kirjeldatud väga paljudes vähkkasvajates. Seega annab LGR5 uurimine ühelt poolt informatsiooni nii tüvirakkude kui kasvajarakkude toimimise kohta, teisest küljest peetakse LGR5 ja teisi G-valguga seotud retseptorite perekonda kuuluvaid valke headeks potentsiaalseteks ravimi sihtmärkideks.

Vähi tüvirakkude teooria kohaselt on kasvajates väike populatsioon rakke, mis tagab kasvaja arengu. Kirjeldatud on mitmeid signaaliradu, mis on aktiivsed nii somaatilistes tüvirakkudes kui vähirakkudes. Üks selline signaalirada on ka Wnt/ β -kateniin.

Käesoleva töö kirjanduse ülevaade käsitleb G-valguga seotud retseptorite ehitust ja toimemehhanismi. LGR5 valgu funktsiooni käsitletakse nii tüvirakumarkeri, kasvajamarkeri kui Wnt/ β -kateniin signaaliraja kontekstis. Lisaks antakse ülevaade kasvajate ja tüvirakkudega seotud signaaliradadest.

Eksperimentaalse osa eesmärgiks oli uurida mutantse potentsiaalselt konstitutiivselt aktiivsete LGR5 valkude mõju kolmele kasvajaseoselisele signaalirajale: Wnt/ β -kateniin, Notch ja Hedgehog.

KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 G-valguga seotud retseptorid

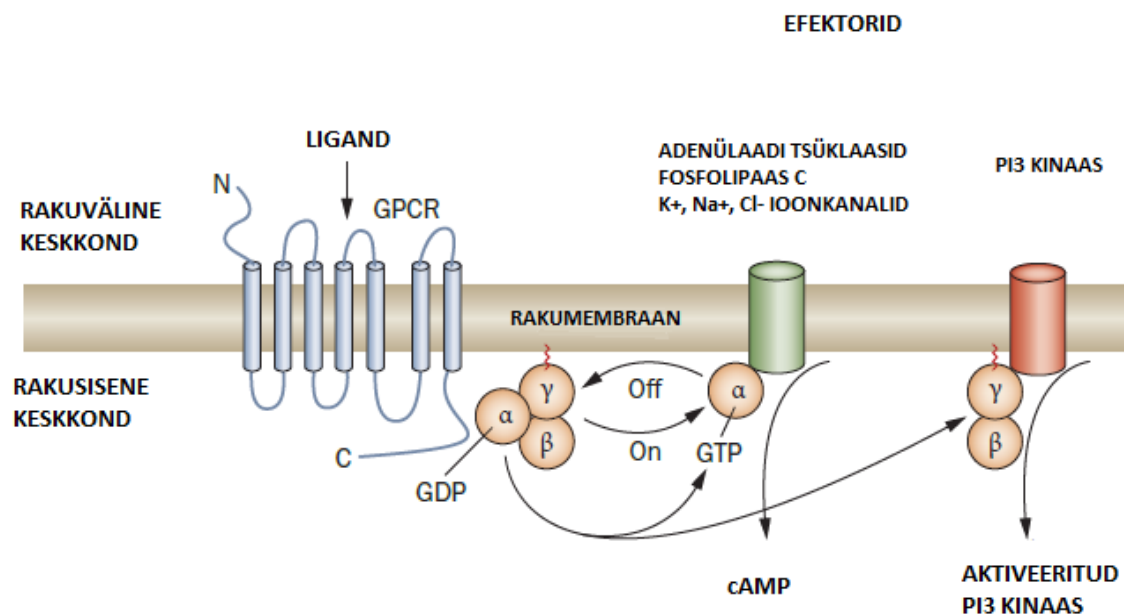
G-valguga seotud retseptorid (GPCR, ingl *G-protein coupled receptors*) on eukarüootides leiduv suur retseptorite perekond, kuhu kuulub üle 800 geeni. Nende geenide poolt kodeeritud raku pinna molekulid osalevad signaali ülekandes rakku, millega kontrollitakse põhilisi füsioloogilisi funktsioone nagu näiteks neurotransmissiooni, hormoonide ja ensüümide vabanemist näärmetest, immuunvastust, südame- ja silelihaskudede kontraktsioone ja vererõhu regulatsiooni (Pierce jt., 2002) (Joonis 1). Kõikidel GPCR-del on ühine tsentraalne domään, mis koosneb seitsmest transmembraansest heeliksist, mida ühendavad kolm intratsellulaarset ja kolm ekstratsellulaarset silmust (Baldwin, 1993). GPCR-de struktuur on väga dünaamiline, muutudes ligandide ja ekstratsellulaarsete valkudega seondumisel (Rasmussen jt., 2011).

GPCR aktiveerivad signaalid on väga mitmekesised ja siia alla kuuluvad näiteks valgus, Ca^{2+} , lõhnaained, nukleotiidid, peptiidid ja valgud (Julius jt., 1989). Talitlushäiretega GPCR-id on seotud mitmete inimesel esinevate haigustega, nagu näiteks diabeet, hüperkaltseemia, ülekaalulisus, kõrge vererõhk, hüpotüreos ja psühhootilised häired (Schöneberg jt., 2004). GPCR-del on väga tähtis roll ka vähi arengus ja metastaaside tekkes. Pahaloomulised rakud võivad GPCR kasutada, et autonoomselt prolifereruda, immuunsüsteemi eest „varjuda“, suurendada toitainete ja hapniku varusid ja migreeruda ümbritsevasse kudedesse. Metsiktüüpi GPCR-id võivad muutuda kasvajat tekitavaks, kui tsirkulatoorseid agoniste on keskkonnas liiga palju (Gutkind jt., 1991; Julius jt., 1989) ja mutatsioonid valgu konserveerunud piirkondades võivad GPCR muuta transformeerivaks isegi ligandi puudumisel (Allen jt., 1991).

1.1.1 GPCR toimemehhanism

G-valguga seotud retseptorid kannavad signaali üle heterotrimeerse G-valgu abil (Joonis 1), mis on saanud oma nimetuse sellest, et ta seondub G-nukleotiidiga (GTP või GDP). G-valgud saab jagada kahte rühma: väikesed monomeersed ja suured trimeersed valgud (Northup jt., 1980). G-valgud koosnevad α , β ja γ subühikutest. α subühik on vajalik G-nukleotiidi seondamiseks ja GTP hüdrolyüsiks. β ja γ subühik moodustavad tiheda kompleksi ja ühtse funktsionaalse üksuse (Gilman, 1987). Nii α subühik kui $\beta\gamma$ -dimeer osalevad efektorite aktivatsioonis või inhibitsioonis. Kui agonist aktiveerib retseptori, siis toimuvad konformatsioonilised muutused retseptori tsütoplasmaatilises osas (Ballesteros jt., 2001;

Farahbakhsh jt., 1995). Aktiveeritud retseptor interakteerub G-valguga, mille tulemusena GDP dissotsieerub α subühikust ja seejärel seondub sellega GTP. Aktiveeritud heterotrimeer dissotsieerub α -subühikuks ja $\beta\gamma$ -dimeeriks. Mõlemal on võime reguleerida erinevaid efektormolekule (Gilman, 1987). Näiteks $\beta\gamma$ -dimeeri puhul on näidatud fosfolipaas C aktiveerivat toimet (Boyer jt., 1992). GTP hüdrolyüs GDP-ks RGS (ingl *regulator of G protein signaling*) valkude abil indutseerib heterotrimeeri uuesti moodustumise ja lõpetab aktivatsioonitsükli (De Vries jt., 2000; Ross ja Wilkie, 2000).



Joonis 1. GPCR üldine toimetemehhanism. Ligandi seondumisel muutub transmembraanse retseptori konformatsioon ja aktiveerub G-valk, mis dissotseerub kaheks funktsionaalseks subühikuks. Kumbki subühik eraldi aktiveerib erinevaid efektoreid. Modifitseeritud (Vassart ja Costagliola, 2011).

1.2 LGR valgud

LGR-valgud ehk leutsiinirikkeid kordusi sisaldavad G-valguga seotud retseptorid kuuluvad GPCR perekonda, rodopsiini sarnaste retseptorite alamklassi ja glükoproteiini retseptorite klastrisse. *LGR4*, *LGR5* ja *LGR6* moodustavad glükoproteiini hormoonide retseptoritest eraldi alamklastrit (Fredriksson jt., 2003). *LGR4*, *LGR5* ja *LGR6* on homoloogsed glükoproteiini hormoonide retseptoritega, milleks on kilpnääret stimuleeriva hormooni retseptor (*TSHR*, ingl *thyroid-stimulating hormone receptor*), folliikuleid stimuleeriva hormooni retseptor (*FSHR*,

ingl *follicle-stimulating hormone receptor*) ja luteniseeriva hormooni retseptor (*LHR*, ingl *leutenizing hormone receptor*) (Hsu jt., 1998).

LGR-valgud, nagu kõik teised G-valguga seotud retseptorid, sisaldavad seitse korda membraani läbivat domääni (Hsu jt., 1998). LGR-valkude C-terminus asub tsütoplasmas ja N-terminus raku pinnal. LGR4 ja LGR5 rakuväline osa sisaldab 18 leutsiinirikast kordusjärjestust (Barker ja Clevers, 2010), LGR6 rakuväline osa aga 13 kordusjärjestust (Hsu jt., 1998). Kõigi kolme valgu leutsiinirikaid järjestusi ümbritsevad nii N- kui C-terminaalsed tsüteiinirikad järjestused (Barker ja Clevers, 2010).

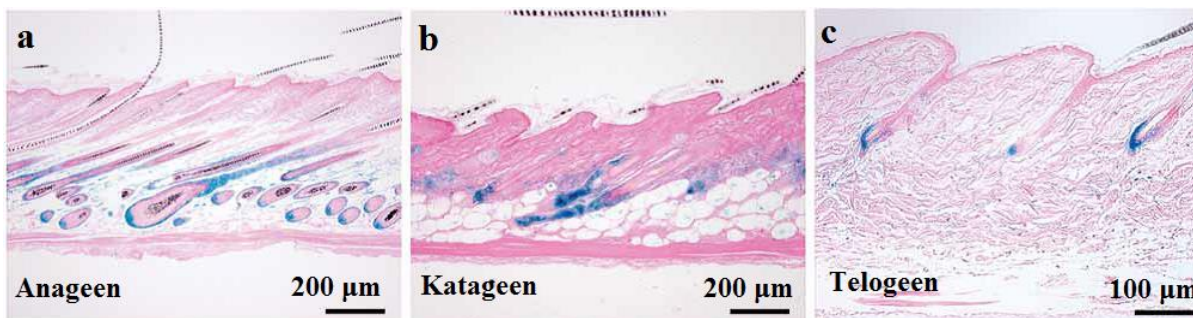
LGR4, LGR5 ja LGR6 on Wnt/ β -kateniin signaaliraja fakultatiivsed retseptorid, assotsieerudes Frizzled/LRP (ingl *lipoprotein receptor-related proteins*) kompleksiga. LGR valkude ligandideks on R-spondiini valgud (RSPO, ingl *R-spondin*), mis on Wnt/ β -kateniin signaaliraja agonistid (de Lau jt., 2011). Seega on R-spondiinid võimelised Wnt signaale võimendama. R-spondiine ja tema homoloogseid variante esineb kõikidel selgroogsetel organismidel ja lisaks Wnt signaaliraja võimendamisele on neil mitmeid funktsioone organismi arengus. Nad on vajalikud näiteks jäsemete korrektseks arenguks, sõrme- ja varbaküünte tekkeks ja korrektseks munasarja arenguks (de Lau jt., 2012). Samuti märgib LGR5 promootori aktiivsus tüvirakke kiiresti uuenevates kudedes nagu karvafolliikulis, käär- ja peensooles, kuid selle ekspressiooni on nähtud ka piimanäärmetes, suguorganites, ajus ja koekahjustuse korral ka kõhunäärmetes ja maksas (Barker jt., 2007; Jaks jt., 2008).

1.2.1 LGR5 karvafolliikulis

Nahk on imetajate suurim organ, mis kaitseb organismi väliskeskkonna mõjutuste eest, takistab dehüdratsiooni ning tagab interaktsiooni väliskeskkonnaga. Naha homöostaas tagatakse erinevate tüvirakkudega, mis asuvad karvafolliikulis karvasibula piirkonnas, rasunäärme põhjas ja interfollikulaarse epidermise basaalkihis (Barrandon ja Green, 1987; Cotsarelis jt., 1990; Ghazizadeh ja Taichman, 2001). Karvafolliikul on imetajatele iseloomulik nahas olev struktuur, mis vastutab karva kasvu ja arengu eest. Karvafolliikuli areng on tsükliline, koosnedes kasvufaasist ehk anageenist, taandarengufaasist ehk katageenist ja puhkefaasist ehk telogeenist.

LGR5+ tüvirakud asuvad hiire karvafolliikulis, nad on aktiivselt jagunevad ja nende tütararakud panustavad karvafolliikuli kõikide rakutüüpide regeneratsiooni (Jaks jt., 2008). Jaks ja tema töögrupp kasutasid transgeenseid hiiri ja *lacZ* reportergeeni *LGR5* 18-ndas eksonis uurimaks LGR5+ rakkude paiknemist erinevatel arenguetappidel. Karvafolliikuli kasvufaasis täheldati LGR5 promootori aktiivsust karva juure välises regioonis (ORS, ingl

outer root sheath), taandarengufaasis dermaalse papilli (ingl *dermal papilla*) ja puhkefaasis karvasibula (ingl *bulge area*) regioonis (Joonis 2). LGR5 valku ekspresseerivad rakud on multipotentsed (Jaks jt., 2008), mis kõigepealt diferentseeruvad vahepealseteks rakkudeks, siis transiitrakkudeks (ingl *trans-amplifying cells*) ja seejärel diferentseeruvad nad lõplikult (Greco jt., 2009; Zhang jt., 2009).



Joonis 2. LGR5 ekspressioon karvafolliikulis. Ekspressiooni uurimiseks kasutati *lacZ* reportergeeni. (a) Anageenis täheldati LGR5 promootori aktiivsust karvajuure välimises regioonis. (b) Katageenis oli LGR5 ekspresseeritud dermaalse papilli regioonis. (c) Telogeeni faasis ekspresseerus LGR5 karvasibula regioonis. Modifitseeritud (Jaks jt., 2008).

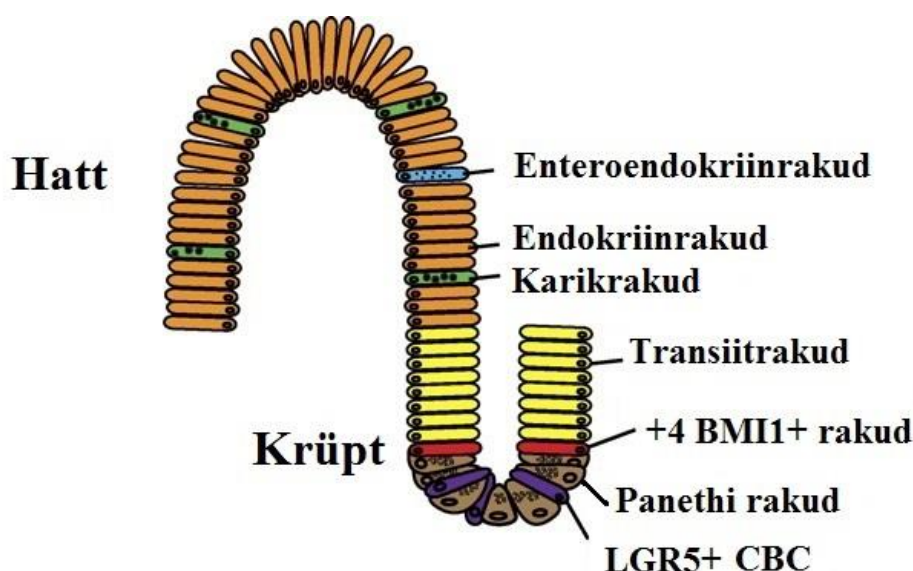
Isoleeritud LGR5⁺ rakud olid võimelised tekitama uue karvafolliikuli ning suutsid kindlustada selle heterogeense rakupopulatsiooni säilimise 14 kuu vältel. Proliferatiivne LGR5⁺ populatsioon ekspresseeris tüvirakule omaseid geene ning samuti geene mis viitavad Hedgehog signaaliraja aktiivsusele (Jaks jt., 2008). Hedgehog signaalirada on vajalik karvafolliikuli moodustumiseks ja kasvuks anageenis (Chiang jt., 1999; St-Jacques jt., 1998). Lisaks aktiivsetele LGR5⁺ tüvirakkudele on karvafolliikulis ka nn vaikivad tüvirakud, mis ekspresseerivad tüvirakumarkereid CD34 ja K14. Selliseid rakud võivad anageenis aktiveeruda ja osaleda karva kasvu reguleerimises. Nende transplantatsioon hiirtesse tekitas täiesti uue karvafolliikuli (Sangiorgi ja Capecchi, 2009).

Karvafolliikulis on Wnt signaalirada aktiivne telogeeni lõpus, mis toetab üleminekut anageeni. Wnt signaalid vajalikud ka karva kasvuks (Gat jt., 1998). Telogeenis surutakse Wnt signaal maha BMP (ingl *bone morphogenetic protein*) valgu kaudu (Lim ja Nusse, 2013).

1.2.2 LGR5 soolestiku tüvirakkudes

Soolestiku epiteel on kõige kiiremini uuenev kude täiskasvanud imetaja organismis, kuna see peab taluma pidevat mehhaanilist ja keemilist stressi. Toitainete imendumise suurendamiseks on epiteel ringkurrulise pinnastruktuuriga, koosnedes krüptidest ja hattudest.

Krüpt-hatt struktuur moodustab toruja lihtnäärme, mille põhjas paiknevad tüvirakud on vajalikud kiireks rakkude regeneratsiooniks (Joonis 3). Krüpti põhjas, Panethi rakkude vahel, asuvad krüpti põhja sammurakud (CBC, ingl *crypt case columnar*) (Cheng ja Leblond, 1974a). Aastal 2007 näitasid Barker ja tema uurimisgrupp, et CBC rakud on LGR5 valku ekspresseerivad multipotentsed tüvirakud. Vastavad tüvirakud jagunevad keskmiselt korra ööpäeva jooksul (Barker jt., 2007).



Joonis 3. Soolestiku krüpt-hatt struktuur. Krüpti põhjas, Panethi rakkude vahel, asuvad LGR5+ tüvirakud, mis panevad aluse kõikidele soolestiku epiteeli rakutüüpidele. Ülejäänud osa krüptist moodustavad +4 positsioonis olevad tüvirakud ja transiittrakud. Modifitseeritud (Van Keymeulen ja Blanpain, 2012).

Multipotentsed CBC tüvirakud diferentseeruvad kiiresti jagunevateks transiittrakkudeks (ingl *transit-amplifying cells*), mis on omakorda võimelised diferentseeruma kõikideks soolestiku rakkudeks. Põhiliselt siiski enteroendokriinrakkudeks, endokriinrakkudeks, Panethi rakkudeks ja karikrakkudeks (Cheng ja Leblond, 1974b). Transiittrakud jagunevad 4-5 korda enne lõplikku diferentseerumist (Marshman jt., 2002). Enteroendokriinrakud, endokriinrakud ja karikrakud liiguvad mööda krüpt-hatt telge hatu tipu poole, Panethi rakud jäävad aga krüpti

põhja (Potten ja Loeffler, 1987). Rakkude proliferatsioon ja diferentseerumine on koordineeritud kõrgelt konserveerunud signaaliradade (Wnt/ β -kateniin ja Notch) kaudu. Krüptides toimuv kiire rakkude jagunemine tasakaalustatakse apoptoosiga hattude tipus, kust rakud vabanevad luumenisse (Gavrieli jt., 1992).

Panethi rakud tagavad CBC rakkudele sobiva keskkonna antibakteriaalsete ainete ja Wnt-signaalidega (Chiang jt., 1999; Salzman jt., 2010; Schuijers ja Clevers, 2012; Wilson jt., 1999). Kim ja tema uurimisgrupp konstrueerisid sellise hiiremudeli, kus Panethi rakke krüpti põhjas ei olnud. CBC rakud proliferatsioonid normaalselt ka Panethi rakkude puudumisel, kuid diferentseerusid ainult enteroendokriinrakkudeks. Seega pole Panethi rakud vajalikud tüvirakkude ellujäämiseks, kuid on vajalikud multipotentsuse säilitamiseks (Kim jt., 2012).

Üksainus LGR5+ rakk suudab *in vitro* aluse panna krüpti taolisele organoid-struktuurile (Sato jt., 2009). Esmalt toodetakse Panethi rakke, mis tagavad LGR5+ rakkudele ja sellega kogu organoidile edasiseks arenguks sobiva keskkonna (Sato jt., 2011). Wnt signaalirada kontrollib, millisteks rakutüüpideks diferentseeruvad rakud krüpt-hatt teljel (Clevers, 2006). β -kateniini tase on kõrgeim krüpti põhjas olevates rakkudes ja kõige madalam hatu tipus olevates rakkudes (Kongkanuntn jt., 1999; Kosinski jt., 2007).

Lisaks tsükliiliselt uuenevatele LGR5+ tüvirakkudele on soolestikus ka teine populatsioon tüvirakke, mida iseloomustab BMI1 ekspressioon. Vastavad tüvirakud asuvad krüpti põhjast nelja raku kaugusel ehk +4 positsioonis. Arvatakse, et tegu on nn vaikivate tüvirakkudega, kuid see hüpotees vajab täiendavat kinnitust. Krüpti põhja sammurakkude puudumisel toimib BMI1+ rakupopulatsioon kui alternatiivne tüviraku populatsioon, pannes aluse uutele LGR5+ rakkudele (Tian jt., 2011).

1.2.3 LGR5 kasvajat

Inimese somaatilised tüvirakud võivad muutuda kantserogeenseteks, kui rakud kaotavad kontrolli rakutsükli reguleerimise üle. Kantserogeensust põhjustavad näiteks *Ras* onkogeeni aktivatsioon, p53/Rb signaaliraja blokeerimine ja telomeraasi aktiveerimine (Hahn jt., 1999). Hiljuti tutvustatud mudeli kohaselt võivad vähkkasvajad alguse saada rakkudest mis paljunevad kiiremini kui normaalsed rakud. Selliseid rakke nimetatakse vähi tüvirakkudeks (CSC, ingl *cancer stem cells*). CSC hüpoteesi kohaselt koosneb vähkkasvaja väikesest alampopulatsioonist vähi tüvirakkudest, mis initsieerivad ja säilitavad kasvaja arengu ning põhjustavad metastaaside teket. Selle hüpoteesi kohaselt vajab tumorigenees mitmeid mutatsioone, mis tõenäolisemalt kogunevad pikema elueaga somaatilistesse tüvirakkudesse (Al-Hajj ja Clarke, 2004; Tan jt., 2006). Selliseid väga tumorigeenseid rakupopulatsioone on

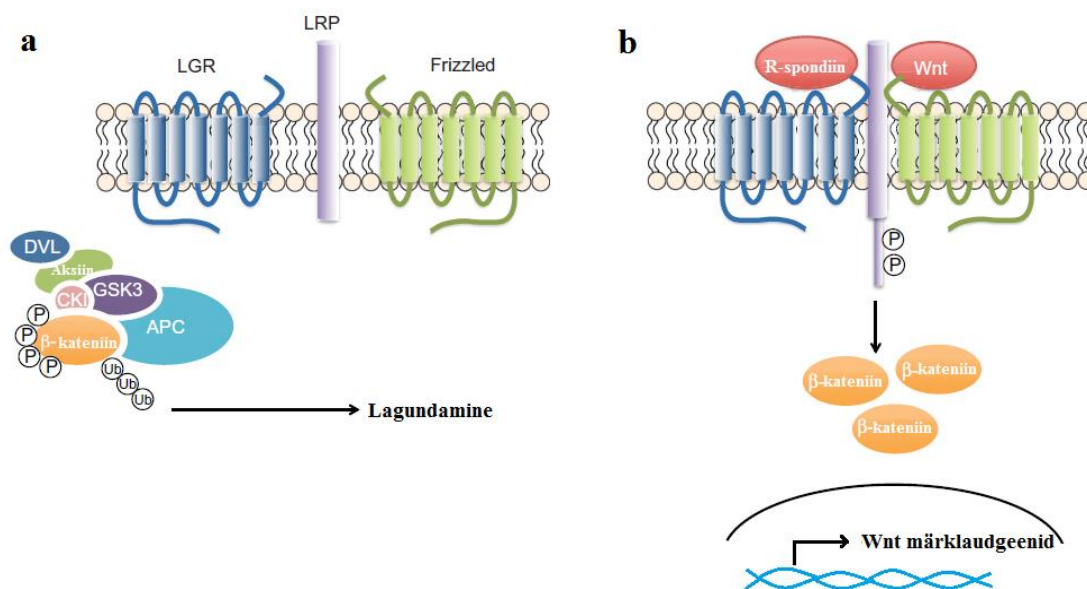
leitnud aju-, soolestiku- ja rinnavähi puhul (Visvader ja Lindeman, 2008). Tänapäevase vähiravi efektiivsust mõõdetakse võimes vähendada kasvaja massi. Kuid need ravimid ei pruugi mõjuda vähkkasvaja tüvirakkudele, mis taastoodavad uusi kasvajakarakke ja põhjustavad sellega kasvaja suurenemist. Kui vähkkasvaja tüvirakkude teooria on õige, siis võivad uued ravimid, mille sihtmärgiks on CSC-d, kasvaja lõplikult eemaldada. Nagu normaalsetel tüvirakkudelgi on CSC rakkudel ekspresseeritud ravimi vastased geenid nagu MDR-1 ja BRCP1. Seega on nad resistentsed kemoteraapiale (Eyler ja Rich, 2008). Lisaks eelnevale, on CSC rakud resistentsed kiiritusele, kuna neil on väga efektiivsed DNA reparatsiooni mehhanismid (Eyler ja Rich, 2008; Koch jt., 2010). Kasvaja tüvirakud suudavad väga efektiivselt initsieerida angiogeneesi, mis kiirendab kasvaja arengut veelgi (Eyler ja Rich, 2008). Seega on väga tähtis identifitseerida sellised rakud ja uurida nende omapära molekulaarsel tasemel. Prioriteet võiks olla vähirakkude ja tüvirakkude molekulaarsete signaaliradade võrdlemine, mis on seotud diferentsieerumise, tumorigeneesi ja eneseuuenemisega.

LGR5 valku on kasutatud selleks, et eristada normaalseid rakke kasvajakarakkudest. Yamamoto ja tema uurimisgrupp tuvastasid LGR5 üleekspressiooni hepatotsellulaarse kartsinoomi (HCC, ingl *hepatocellular carcinoma*) puhul. Mutatsioonid β -kateniinis põhjustasid kanoonilise Wnt signaaliraja ebatavalist aktivatsiooni (Yamamoto jt., 2003). LGR5 on kõrgelt ekspresseeritud ka glioblastoomi tüviraku-sarnastes rakkudes. Viidatud uurimuses leiti, et LGR5 ekspressioonitase kasvas glioblastoomi arenguga, seega võib LGR5 olla oluline aju tüviraku-sarnaste rakkude säilitamiseks. Pärast glioblastoomi tüvirakkude indutseeritud diferentseerumist LGR5 ekspressioonitase vähenes, LGR5 geeniekspressiooni inhibeerimine põhjustab aga glioblastoomi tüviraku-sarnaste rakkude surma (Nakata jt., 2013; Mao jt., 2013).

1.3 LGR5 ja kanooniline Wnt signaalirada

LGR-valgud on Wnt/ β -kateniin signaaliraja fakultatiivsed koretseptorid interakteerudes Frizzled/LRP retseptorkompleksiga (Joonis 4). LGR-valkude ligandideks on R-spondiin valgud (de Lau jt., 2011). R-spondiin valkude perekonda kuulub neli valku: RSPO1, RSPO2, RSPO3 ja RSPO4, mis kõik suudavad kanoonilise/ β -kateniinist sõltuva Wnt signaaliraja aktiivsust suurendada Wnt ligandide juuresolekul. Oluline on märkida, et ilma Wnt ligandideta ei suuda R-spondiinid Wnt signaalirada aktiveerida (Kazanskaya jt., 2004; Kim jt., 2008). Kuna LGR5 on ka kanoonilise Wnt signaaliraja märklaudgeen, siis on LGR5 kaudu vahendatud signaal otseses sõltuvuses ligandi olemasolust (van de Wetering jt., 2002).

Praeguseks on kirjeldatud kaks erinevat Wnt signaalirada: β -kateniinist sõltuv ja β -kateniinist sõltumatu signaalirada. Mõlemad mõjutavad tüvirakkude diferentseerumist embrüonaalsetes ja täiskasvanud kudedes. Wnt ligandide seondumisel retseptorite ja koretseptoritega võidakse aktiveerida nii kanooniline kui mittekanooniline rada. Need rajad võivad üksteise mõju toetada või teineteisele hoopis vastanduda (van Camp jt., 2014).



Joonis 4. Wnt β -kateniin signaalirada. (a) Wnt ligandi puudumisel toimub β -kateniini lagundamine aksiin valgukompleksi kaudu. (b) Wnt ligandi juuresolekul saab LGR signaali võimendada. β -kateniini ei lagundata ja seega saab see liikuda tuuma ja reguleerida märklauageenide transkriptsiooni. Modifitseeritud (Nakata jt., 2014).

Kanooniline Wnt signaalirada reguleerib geeniekspressiooni β -kateniini taseme kontrolliga. Wnt ligandide puudumisel toimub β -kateniini pidev lagundamine multikomponentse lagundamiskompleksi abil, kuhu kuuluvad aksiin, kaseiini kinaas 1 α (CK1 α , ingl *casein kinase 1 α*), kooloni adenomatoosne polüpoos (APC, ingl *adenomatous polyposis coli*) ja glükogeeni süntaasi kinaas 3 β (GSK3 β , ingl *glycogen synthase kinase 3 β*) (Peifer ja Polakis, 2000). LGR5 poolt vahendatud kanooniline Wnt signaalirada aktiveeritakse kui Wnt ligand seondub rakumembraanis oleva ühtse membraankompleksiga, kuhu kuuluvad Frizzled valk, LGR5 ja lipoproteiini retseptoriga seotud valk (LRP, ingl *lipoprotein receptor-related protein*). Järgneb LRP fosforüleerimine CK1 α ja GSK3 β poolt ja Dishevelled valgu interaktsioon Frizzled valguga. Selle tulemusena vabaneb aksiin lagundamiskompleksist, β -kateniini enam ei lagundata ja tema tase tsütoplasmas saab tõusta. Seejärel liigub β -kateniin tuuma, kus ta seondub TCF/LEF (ingl *T-cell factor/lymphoid-enhancing factor*) perekonna

transkriptsioonifaktoritega (Hagen jt., 2004). Vastav kompleks koos mitmete koaktivaatoritega tagab raku- ja koespetsiifiliste sihtmärkgeenide efektiivse transkriptsiooni aktivatsiooni või supressiooni (Archbold jt., 2011; Teo jt., 2010). Kui β -kateniini tuumas pole, siis seondub TCF/LEF-ga TLE1 (ingl *transducin-like enhancer protein 1*), mille tagajärjel toimub transkriptsiooni repressioon histoonide deasetüleerimise ja kromatiini kokkupakkimise teel (Brantjes jt., 2001). Tuumorisupressori APC või aksiini funktsiooni kadumine toob endaga kaasa β -kateniini kuhjumise, mis indutseerib soolestiku kasvajat teket (Korinek jt., 1997; Liu jt., 2000; Rubinfeld jt., 1993; Su jt., 1993). Punktmutatsioonid β -kateniinis, mis takistavad tema lagundamist, põhjustavad samuti sooleadenoomi teket (Morin jt., 1997).

Wnt signaaliraja aktiivsus on vajalik keha telgede moodustumisel mitmete selgroogsete organismide arengus nagu näiteks hiires (Parr ja McMahon, 1995; Huelsken jt., 2000), paljude organismide organogeneesis (Stark jt., 1994) ja selgroogsete organismide rakkude migratsioonis (Bradley jt., 1993; Dierick ja Bejsovec, 1998). Wnt roll pluripotensete tüvirakkude säilimisel pole veel päris selge. Mitmete uurimuste kohaselt viib Wnt signaaliraja aktivatsioon inimese embrüonaalsete tüvirakkude (hESC, ingl *human embryonic stem cells*) pluripotentsuse kadumise ja mesodermi või endodermi rakkudeks diferentseerumiseni (Davidson jt., 2012; Sumi jt., 2008). Samuti on näidatud, et Wnt signaalirada on hädavajalik hESC pluripotentsuse säilimiseks (Anton jt., 2007; Ogawa jt., 2006). Nii kanooniline kui mittekanooniline Wnt signaalirada on vajalikud inimese mesenhümaalsete tüvirakkude paljunemis- ja diferentseerumisvõime säilimiseks (Etheridge jt., 2004; Liu jt., 2009).

1.4 Kasvajate ja tüvirakkudega seotud signaalirajad

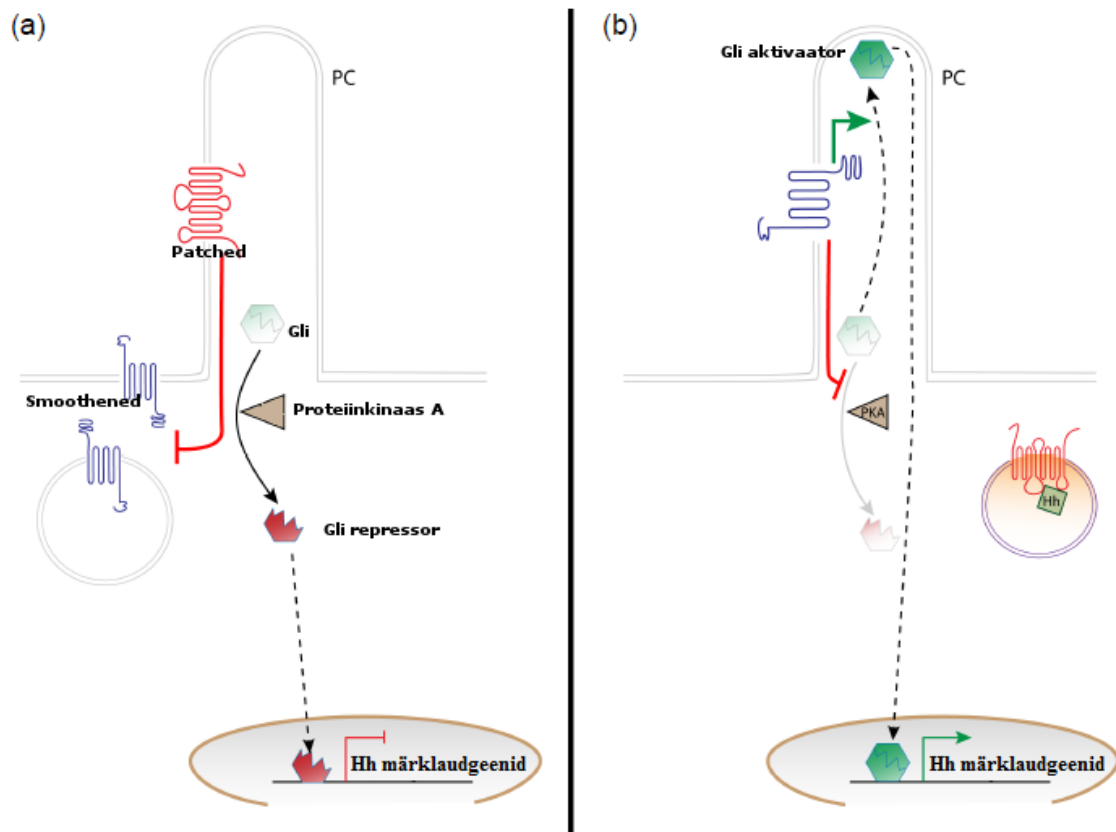
Uurides embrüonaalseid tüvirakke ja kasvajakke on leitud seitse signaalirada, mis on aktiivsed nii vähirakkudes kui tüvirakkudes. Need on JAK/STAT signaalirada, Notch signaalirada, MAP-kinaas/ERK signaalirada, PI3K/AKT signaalirada, NF κ B signaalirada, Wnt signaalirada ja TGFB signaalirada (Brivanlou ja Darnell, 2002). Mitmed signaalirajad nagu Wnt, Hedgehog ja Notch, mis muidu on aktiivsed normaalsetes täiskasvanud tüvirakkudes, on aktiivsed ka kasvaja tüvirakkudes. Aberrantne regulatsioon läbi nende signaaliradade viib neoplastilise proliferatsiooni ja kasvaja moodustumiseni (Ben-Porath jt., 2008; LaBarge, 2010).

1.4.1 Hedgehog signaalirada

Hedgehog signaalirada kirjeldati esimesena äädikakärbsel. See signaalirada on evolutsiooniliselt konserveerunud (Ingham ja McMahon, 2001; Nüsslein-Volhard ja Wieschaus, 1980) ja kontrollib kõikidel kahekülgsel mitmeid organismi arenguprotsesse. Imetajate Hedgehog signaalirajal on kolm sekreteeritavat ligandi: Sonic Hedgehog, Indian Hedgehog ja Desert Hedgehog (Echelard jt., 1993). Nendest ligandidest on kõige laialdasemalt ekspresseeritud Sonic Hedgehog (Shh), mis kontrollib proksimaal-distaalse ja dorso-ventrikulaarse telje korrektset moodustumist (Sampath jt., 1997; Pagan-Westphal ja Tabin, 1998; Watanabe ja Nakamura, 2000). Lisaks sellele on Shh ka mediaator polariseeruva aktiivsusega tsoonis (ZPA, ingl – *zone of polarizing activity*), kus kujuneb välja anterioorne-posterioorne telg (Riddle jt., 1993). Indian Hedgehog'i poolt koordineeritud Hedgehog signaaliraja aktiivsus on vajalik luude korrektseks arenguks (St-Jacques jt., 1999). Desert Hedgehog (Dhh) on ekspresseeritud ainult areneva organismi gonaadis. Dhh defektsete hiirte puhul on isashiired viljatud, kuna ei toimu spermide korrektset küpsemist (Bitgood jt., 1996). Hedgehog ligande seob mitu korda membraani läbiv Patched valk (Ingham jt., 1991) ja signaali edasikandmiseks rakus on vaja GPCR sarnast Smoothened valku (van den Heuvel ja Ingham, 1996) (Joonis 5).

Selgroogsetes organismides on Hedgehog ligandide vastus koordineeritud primaarse ripse (PC, ingl *primary cilium*) struktuuri poolt. Ligandi puudumisel lokaliseerub Patched PC regiooni, hoides sellega Smoothened valku inaktiivses olekus (Rohatgi jt., 2007). Proteiin kinaas A (PKA, ingl *protein kinase A*) lõikab Gli transkriptsioonifaktorit nii, et selle represseriv vorm liigub tuuma ja surub maha sihtmärkgeenide ekspressiooni (Ruiz i Altaba, 1999). Ligandi seondumisel Patched valguga liigub tekkinud kompleks tsütoplasmasse. Kuna Patched ei inhibeeri enam Smoothened'i aktiivsust, siis saab see liikuda PC regiooni, kus ta represserib Gli transkriptsioonifaktori lõikamist PKA poolt. Smoothened valk aktiveerib Gli transkriptsioonifaktori, mis liigub siis tuuma kus ta aktiveerib sihtmärkgeenide transkriptsiooni (Kogerman jt., 1999).

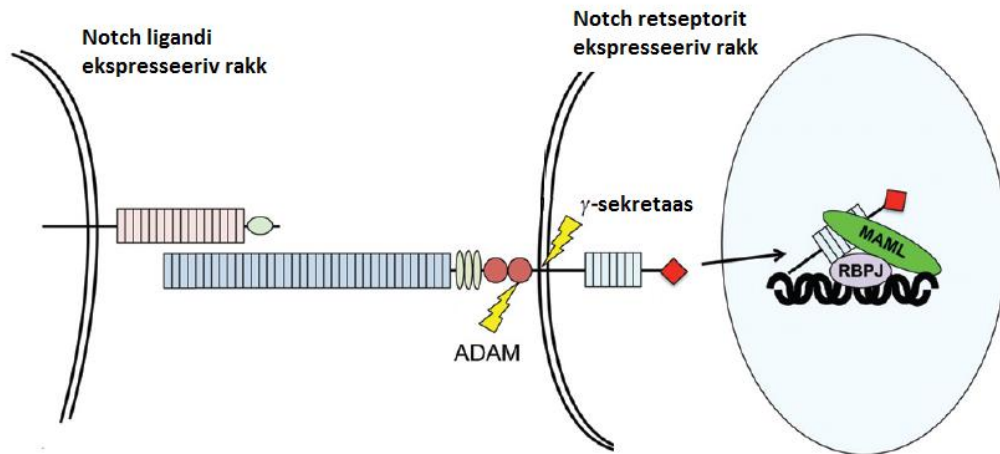
Hedgehog signaaliraja suurenenud aktiivsust on tähedatud mitmete vähivormide puhul nagu kopsu-, eesnäärme- ja kõhunäärmevähkides (Evangelista jt., 2006). Lisaks sellele veel nahavähi (BCC, ingl *basal cell carcinoma*) ja medulloblastoomi puhul. Medulloblastoom on peamiselt lastel esinev ajukasvaja, mis on ravile praktiliselt allumatu (Northcott jt., 2012).



Joonis 5. Hedgehog signaalirada. (a) Hedgehog ligandi puudumisel hoiab Patched valk Smoothened valku inaktiveeritud olekus. Toimub Gli transkriptsioonifaktori proteolüütiline lõikamine ja Gli repressor saab liikuda tuuma, kus ta surub maha geeniekpressiooni. (b) Ligandi olemasolul internaliseeritakse Patched valk ja Smoothened valgu funktsiooni ei inhibeerita. Smoothened valk blokeerib proteiinkinaasi funktsiooni ja lõikamata Gli saab aktiveerida geenide transkriptsiooni. Modifitseeritud (Carney ja Ingham, 2013).

1.4.2 Notch signaalirada

Imetajatel on neli erinevat transmembraanset Notch retseptorit (Notch 1-4), millel on ligandi-seondav ektodomään ja valk-valk interaktsiooniks vajalik intratsellulaarne domään (Blaumueller jt., 1997). Notch signaalirajal on viis kanoonilist transmembraanset ligandi (Delta-like 1, Delta-like 3 ja Delta-like 4, Jagged-1 ja Jagged-2) (Dunwoodie jt., 1997; Lindsell jt., 1995; Shawber jt., 1996). Notch signaaliraja aktiveerimiseks on vajalik rakk-rakk interaktsioon (Joonis 6).



Joonis 6. Notch signaalirada. Signaaliraja aktivatsiooniks on vajalik rakk-rakk interaktsioon. Kolme proteolüütilise lõikamise tulemusena moodustub aktiivne Notch element, mis liigub tuuma. Seal moodustub koos RBPJ faktori ja MAML aktivaatoriga Notch transkriptsioonikompleks, mis aktiveerib märklaudgeenide transkriptsiooni. Muudetud (Aster, 2014).

Notch signaalirada aktiveeritakse kolme järjestikuse proteolüütilise lõikamise tagajärjel. Esimene lõikamine toimub trans-Golgi võrgustikus (TGN, ingl *trans-golgi network*), kus furiini-sarnane konverteas (ingl *furine-like convertase*) toodab Notch eellas-retseptori, mis koosneb Notch ekstratsellulaarsest ja transmembraansest subühikust. Pärast ligandi seondumist eemaldatakse ekstratsellulaarne osa (Espinoza ja Miele, 2013). Seejärel toimub teine lõikamine plasmamembraanil, mida viib läbi kas ADAM 10 või ADAM 17 (ingl *a disintegrin and metalloproteinase 10 või 17*) (Brou jt., 2000). Viimase lõikamise teostab γ -sekretaasi kompleks (ingl *γ -secretase complex*) (Saxena jt., 2001). Nende kolme lõikamise lõpptulemusena moodustub aktiivne Notch intratsellulaarne fragment. See fragment liigub rakutuuma ja moodustab seal Notch transkriptsiooni kompleksi, mis lisaks Notch intratsellulaarsele domäänile sisaldab ka DNA-d seondavat RBPJ (ingl *Recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region*) faktorit ja MAML (ingl *mastermind-like*) koaktivaatoreid (Hsieh jt., 1999; Wu jt., 2000). Seejärel seonduvad kompleksiga veel mitmed koaktivaatorid ja mediaatorkompleksi komponendid ja toimub Notch sihtmärkgeenide transkriptsioon. Mitmed neist on seotud rakkude diferentseerumise ja ellujäämisega (Maier ja Gessler, 2000; Ronchini ja Capobianco, 2001; Weng jt., 2006).

Notch signaalirada kontrollib T-rakkude valmimist ja suunab hematopoeetiliste tüvirakkude (HSC, ingl *hematopoietic stem cells*) moodustumist. Embrüonaalses arengus on Notch signaalirada vajalik normaalseks vaskulogeneesiks ja arteriogeneesiks, samuti neoangiogeneesiks haava paranemises. Notch signaalirada võib olenevalt rakulisest kontekstist olla kas kasvajat supresseeriv või hoopis onkogeneen. Notch signaaliraja kontrollimatu aktivatsioon on seotud kasvajate uuesti tekkimise, ravimiresistentsuse ja metastaaside tekkimisega (Espinoza ja Miele, 2013). Notch retseptorite mutatsioonid esinevad T-raku lümfoblastilises leukeemias, MCL (ingl *mantle cell lymphoma*), spleenilises marginaalse tsooni lümfoomis (ingl *splenic marginal zone lymphoma*), kolmiknegatiivses rinnavähis ja gloomus kasvajates (ingl *glomus tumors*) (Aster, 2014). See, kuidas Notch signaalirada on integreerunud teiste signaaliradadega vastava raku füsioloogias, määrab ära selle, kuidas Notch mõjutab raku diferentseerumist (Hori jt., 2013). Notch signaalirada on vajalik tüvirakkude omaduste säilitamiseks, diferentseerumieks ja proliferatsiooniks ja seda pea kõikides uuritud tüviraku süsteemides nagu näiteks soolestikus, hematopoeetilises süsteemis, mitmetes epiteelides, lihastes, mesenhüümis, närvisüsteemis jne (Carlson jt., 2008; Conboy ja Rando, 2002; Conboy jt., 2003; Kageyama jt., 2010; Liu jt., 2010; Perdigoto jt., 2011). Notch signaalirada ja selle seos mitme teiste signaaliradadega on vajalik rinnavähi rakkude kasvuks, migratsiooniks, invasiooniks, metastaaside tekkeks ja ka vähi tüvirakkude (CSC) taastootmiseks. Uute veresoonte moodustumine olemasolevatest (angiogenees) on vajalik metastaatilise kasvaja kasvuks ja arenguks (Hanahan ja Weinberg, 2011). Inimese rinnavähis reguleerib Hedgehog signaalirada koos Notch ja Wnt signaaliradadega rinnavähi tüvirakkude proliferatsiooni ja diferentseerumist (Zhao jt., 2010).

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Töö eesmärk

Töö eesmärgiks oli uurida potentsiaalselt konstitutiivselt aktiivsete mutantsete LGR5 valkude mõju Wnt, Notch ja Hedgehog signaaliradadele transfekteeritud rakkudes.

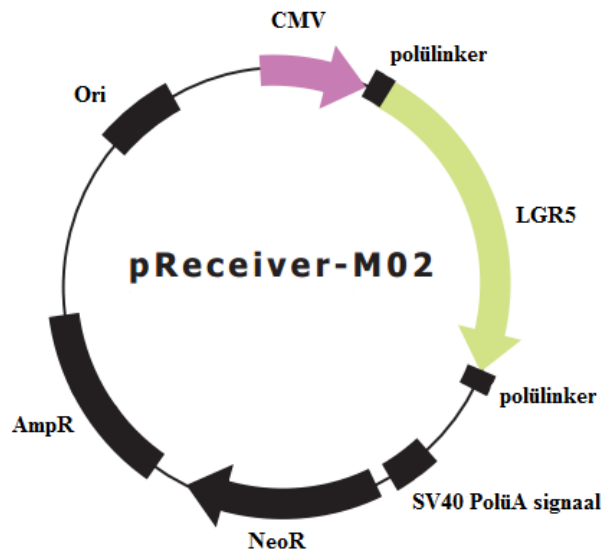
2.2 Materjal ja meetodika

2.2.1 Kasutatud rakuliin

Antud bakalaureusetöös kasutati inimese embrüonaalse neeru rakuliini Hek293. Rakke kasvatati 100 mm diameetriga koekultuuri tassidel (BD Falcon, USA) veeauruga küllastatud 37°C inkubaatoris 5% CO₂ sisalduse juures. Rakkude kasvatamiseks kasutati IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) söödet (*Lonza*, Belgia), mis sisaldas 10% veise loote seerumit (FBS, ingl *fetal bovine serum*) (*PAA Laboratories*, Austria) ning antibiootikumide penitsiiliin ja streptomütsiin segu (*PAA Laboratories*, Austria) lõppkontsentratsiooniga vastavalt 100 u/ml ja 0,1 mg/ml. Enne rakkude passeerimist pesti rakke 1x PBS-ga (ingl *phosphate buffered saline*) ja aspireeriti seejärel koos surnud rakkudega. Rakkude tassi küljest lahti võtmiseks kasutati trüpsiin-EDTA segu (0,05% trüpsiin ja 0,02% EDTA-d) (*PAA Laboratories*, Austria). Rakkude ja trüpsiin-EDTA segu pipeteeriti uuele IMDM söödet sisaldavale tassile ja loksutati ettevaatlikult, et rakud jaotuks tassil ühtlaselt. Rakke passeeriti sõltuvalt rakkude hulgast 2-3 päeva järel.

2.2.2 Ekspressioonivektorid

Käesolevas töös kasutati kolme LGR5 ekspressioonivektorit, mis kõik konstrueeriti Viljar Jaksi poolt. Vektorisse kloneeriti *LGR5* geeni kodeerivad järjestused. Neist kaks vektorit sisaldasid mutatsiooniga LGR5 valku kodeerivat järjestust, mille puhul on näidatud nende vektoritega transfekteeritud rakkude kiiremat kasvu võrreldes transfekteerimata rakkudega (Tampere, 2013). Kolmas vektor sisaldas metsiktüüpi LGR5 valgu kodeerivat järjestust. Kloneerimiseks kasutati pReceiver-M02 vektorit (Joonis 7).



Joonis 7. pReceiver-M02 vektor. Lisaks sisestatud *LGR5* geenile, sisaldab vektor nii ampitsilliini (AmpR) kui neomütsiini (NeoR) resistentsusgene.

Punktmutatsioonid tehti *LGR5* valgu kuuendasse transmembraansesse heeliksisse. Täpsemalt sellistesse positsioonidesse, mis *LGR5* homologide TSHR ja LHR puhul põhjustasid nende valkude konstitutiivset aktiivsust (Gao jt., 2006; Gozu jt., 2005; Nwosu jt., 2006; Tonacchera jt., 1998). Siit tuleneb ka eeldus, et tehtud *LGR5* mutandid on konstitutiivselt aktiivsed.

Transfektsiooni efektiivsuse hindamiseks kasutati õppetooli laborandi poolt puhastatud EGFP-d (ingl *enhanced green fluorescent protein*) ekspresseerivat vektorit. Negatiivse kontrollina kasutati vektorit, mis ei sisalda lisaks antibiootikumiresistentsusgenidele rohkem geeniinserte. Kasutatud plasmiidid on toodud tabelis 1.

Tabel 1. Kasutatud ekspressioonivektorid.

Nimi	SNP positsioon	Nukleotiidi asendus	Koodoni muutus	Aminohappeline muutus	Vektor
M2	2317	T→G	TTC→GTC	F773V	pReceiver-M02
M3	2321	A→T	ACC→ATC	T774I	pReceiver-M02
M002	Metsiktüüp	-	-	-	pReceiver-M02
P167	-	-	-	-	Tühi pC1 vektor
EGFP	-	-	-	-	pEGFP-N1

2.2.3 Plasmiidse DNA transformatsioon

Kompetentseid *Escherichia coli* DH5a tüve rakke transformeeriti eelnevalt kirjeldatud kolme LGR5 ekspressioonivektoriga. Kompetentsete rakkude segule, mahuga 100 µl, lisati 0,1 µl plasmiidse DNA segu, mis sisaldas keskmiselt 0,1 µg DNA-d. Segu inkubeeriti 30 minutit jääl. Kuumašokiks asetati rakud 3 minutiks 37 °C termostaati, millele järgnes rakkude jahutamine jääl 1 minuti jooksul. Rakkudele lisati 1 ml LB (Luria-Bertani) vedelsöödet ja inkubeeriti järgnevalt 45 minutit 37 °C kapis. Seejärel koguti rakud tsentrifuugides 3 minutit 3300 g juures (5451D, rootor F54-24-11, *Eppendorf*, Saksamaa), eemaldati sööde, suspendeeriti ja plaaditi siis eelnevalt soojendatud 100 µg/ml ampitsilliini sisaldava LB agarsöötmega Petri tassile. Tasse hoiti kolooniate tekkimiseks 16-20 tundi 37 °C kapis.

Seejärel valiti plaatidelt kolooniad. Igast kolooniast võeti külviaasaga materjali, mis pandi rakkude kasvatamiseks 2 ml LB söödet sisaldavasse kolbi, kuhu lisati ampitsilliini lõppkontsentratsioon 50 µg/ml. Kolvid asetati 37 °C loksutisse (SI-600R, *Medline Industries*, USA) ja inkubeeriti 20 tundi kiirusel 180 pöört/minutis.

Järgnevalt valati rakususpensioon 2 ml tuubi ja fuugiti 3 minutit 3300 g juures. Plasmiidse DNA eraldamiseks kasutati *Favorprep Plasmid Extraction Mini Kit* (*Favorgen Biotech Corp*, Hiina Vabariik) vastavalt tootja juhistele. Puhastatud plasmiidide saagikuse määramiseks kasutati *NanoDrop ND-1000* spektrofotomeetrit (*Thermo Scientific*, USA).

2.2.4 Plasmiidse DNA restriksioonianalüüs ja geelelektroforees

Plasmiidse DNA eraldamise järgselt kontrolliti produkti korrektsust restriksioonanalüüsi meetodiga. Selleks kasutati HindIII restriiktaasi (*Thermo Scientific*, USA) ja restriksioonipuhvrit R (*10x Buffer R*, *Thermo Scientific*, USA). Restriksioonisegu inkubeeriti 37 °C juures 1 tund. Proovide analüüsimiseks kasutati geelelektroforeesi ja 1% agarosgeeli. DNA visualiseerimiseks lisati agarosgeeli etiidiumbromiidi lõppkontsentratsiooniga 0,5 µg/ml. Proovide geelile kandmiseks kasutati laadimispuhvrit (*6x Loading Dye*, *Thermo Scientific*, USA) ja DNA fragmentide suuruse kontrolliks suurusmarkerit (*GeneRuler 1kb DNA Ladder*, *Thermo Scientific*, USA).

2.2.5 Rakkude transfekterimine

Hek293 rakke transfekteriti kolme eelnevalt puhastatud LGR5 plasmiidiga. Negatiivse kontrollina kasutati tühja vektorit sisaldavat plasmidi ja transfektsiooni efektiivsuse hindamiseks EGFP-d (ingl *enhanced green fluorescent protein*) ekspresseerivat vektorit.

Hek293 rakke transfekteriti 60 mm koekultuuritassidel (*Corning Inc*, USA), mida passeeriti 24 tundi enne transfektsiooni nii, et konfluentsus oleks transfektsioonihetkeks ~70%. Transfektsiooniks kasutati *Turbofect* (*Thermo Scientific*, USA) reagenti vastavalt tootja juhistele. Ühe tassi jaoks segati kokku 400 µl IMDM, 5 µg plasmiidset DNA-d ja 8 µl *Turbofect* reagenti. Segu inkubeeriti 20 minutit toatemperatuuril. Seejärel tilgutati transfektsioonisegu ettevaatlikult rakkudele. Transfektsioonisegu moodustas 10% söötme mahust, milles rakud kasvasid.

2.2.6 RNA ja valgu eraldamine transfekteritud rakkudest

RNA eraldati transfekteritud rakkudest 48 tundi pärast transfektsiooni. Tassidelt koguti sööde ja pipeteeriti eraldi 15 ml tuubidesse (*BD Biosciences*, USA). Pärast pesu PBS-iga inkubeeriti rakke trüpsiin-EDTA-ga, suspendeeriti rakke nii, et nad tuleks tassi küljest lahti ja pipeteeriti vastavatesse tuubidesse. Rakud koguti tsentrifuugides 5 minutit 1200 pööret/minutis (Sigma 4-16K, rootor 11150, *SciQuip*, Suurbritannia). Pärast söötme eemaldamist suspendeeriti rakud 1ml külmas PBS-s ja segu jagati võrdselt kahte eraldi 1,5 ml tuubi. Ühes tuubis olevaid rakke kasutati RNA eraldamiseks ja teises tuubis olevaid rakke valgu eraldamiseks.

RNA puhastamiseks kasutati *RNeasy Plus Mini Kit-i* (*Qiagen*, Holland) vastavalt tootja juhistele. RNA kontsentratsiooni mõõtmiseks ja RNA kvaliteedi hindamiseks kasutati *NanoDrop ND-1000* (*Thermo Scientific*, USA) spektrofotomeetrit.

Valkude eraldamiseks koguti PBS-is suspendeeritud rakud tsentrifuugides (Mikro 200R, *Hettich*, Saksamaa) 5 minutit 1200 pööret/minutis. Seejärel suspendeeriti rakud 150µl lüüsilahuses, mis sisaldas 145 µl lüüsi puhvrit (150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 8, 1% Nonidet P-40) ja 5 µl proteaasi inhibiitorite segu (*cOmplete Protease Inhibitor Cocktail Tablets*, *Roche*, Šveits). Rakke hoiti jääl olevas lüüsilahuses 1 tund. Lüüsitud segu tsentrifuugiti 20 minutit 12 000 pööret/minutis 4 °C juures ja eemaldati valke sisaldav supernatant. Valgu kontsentratsioon mõõdeti Bradfordi meetodil, kasutades selleks *Pierce BCA Protein Assay Kit-i* (*Thermo Scientific*, USA) vastavalt tootja juhistele. 12 µl supernatanti pipeteeriti 96-kannulisele mikrotiiterplaadile, kuhu oli eelnevalt iga proovi kohta lisatud 100 µl reagenti.

Negatiivse kontrollina lisati reagentidele lüüsilahust. Proove inkubeeriti 30 minutit 37 °C kapis, millele järgnevalt mõõdeti valgu kontsentratsioon lainepikkusel 540 nm kasutades *Multiskan Ascent* (Thermo Scientific, USA) fotokolorimeetrit. Valgususpensioonile lisati ¼ osa *Laemmli* puhvrit (277.8 mM Tris-HCl pH 6,8, 4.4% LDS, 44.4% glütserool, 0.02% bromofenool sinine).

2.2.7 Valkude ekspressiooni analüüs *Western blot* meetodil

Valkude lahutamiseks kasutati 10% SDS-polüakrüülamiidgeeli ja voolutamiseks 1x SDS-jooksupuhvrit (25 mM Tris, 192 mM glütsiin, 0,1% SDS). Fotokolorimeetriselt saadud andmete põhjal arvutati välja proovide mahud, milles oleks võrdne kogus valku. Enne geelile kandmist, kuumutati valguproove 4 minutit 100 °C juures ja valkude molekulmassi mõõtmiseks kasutati suurusmarkerit (*PageRuler Prestained protein ladder*, Thermo Scientific, USA). Poolkuiva ülekande eel niisutati membraani (*PVDF transfer membrane* Thermo Scientific, USA) metanoolis ja asetati ülekandepuhvrissse (24 mM Tris, 39 mM glütsiin, 0,0375% SDS, 20% metanool). Samas lahuses inkubeeriti ka polüakrüülamiidgeeli. Ülekanne viidi läbi seadmega *Trans-Blot Semi-Dry Transfer Cell* (Bio-Rad, USA) konstantsel pingel 20V 30 minutit. Pärast valkude ülekandmist membraanile inkubeeriti membraani blokeerimislahuses (1x PBS, 0,05% Tween20 ja 5% lõssipulbrit) 1 tund. Seejärel inkubeeriti membraani primaarse antikehaga 4 °C juures üleöö. Primaarse antikehana kasutati LGR5-spetsiifilist küüliku monoklonaalset antikeha (*Abcam PLC*, Suurbritannia) lahjendusega 1:1000 ja valkude ülkonsentratsioon detekteeriti kasutades aktiini(I-19)-spetsiifilist küüliku polükloonaalset antikeha (*Santa Cruz biotechnology*, USA) lõppkonsentratsiooniga 1µg/ml. Järgnevalt pesti membraani 3 korda 7 minutit pesulahusega (1x PBS, 0,05% Tween20). Seejärel inkubeeriti membraani toatemperatuuril 1 tund sekundaarse antikehaga, milleks oli määrõika peroksüdaasiga seotud küüliku immunoglobuliinide vastane kitse polükloonaalne antikeha (*Cell Signaling Technology*, USA) lahjendusega 1:3000. Pärast inkubatsiooni pesti membraani 3 korda 7 minuti jooksul pesulahusega ja detekteeriti valk kemoluminestsentsi meetodil, kasutades *Immobilon Western Kit*-i reagente (*Merck Millipore*, USA) vastavalt tootja protokollile.

2.2.8 RNA töötlus DNAasI-ga ja cDNA süntees

Võimaliku genoomse DNA hüdrolüüsamiseks töödeldi RNA proove DNAasI-ga. Reaktsioonisegu sisaldas järgmisi komponente:

- RNA – 1 µg
- 10x Dnaas I reaktsioonipuhver (MgCl₂) (*Thermo Scientific*, USA) – 1 µl
- DNAasI (*Thermo Scientific*, USA) – 1 µl (1u/µl)
- RiboLock RNase inhibiitor (*Thermo Scientific*, USA) – 0,25 µl
- Vesi (RNase vaba) – kuni 10 µl

Reaktsioonisegu inkubeeriti 30 minutit 37 °C juures. Seejärel lisati segule 1 µl 50 mM EDTA-d (*Thermo Scientific*, USA) ja inkubeeriti DNAasI inhibeerimiseks 10 minutit 65 °C juures. cDNA sünteesiti samadest proovidest, kasutades *RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit*'i (*Thermo Scientific*, USA) vastavalt tootja juhistele.

2.2.9 Praimerite disain

Praimerid disainiti geenidele mis iseloomustavad Wnt, Hedgehog ja Notch signaaliradade aktiivsust. Geeni järjestuse teadasaamiseks kasutati ENSEMBL andmebaasi (www.ensembl.org), kust võeti iga geeni kõige pikem transkript. Praimerite disainimiseks kasutati *Primer 3* tarkvara (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3>) järgnevate tingimustega:

- Produkti suurus – 200-350 nukleotiidi
- Maksimaalne 3' stabiilsus – 6
- Praimeri pikkus (miinimum/optimaalne/maksimum) – 19/23/26 (nukleotiidi)
- Praimeri seondumistemperatuur (miinimum/optimaalne/maksimum) – 62/64/67 (°C)
- Praimeri GC % sisaldus – 40-60 %
- Maksimaalne komplementaarsus – 4 nukleotiidi

Praimerite omavaheline komplementaarsus määrati *Operon Oligo Analysis Tool* tarkvara abil (<http://www.operon.com/tools/oligo-analysis-tool.aspx>). Maksimaalne lubatud komplementaarsus oli 4 nukleotiidi, kui komplementaarsed järjestused ei asunud praimerite 3' otsas. Kõik praimerid disainiti järgides samu eelpool toodud parameetreid. Praimerite järjestused on toodud tabelis 2.

Tabel 2. Kasutatud praimerid.

Uuritav geen	<i>Forward</i> praimer	<i>Reverse</i> praimer
<i>LGR5</i>	5'-cattttccactttgccatccctaat-3'	5'-ccatactgctgttgccacctttattc-3'
<i>AXIN2</i>	5'-tgggggtcaggggagggcatc-3'	5'-tctgcccgcctgctctccag-3'
<i>GLII</i>	5'-acaaggctggaccccaaagga-3'	5'-tctcacctctgctggatgcca-3'
<i>HER1</i>	5'-ctgggtgcggaagagaaagaatac-3'	5'-cttggggcgactatctgctctat-3'
<i>HES1</i>	5'-ccggagctggtgctgataac-3'	5'-tgtgctcagatgctgtctttggtta-3'
<i>PTCH1</i>	5'-acacacacgacaataaccgctacag-3'	5'-tggttcaagaggaaaggagcatag-3'
<i>HPRT1</i>	5'-gccctggcgtcgtgattag-3'	5'-atagcccccttgagcacaca-3'

2.2.10 Praimerite kontroll polümeraasi ahelreaktsiooniga

Praimerite korrektset funktsioneerimist hinnati polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR) meetodiga, kasutades termotsüklerit (Applied Biosystems 2720, *Thermo Scientific*, USA). Proovidena kasutati transfekteeritud rakkudest eraldatud RNA-st sünteesitud cDNA-d. PCR reaktsioon viidi läbi 10 µl lahuses, mis sisaldas 2 µl 5x *FIREPol*[®] *Master Mix* (*Solis BioDyne*, Eesti), 5 µl mQ vett, 1 µl mõlemat praimerit ja 1 µl DNA-proovi lahust. Amplifikatsioonireaktsiooniks kasutatud tingimused on toodud tabelis 3. Konstrueeritud praimerite optimaalne seondumistemperatuur varieerus 61,3 °C ja 64,5 °C vahel. Katsetes kasutati seondumistemperatuuri 64,5 °C.

Tabel 3. PCR programm.

Protsess	Temperatuur	Aeg	Tsükli arv
Esialgne denaturatsioon	94 °C	3 minutit	1
Denaturatsioon	94 °C	30 sekundit	35
Praimeri seondumine	64,5 °C	30 sekundit	
Elongatsioon	72 °C	1 minut	
Täiendav elongatsioon	72 °C	5 minutit	1

2.2.11 Kvantitatiivne reaalaaja PCR

Kvantitatiivne reaalaaja-PCR viidi läbi *LightCycler 480 Instrument II* (Roche, Šveits) masinal *LightCycler 480 SW 1.5* tarkvaraga. Reaktsioonisegu maht oli 10 µl, mis koosnes 5 µl Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (*Thermo Scientific*, USA), 0,5 µl 0,2 µM *forward* ja *reverse* praimerid, 0,2 µl cDNA lahus ja 3,8 µl mQ vesi. Kõik proovid kanti qPCR plaadile kolmes korduses. Kõikide praimeritega viidi katse läbi kolmes korduses. Uuritavate geenide mRNA ekspressioonitaseme normaliseerimiseks kasutati *HPRT1* (ingl *hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase 1*) geeni ekspressiooni. Suhteline ekspressioonitase (x) arvutati $\Delta\Delta C_t$ valemiga $x=2^{-\Delta\Delta C_t}$. Kasutatud qPCR programm on toodud tabelis 4.

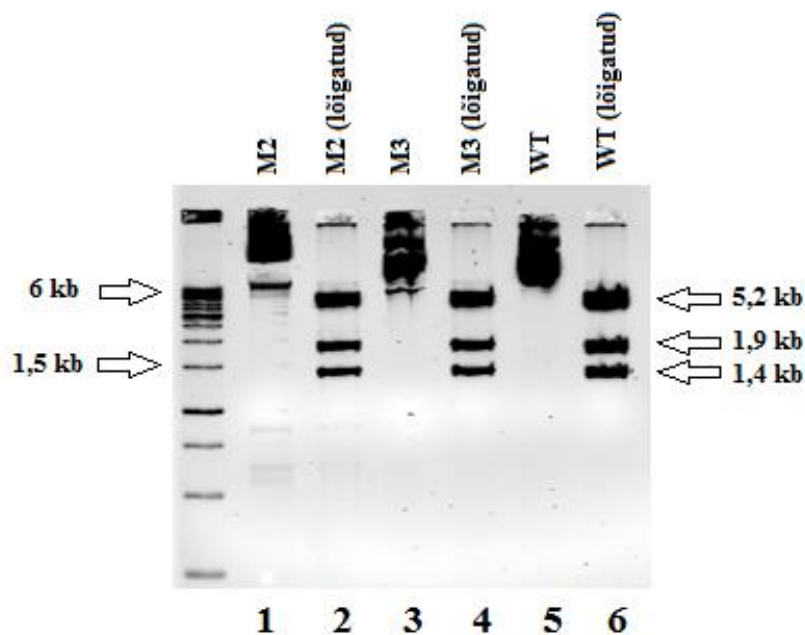
Tabel 4. qPCR programm

Temperatuur	Aeg	Tsüklite arv
95 °C	10 minutit	1
95 °C	15 sekundit	40
65 °C	1 minut	

2.3 Tulemused ja arutelu

2.3.1 LGR5 plasmiidide kontroll

Plasmiidid transformeeriti paljundamiseks *Escherichia coli* DH5 α rakkudesse. Pärast plasmiidse DNA eraldamist kontrolliti plasmiidide korrektsust HindIII restriiktaasiga (Joonis 7).

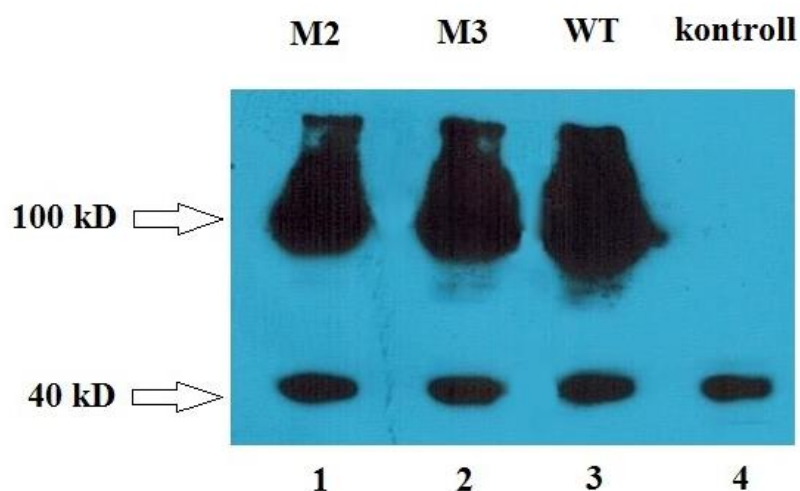


Joonis 7. Plasmiidse DNA restriksioonanalüüs geelelektroforeesil. Restrikteerimata ja restrikteeritud proovid on geelile kantud vaheldumisi. Mutantset LGR5 sisaldavad plasmiidid on tähistatud tähistega „M2“ ja „M3“, metsiktüüpi LGR5 sisaldav plasmiid tähistega „WT“.

Restrikteerimata plasmidi pikkus on 8,5 kb ja vastavatel radadel saab eristada kolme erinevat plasmiidse DNA vormi. Kõige kaugemale on liikunud DNA molekul, mis topoloogiliste pingete tõttu omab geelis liikumiseks vähem takistust ja seega liigub kaugemale kui lineaarne kaheaahelaline DNA molekul liiguks. Selle kohal asuvad plasmiidse DNA vormid, mis sisaldavad üheaahelalist katket või mis ei ole superspiraliseerunud ja liiguvad seetõttu geelis aeglasemalt. Restrikteeritud plasmiidid andsid kolm fragmenti suurusega 5,2 kb, 1,9 kb ja 1,4 kb. Fragmentid on eeldatud pikkusega, mis tähendab seda, et plasmiidid sisaldavad korrektselt vektorisse sisestatud LGR5 kodeerivat järjestust. Eraldatud plasmiidide puhtust kontrolliti ka spektrofotomeetriliselt, mille tulemused kinnitasid samuti plasmiidide korrektsust.

2.3.2 LGR5 valgu ekspressioon

Selleks, et veenduda, kas erinevaid LGR5 vorme ekspresseeritakse sarnasel tasemel transfekteeeriti Hek293 rakke LGR5 plasmiidide, tühja plasmidi ja EGFP-d ekspresseeriva sisaldava plasmiidiga. Transfektsiooniefektiivsust hinnati visuaalselt EGFP abil, mis oli erinevate katsete puhul 50-70 %. 48 tundi pärast transfektsiooni eraldati rakkudest valgud mida analüüsiti *Western blot* meetodil (Joonis 8).



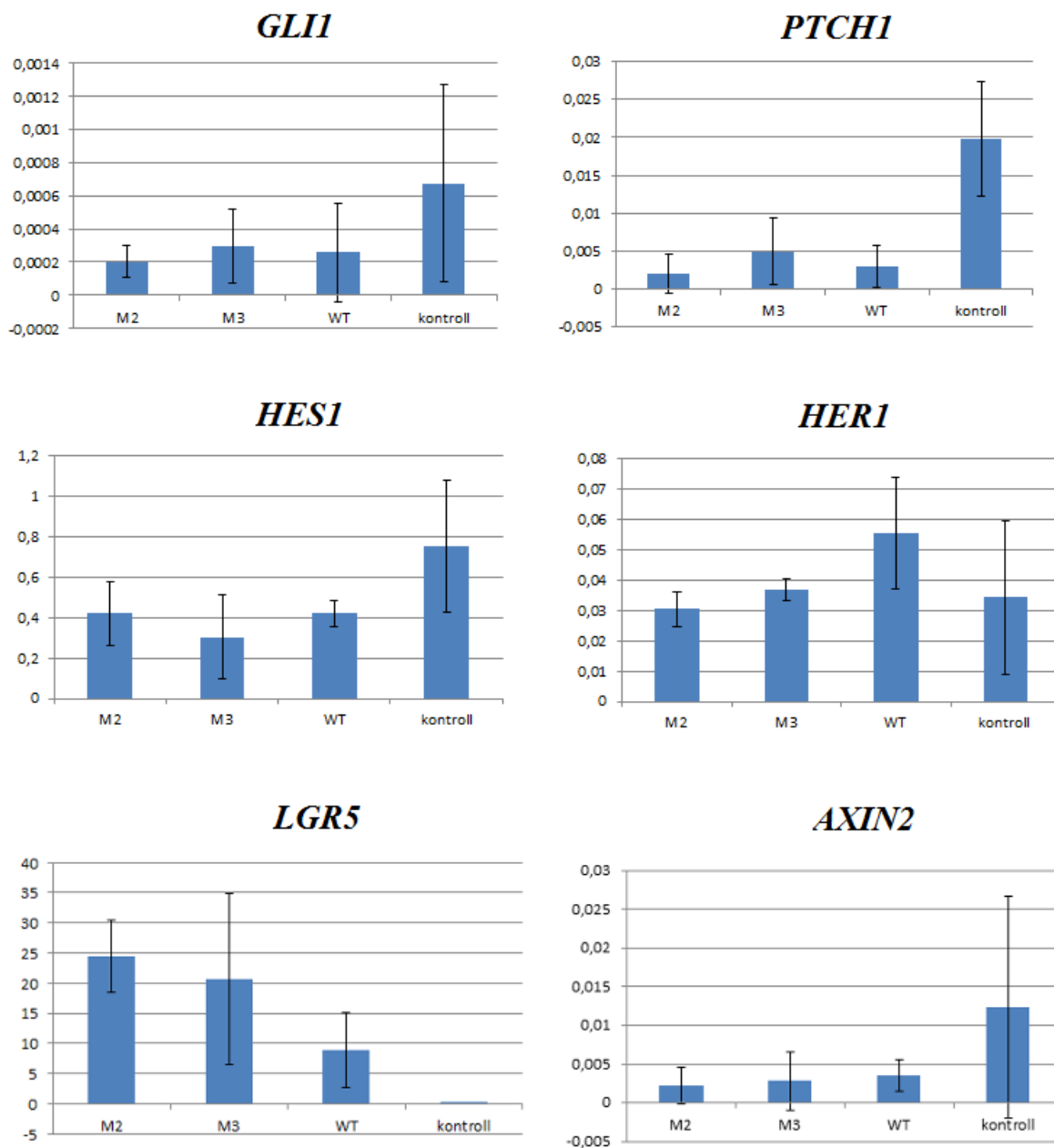
Joonis 8. LGR5 ja aktiini ekspressioon *Western blot* analüüsil. Aktiini suurus on 43 kD ja LGR5 suurus 100 kD. Mutantsete *LGR5* plasmiididega transfekteeeritud rakkudest eraldatud valguproovid on tähistatud vastavalt „M2“ ja „M3“, metsiktüüpi *LGR5*-ga transfekteeeritud rakkude valguproov tähisega „WT“. Negatiivse kontrollina kasutati tühja vektoriga (P167) transfekteeeritud rakke.

Kõikides LGR5 kodeerivat järjestust sisaldavate vektoritega transfekteeeritud rakkudes ekspresseerus LGR5 suhteliselt võrdselt ning tühja vektoriga transfekteeeritud rakkudes polnud LGR5 ekspressioon detekteeritav. Seega võib järeldada, et rakkudesse sisestatud plasmiidid funktsioneerisid korrektselt. Aktiini kasutati kinnitamaks, et proovides on võrdne kogus üldvalku.

2.3.3 Kvantitatiivne reaalaaja PCR

Minu töö eesmärgiks oli uurida kuidas mutantne LGR5 mõjutab erinevaid signaaliradu. Muutused detekteeriti mRNA tasemel, kasutades selleks signaaliradade aktiivsust iseloomustavaid geene. Wnt signaaliraja uurimiseks disainiti praimerid *AXIN2* ja *LGR5* geenide jaoks. *AXIN2* poolt kodeeritud valk aksiin on vajalik β -kateniini lagundava valgukompleksi funktsioneerimiseks (Lee jt, 2003). LGR5 on Wnt signaaliraja koretseptor ja Wnt märklaudgeen (de Lau jt., 2011; Van der Flier jt., 2007). Hedgehog signaaliraja aktiivsuse uurimiseks kasutati *GLII* ja *PTCH1* geene. *GLII* kodeerib transkriptsioonifaktorit Gli, mis on vajalik Hedgehog märklaudgeenide ekspressiooniks ja Patched valk on Hedgehog signaaliraja retseptor (Alexandre jt., 1996; Ingham jt., 1991). Notch signaaliraja uurimiseks valiti geenid *HES1* ja *HER1*. *HES1* on Notch signaaliraja märklaudgeen ning tema ekspressioon aktiveerib Notch ligandide Delta-like ja Jagged ekspressiooni, käitudes kui signaaliraja võimendaja (Ohtsuka jt., 1999; Kageyama jt., 2008). Epidermaalse kasvufaktori retseptor on Notch signaaliraja märklaudgeen, mis on kodeeritud *HER1* geeni poolt (Giudicelli jt., 2007).

Kõikide qPCR tulemuste korral arvutati geenide ekspressioon *HPRT1* suhtes, kasutades $\Delta\Delta Ct$ võrrandit, kus Ct (cycle-threshold) tähistab tsükli arvu, mille juures produkti teke on jõudnud eksponentsiaalsesse faasi. Selle jaoks määrati kindel signaali läviväärtus. Seejärel lahutati Ct väärtus kokkuleppeliselt arvust 40, kuna sellise tsükliarvu juures on produkti teke eeldatavalt jõudnud platoole. Igas tsükliis suureneb produkti hulk 2 korda, seega on igal signaali detekteerimise hetkel produkti hulk $2^{(40-Ct)}$. Saadud väärtus erinevates proovides ühtlustati *HPRT1* produkti hulga järgi, mida peaks kõikides proovides võrdselt olema. Selleks jagati uuritava proovi $2^{(40-Ct)}$ väärtus *HPRT1* $2^{(40-Ct)}$ väärtusega. Saadud tulemus kirjeldab mRNA hulka uuritud proovides. Katset korrati kolm korda ja saadud tulemustest võeti aritmeetiline keskmine (Joonis 9).



Joonis 9. Geeniekspressioon qPCR meetodil. Y teljel on toodud vastava geeni ekspressioonitaseme suhe *HPRT1* geeniga. Graafikul on toodud 3 kolme katse keskmised tulemused standardveaga. Mutantse *LGR5*-ga transfekteeeritud rakkudest eraldatud RNA proovid on tähistatud „M2“ ja „M3“-ga, metsiktüüpi *LGR5* sisaldavate rakkude RNA proovid „WT“-ga ja tühja plasmiidiga transfekteeeritud rakkude RNA proovid tähisega „kontroll“.

GLI1 ja *PTCH1* genide ekspressioonimuster erinevates proovides on sarnane. Metsiktüüpi ja mutantsete *LGR5* sisaldavate vektoritega transfekteeeritud rakkudes on Hedgehog signaaliraja retseptorvalgu Patched ja transkriptsioonifaktori Gli ekspressioon võrreldes tühja vektoriga

transfekteeeritud rakkudega maha surutud. Gli puhul on näha umbes kolme-, Patched'i puhul neljakordset ekspressioonitaseme vahet. Signaaliraja retseptorvalgu ja efektormolekuli ekspressiooni vähenemine viitab kogu Hedgehog signaaliraja mahasurumisele. Tühja vektoriga transfekteeritud rakkudes signaalirada aga maha ei suruta. Seega on muutus põhjustatud LGR5 valgu poolt, mitte transfektsioonil sisestatud plasmidi mõjust raku funktsioneerumisele. LGR5 ekspressiooni puudumist tühja vektoriga transfekteeritud rakkudes tõestavad ka *Western blot* analüüs ja *LGR5* mRNA taseme analüüs qPCR meetodil. Saadud tulemused pole 95% usaldusnivool statistiliselt olulised. Siiski on näha tendents, kus Hedgehog signaalirada inhibeeritakse nii mutantse kui metsiktüüpi *LGR5* juuresolekul, seega ei oma mutandid teistsugust aktiveerivat või inhibeerivat efekti Hedgehog signaalirajale.

Mutantset *LGR5* kodeerivat järjestust sisaldavate plasmiididega transfekteeritud rakkudes on *HES1* ekspressioon samal tasemel võrreldes metsiktüüpi *LGR5* ekspresseerivate rakkudega. *HES1* kodeerib transkriptsioonifaktorit Hes1, mis tagab märklaudgeenide ekspressiooni. Hes1 aktiveerib ka Notch ligandide ekspressiooni ja võimedab sellega kogu signaalirada. *HES1* ekspressioonitasemes muutust pole, mis viitab sellele, et antud katses mutantne *LGR5* Notch signaalirada ei mõjuta. *HER1* puhul on täheldatav väike ekspressiooni tõus „M3“ mutandi puhul. Samas on efekt nii väike ja statistiliselt ei ole tulemus oluline. Käesoleva töö katsetulemuste põhjal võib *HES1* ja *HER1* ekspressioonist järeldada, et mutantsed *LGR5* valgud ei mõjuta Notch signaaliraja aktiivsust.

LGR5 mRNA üldine kõrge tase *LGR5* kodeerivat järjestust sisaldavate plasmiididega transfekteeritud rakkudes võrreldes tühja plasmiidiga transfekteeritud rakkudest eraldatud RNA-ga kinnitab *Western blot* analüüsil saadud tulemust, et *LGR5* valgud nendes rakkudes ekspresseeruvad. Samas ei ole mutantsed ja metsiktüüpi *LGR5* valgud võrdselt ekspresseeritud. Kahe mutandi „M2“ ja „M3“ ekspressioon on suhteliselt võrdne, kuid metsiktüüpi *LGR5* ekspressioonitase on üle kahe korra madalam. Üheaahelaline mRNA molekuli „eluiga“ varieerub imetajates mitmest minutist kuni 2-3 päevani. Mida stabiilsem on mRNA molekul, seda tõenäolisemalt temast valk transleeritakse. Seega on võimalik, et *LGR5* mutantsed ja metsiktüüpi geenid ekspresseeruvad võrdselt, kuid *LGR5* geeni tehtud punktmutatsioonid muudavad mRNA stabiilsemaks.

Võrreldes tühja vektoriga transfekteeritud rakkudega on *AXIN2* ekspressioon kõikides *LGR5* sisaldavate plasmiididega transfekteeritud rakkudes maha surutud. *LGR5* mutandid on eeldatavalt konstitutiivselt aktiivsed, mis tähendab seda, et retseptorid on aktiivsed ka ilma

ligandita. Konstitutiivselt aktiivse LGR5 suur hulk transfekteeritud rakkudes peaks Wnt/ β -kateniin signaalirada võimendama ka R-spondiin valkude puudumisel ja *AXIN2* ekspressioon võiks olla võimendatud. LGR5 mutantide puhul on *AXIN2* ekspressioonitase aga sama madal, kui metsiktüüpi LGR5 puhul ja seega ei kinnita antud tulemused konstrueeritud LGR5 mutantide konstitutiivsest aktiivsust. Selline tulemus seletab LGR5 mutantide ühtlast mõju Hedgehog ja Notch signaalirajale. Kui antud retseptorid pole konstitutiivselt aktiivsed, siis sõltub LGR5 aktivatsioon otseselt keskkonnas olevatest R-spondiin valkudest. Kuna katsed tehti ühesugustes tingimustes, siis oli eeldatavalt ka R-spondiinide hulk keskkonnas erinevate proovide puhul võrdne.

Kuna LGR5 kuuub G valgu-seoseliste retseptorite perekonda, siis selleks, et kontrollida, kas mutantsete LGR5 valkude konstitutiivne aktiivsus võib avalduda nende võimes aktiveerida G-valguga seotud signaale, tuleks uurida nende interaktsiooni G-valguga ja $G\alpha$ -subühiku poolt kontrollitud cAMP signaaliraja ja fosfatidüülinositol signaaliraja aktiivsust. cAMP signaalirada aktiveerib näiteks proteiinkinaas A, mis mõjutab raku metabolismi ja reguleerib geenide ekspressiooni (Taylor jt., 2008). Fosfatidüülinositol signaalirada reguleerib Ca^{2+} kaudu Ca^{2+} /kalmoduliin-sültuvate kinaaside (CAMK, ingl – *Ca^{2+}/calmodulin-dependent kinases*) aktiivsust, mis omakorda mõjutavad rakutsükli ja proliferatsiooni (Kahl jt., 2004; Skelding jt., 2011; Tanaka, 1988).

KOKKUVÕTE

G-valgu seoselised retseptorid on suur retseptorite perekond eukarüootides, mis on vajalikud signaali ülekandeks ja osalevad seega paljude raku füsioloogiliste funktsioonide täitmisel. Üks sellesse perekonda kuuluv retseptor on LGR5, mis interakteerub Wnt/ β -kateniin signaaliraja retseptorkompleksiga ja võimendab selle toimet. Lisaks sellele märgib LGR5 ekspressioon tüvirakke mitmetes kiiresti uuenevates kudedes nagu soolestikus ja karvafolliikulis.

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida kas potentsiaalselt konstitutiivselt aktiivsed LGR5 valgud mõjutavad Wnt, Notch ja Hedgehog signaaliradu. Selle uurimiseks transfekteeriti Hek293 rakke kahte erinevat potentsiaalselt konstitutiivselt aktiivset mutantset LGR5 kodeerivat järjestust sisaldavate plasmiididega ja metsiktüüpi LGR5 kodeerivat järjestust sisaldava plasmiidiga. Negatiivse kontrollina transfekteeriti rakke tühja vektoriga. LGR5 ekspressiooni transfekteeritud rakkudes kontrolliti *Western blot* meetodiga. Transfekteeritud rakkudest eraldati RNA, millest sünteesiti pöördtranskriptsiooni meetodil cDNA. Saadud proove analüüsiti qPCR meetodiga, kasutades signaaliradade aktiivsust iseloomustavate geenide primereid.

Kvantitatiivse PCR tulemused näitavad, et potentsiaalselt konstitutiivselt aktiivsed LGR5 mutandid mõjutavad kõiki uuritud signaaliradu sarnaselt metsiktüüpi LGR5-ga. Lisaks, kuna LGR5 mutantidel pole Wnt signaaliraja aktiivsusele täiendavat mõju, siis ei kinnita saadud katsetulemused LGR5 mutantide konstitutiivset aktiivsust.

LGR5 and cancer associated signaling pathways

Kaspar Eigi

SUMMARY

G protein-coupled receptors is a large family of transmembrane receptors, that detect and transmit signals into cells, which in turn activate different signaling pathways, controlling key physiological functions in the cell. One of the receptors in this family is LGR5. It has been shown, that LGR5 is a facultative co-receptor of the Wnt/ β -catenin signaling pathway, which can enhance Wnt signaling only in the presence of LGR5 ligands. LGR5 has also been identified as a stem cell marker in several rapidly renewing tissues, such as hair follicle and small intestine. Moreover, it has been shown, that LGR5 marks cells in several tumors. According to cancer stem cell theory, there is a small population of cells within a cancer that initiates and maintains tumor growth and development. Whether LGR5 marks cancer stem cells, is still to be elucidated.

The aim of this study was to examine how potentially constitutively active LGR5 mutants affect different cancer associated pathways like Wnt, Notch and Hedgehog pathways. Specific mutations in LGR5 were selected by one of the supervisors of this study and were based on previous studies showing that specific mutations in LGR5 homologues caused their constitutive activation. Hek293 cells were transfected with two plasmids with different LGR5 mutants and with a plasmid containing *wild type* LGR5. Cells were also transfected with an empty plasmid vector for control analysis. A *Western blot* analysis was made to evaluate LGR5 protein expression in transfected cells. For gene expression analysis, total RNA of the transfected cells was purified and used for qPCR analysis with signaling pathway specific gene primers.

Mutant LGR5 proteins did not have any additional effect on studied pathways compared to *wild type* LGR5 proteins. Interestingly LGR5 mutant proteins did not enhance Wnt signaling pathway. Based on these results constitutive activity of LGR5 mutants can not be confirmed.

TÄNUSÕNAD

Tahaksin eelkõige tänada juhendajaid Kristina Mäemets-Allast ja Viljar Jaksi kõiksuguse abi eest töö kirjutamisel. Samuti suured tänud Annika Treile, kes kannatlikult õpetas mulle laborimetoodikat ja alati vajadusel aitas. Suur aitäh ka kõikidele meie uurimisgrupi liikmetele hea nõu ja abistava käe eest.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Alexandre, C., Jacinto, A. ja Ingham, P. W. (1996). Transcriptional activation of hedgehog target genes in *Drosophila* is mediated directly by the cubitus interruptus protein, a member of the GLI family of zinc finger DNA-binding proteins. *Genes Dev.* 10: 2003-2013.
- Al-Hajj, M. ja Clarke, M. F. (2004). Self-renewal and solid tumor stem cells. *Oncogene* 23: 7274–7282.
- Allen, L. F., Lefkowitz, R. J., Caron, M. G. ja Cotecchia, S. (1991). G-protein-coupled receptor genes as protooncogenes: constitutively activating mutation of the alpha 1B-adrenergic receptor enhances mitogenesis and tumorigenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:11354–11358.
- Anton, R., Kestler, H. A. ja Kuhl, M. (2007). Beta-catenin signaling contributes to stemness and regulates early differentiation in murine embryonic stem cells. *FEBS Letters* 581: 5247–5254.
- Archbold, H. C., Yang, Y. X., Chen, L. ja Cadigan, K. M. (2011). How do they do Wnt they do?: regulation of transcription by the Wnt/beta-catenin pathway. *Acta Physiologica* (Oxford, England) 204: 74–109.
- Aster, J. C. In Brief: Notch signalling in health and disease. *J Pathol* 2014; 232: 1–3.
- Baldwin, J. M. (1993). The probable arrangement of the helices in G protein-coupled receptors. *EMBO J.* 12: 1693–1703.
- Ballesteros, J. A., Jensen A. D., Liapakis G., Rasmussen S. G., Shi L., Gether U. ja Javitch J. A. (2001). Activation of the β 2-adrenergic receptor involves disruption of an ionic lock between the cytoplasmic ends of transmembrane segments 3 and 6. *J. Biol. Chem.* 276: 29171-29177.
- Barker, N. ja Clevers, H. (2010). Leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptors as markers of adult stem cells. *Gastroenterology* 138: 1681-1696.
- Barker, N., van Es, J. H., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, M., Cozijnsen, M., Haegerbarth, A., Korving, J., Begthel, H., Peters, P. J. ja Clevers, H. (2007). Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature* 449: 1003-1007.
- Barrandon, Y. ja Green, H. (1987). Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 2302-2306.
- Ben-Porath, I., Thomson, M. W., Carey, V. J., Ge R., Bell G. W., Regev A. ja Weinberg R. A.

- (2008). An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nature Genetics* 40: 499–507.
- Bitgood, M. J., Shen, L. ja McMahon, A. P. (1996). Sertoli cell signaling by Desert hedgehog regulates the male germline. *Curr. Biol.* 6: 298-304.
- Blaumueller, C. M., Qi, H., Zagouras, P. ja Artavanis-Tsakonas, S. (Cell 1997). Intracellular cleavage of Notch leads to a heterodimeric receptor on the plasma membrane, *Cell* 90: 281–291.
- Boyer, J. L., Waldo, G. L. ja Harden, T. K. (1992). $\beta\gamma$ -Subunit activation of G-protein-regulated phospholipase C. *J.Biol. Chem.* 267: 25451-25456.
- Bradley, R. S., Cowin, P. ja Brown, A. M. (1993). Expression of Wnt-1 in PC12 cells results in modulation of plakoglobin and Ecadherin and increased cellular adhesion. *Journal of Cell Biology* 123: 1857–1865.
- Brantjes, H., Roose, J., van DeWetering, M. ja Clevers, H. (2001). All Tcf HMG box transcription factors interact with Groucho-related co-repressors. *Nucleic Acids Research* 29: 1410-1419.
- Brivanlou, A. H. ja Darnell, J. E. Jr. (2002). Signal transduction and the control of gene expression. *Science* 295: 813–818.
- Brou, C., Logeat, F., Gupta, N., Bessia, C., LeBail, O., Doedens, J. R., Cumano, A., Roux, P., Black, R. A. ja Israel, A. (2000). A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin–metalloprotease TACE. *Molecular Cell* 5: 207–216.
- Carlson, M. E., Hsu, M. ja Conboy, I. M. (2008). Imbalance between pSmad3 and Notch induces CDK inhibitors in old muscle stem cells. *Nature* 454: 528-532.
- Carney, T. J. ja Ingham, P. W. (2013). Drugging Hedgehog: signaling pathway to translation. *BMC Biol.* 11:37.
- Cheng, H. ja Leblond C. P. (1974a). Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. I. Columnar cell. *Am. J. Anat.* 141: 461-479.
- Cheng, H. ja Leblond, C. P. (1974b). Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. III. Entero-endocrine cells. *Am. J. Anat.* 141: 503-519.
- Chiang, C., Swan R. Z., Grachtchouk M., Bolinger M., Litingtung Y., Robertson E. K., Cooper M. K., Gaffield W., Westphal H., Beachy P. A. ja Dlugosz A. A. (1999). Essential role for Sonic hedgehog during hair follicle morphogenesis. *Dev. Biol.* 205 1–9.

- Clevers, H. (2006). Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 127: 469–480.
- Conboy, I. M., Conboy, M. J., Smythe, G. M. ja Rando, T. A. (2003). Notch-mediated restoration of regenerative potential to aged muscle. *Science* 302: 1575-1577.
- Conboy, I. M. ja Rando, T. A. (2002). The regulation of Notch signaling controls satellite cell activation and cell fate determination in postnatal myogenesis. *Dev. Cell.* 3: 397-409.
- Cotsarelis, G., Sun, T. T. ja Lavker, R. (1990). M. Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis. *Cell.* 61: 1329-1337.
- Davidson, K. C., Adams, A. M., Goodson, J. M., McDonald C. E., Potter J. C., Berndt J. D., Biechele T. L., Taylor R. J. ja Moon R. T. (2012). Wnt/ beta-catenin signaling promotes differentiation, not self-renewal, of human embryonic stem cells and is repressed by Oct4. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 109: 4485–4490.
- de Lau, W., Barker, N., Low, T. Y., Koo, B. K., Li, V. S., Teunissen, H., Kujala, P., Haegbarth, A., Peters, P. J., van de Wetering, M., Stange, D. E., van Es, J. E., Guardavaccaro, D., Schasfoort, R. B., Mohri, Y., Nishimori, K., Mohammed, S., Heck, A. J. ja Clevers, H. (2011). Lgr5 homologues associate with Wnt receptors and mediate R-spondin signalling. *Nature* 476: 293-297.
- de Lau, W., Snel, B. ja Clevers, H. C. (2012). The R-spondin protein family. *Genome Biol.* 13: 242-252.
- de Vries, L., Zheng B., Fischer T., Elenko E. ja Farquhar M. G. (2000). The regulator of G protein signaling family. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 40: 235- 271.
- Dierick, H. A. ja Bejsovec, A. (1998). Functional analysis of Wingless reveals a link between intercellular ligand transport and dorsal-cell-specific signaling. *Development* 125: 4729– 4738.
- Dunwoodie, S. L., Henrique, D., Harrison, S. M. ja Beddington, R.S. (1997). Mouse Dll3: a novel divergent Delta gene which may complement the function of other Delta homologues during early pattern formation in the mouse embryo. *Development* 124: 3065–3076.
- Echelard, Y., Epstein, D. J., St-Jacques, B., Shen, L., Mohler, J., McMahon, J. A., McMahon, A. P. (1993). Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell* 75: 1417-1430.
- Espinoza, I. ja Miele, L. (2013). Deadly crosstalk: Notch signaling at the intersection of EMT and cancer stem cells. *Cancer Left* 341: 41-45.

- Etheridge, S. L., Spencer, G. J., Heath, D. J. ja Genever, P. G. (2004). Expression profiling and functional analysis of wnt signaling mechanisms in mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 22: 849–860.
- Evangelista, M., Tian, H. ja de Sauvage, F. J. (2006). The hedgehog signaling pathway in cancer. *Clin. Cancer Res.* 12: 5924-5928.
- Eyler, C. E. ja Rich, J. N. (2008). Survival of the fittest: cancer stem cells in therapeutic resistance and angiogenesis. *J. Clin. Oncol.* 26: 2839–2845.
- Farahbakhsh, Z. T., Ridge, K. D., Khorana, H. G. ja Hubbell, W. L. (1995). Mapping light-dependent structural changes in the cytoplasmic loop connecting helices C and D in rhodopsin: a site-directed spin labeling study. *Biochemistry* 34: 8812-8819.
- Fredriksson, R., Lagerström, M. C., Lundin, L. G. ja Schiöth, H. B. (2003). The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol. Pharmacol.* 63: 1256-1272.
- Gat, U., DasGupta, R., Degenstein, L. ja Fuchs, E. (1998). De Novo hair follicle morphogenesis and hair tumors in mice expressing a truncated beta-catenin in skin. *Cell* 95: 605–614.
- Gao, Y., Kitagawa, K., Shimada, M., Uchida, C., Hattori, T., Oda, T. ja Kitagawa, M. (2006). Generation of a constitutively active mutant of human GPR48/LGR4, a G-protein-coupled receptor. *Hokkaido Igaku Zasshi* 81: 101-105, 107, 109.
- Gavrieli, Y., Sherman, Y. ja Ben-Sasson, S. A. (1992). Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.* 119: 493-501.
- Ghazizadeh, S. ja Taichman, L. B. (2001). Multiple classes of stem cells in cutaneous epithelium: a lineage analysis of adult mouse skin. *EMBO J.* 20: 1215-1222.
- Gilman, A. G. (1987). G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu. Rev. Biochem* 56: 615-649.
- Giudicelli, F., Ozbudak, E. M., Wright, G. J. ja Lewis, J. (2007). Setting the tempo in development: an investigation of the zebrafish somite clock mechanism. *PLoS Biol.* 5: E150.
- Gozu, H., Avsar, M., Bircan, R., Claus, M., Sahin, S., Sezgin, O., Deyneli, O., Paschke, R., Cirakoglu, B. ja Akalin, S. (2005). Two novel mutations in the sixth transmembrane segment of the thyrotropin receptor gene causing hyperfunctioning thyroid nodules. *Thyroid* 15: 389-397.
- Gutkind, J. S., Novotny, E. A., Brann, M. R. ja Robbins, K. C. Muscarinic acetylcholine

- receptor subtypes as agonist-dependent oncogenes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 4703-4707.
- Greco, V., Chen, T., Rendl, M., Schober, M., Pasolli, H. A., Stokes, N., Dela Cruz-Racelis, J. ja Fuchs, E. (2009). A two-step mechanism for stem cell activation during hair regeneration. *Cell Stem Cell* 4: 155–169.
- Hagen, T., Sethi, J. K., Foxwell, N., ja Vidal-Puig, A. (2004). Signalling activity of beta-catenin targeted to different subcellular compartments. *Biochemical Journal* 379: 471–477.
- Hahn, W. C., Counter, C. M., Lundberg, A. S., Beijersbergen, R. L., Brooks, M. W., ja Weinberg, R. A. (1999). Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature* 400: 464–468.
- Hanahan, D. ja Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell* 144: 646–674.
- Hori, K., Sen, A. ja Artavanis-Tsakonas, S. (2013). Notch signaling at a glance. *Journal of Cell Science* 126: 2135–2140.
- Hsieh, J. J., Zhou, S., Chen, L., Young, D. B. ja Hayward, S. D. (1999). CIR, a corepressor linking the DNA binding factor CBF1 to the histone deacetylase complex. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 96: 23–28.
- Hsu, S. Y., Liang, S. G. ja Hsueh, A. J. (1998). Characterization of two LGR genes homologous to gonadotropin and thyrotropin receptors with extracellular leucine-rich repeats and a G protein-coupled, seven-transmembrane region. *Mol. Endocrinol.* 12: 1830-1845.
- Huelsken, J., Vogel, R., Brinkmann, V., Erdmann, B., Birchmeier, C. ja Birchmeier, W. (2000). Requirement for beta-catenin in anterior-posterior axis formation in mice. *Journal of Cell Biology* 148: 567–578.
- Ingham, P. W. ja McMahon, A. P. (2001). Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev.* 15: 3059-3087.
- Ingham, P. W., Taylor, A. M. ja Nakano, Y. (1991). Role of the *Drosophila* patched gene in positional signalling. *Nature* 353: 184-187.
- Jaks, V., Barker, N., Kasper, M., van Es, J. H., Snippert, H. J., Clevers, H. ja Toftgård, R. (2008). *Lgr5* marks cycling, yet long-lived, hair follicle stem cells. *Nat. Genet.* 40: 1291-1299.
- Julius, D., Livelli, T. J., Jessell, T. M. ja Axel, R. (1989). Ectopic expression of the serotonin 1c receptor and the triggering of malignant transformation. *Science* 244: 1057–1062.
- Kageyama, R., Niwa, Y., Shimojo, H., Kobayashi, T. ja Ohtsuka, T. (2010). Ultradian

- oscillations in Notch signaling regulate dynamic biological events. *Curr. Top Dev. Biol.* 92: 311-331.
- Kageyama, R., Ohtsuka, T. ja Kobayashi, T. (2008). Roles of *hes* genes in neural development. *Dev. Growth Differ.* 50: 97-103.
- Kahl, C. R. ja Means, A. R. (2004). Regulation of cyclin D1/Cdk4 complexes by calcium/calmodulin-dependent protein kinase I. *J. Biol. Chem.* 279: 15411-15419.
- Kazanskaya, O., Glinka A., del Barco Barrantes I., Stannek P., Niehrs C. ja Wu W. (2004). *R-Spondin2* is a secreted activator of Wnt/b-catenin signaling and is required for *Xenopus* myogenesis. *Dev. Cell* 7: 525–534.
- Kim, K. A. Wagle M., Tran K., Zhan X., Dixon M. A., Liu S., Gros D., Korver W., Yonkovich S., Tomasevic N., Binnerts M. ja Abo A. (2008). *R-spondin* family members regulate the Wnt pathway by a common mechanism. *Mol. Biol. Cell* 19: 2588–2596.
- Kim, T. H. , Escudero, S. ja Shivdasani, R. A. (2012). Intact function of *Lgr5* receptor-expressing intestinal stem cells in the absence of Paneth cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109: 3932–3937.
- Koch, U., Krause, M. ja Baumann, M. (2010). Cancer stem cells at the crossroads of current cancer therapy failures—radiation oncology perspective. *Seminars in Cancer Biology* 20: 116–124.
- Kogerman, P., Grimm, T., Kogerman, L., Krause, D., Undén, A. B., Sandstedt, B., Toftgård, R. ja Zaphiropoulos, P. G. (1999). Mammalian suppressor-of-fused modulates nuclear-cytoplasmic shuttling of *Gli-1*. *Nat. Cell Biol.* 1: 312-319.
- Kongkanunt, R., Bubb, V. J., Sansom, O. J., Wyllie, A. H., Harrison, D. J. ja Clarke, A. R. (1999). Dysregulated expression of beta-catenin marks early neoplastic change in *Apc* mutant mice, but not all lesions arising in *Msh2* deficient mice. *Oncogene* 18: 7219–7225.
- Korinek, V., Barker, N., Morin, P. J., van Wichen, D., de Weger, R., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. ja Clevers, H. (1997). Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in *APC*^{-/-} colon carcinoma. *Science* 275: 1784–1787.
- Kosinski, C., Li, V. S., Chan, A. S., Zhang J., Ho C., Tsui W. Y., Chan T. L., Mifflin R. C., Powell, D. W., Yuen, S. T., Leung, S. Y. ja Chen, X. (2007). Gene expression patterns of human colon tops and basal crypts and BMP antagonists as intestinal stem cell niche factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 15418– 15423.
- LaBarge, M. A. (2010). The difficulty of targeting cancer stem cell niches. *Clinical Cancer Research* 16: 3121–3129.

- Lim, X. ja Nusse, R. (2013). Wnt signaling in skin development, homeostasis, and disease. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 5.
- Lindsell, C. E., C.J. Shawber, C. J., Boulter, J. ja Weinmaster, G. (1995). Jagged: a mammalian ligand that activates Notch1. Cell 80: 909–917.
- Liu, G., Vijayakumar, S., Grumolato, L., Arroyave R., Qiao H., Akiri G. ja Aaronson S. A. (2009). Canonical Wnts function as potent regulators of osteogenesis by human mesenchymal stem cells. Journal of Cell Biology 185: 67–75.
- Liu, J., Sato, C., Cerletti, M. ja Wagers, A. (2010). Notch signaling in the regulation of stem cell self-renewal and differentiation. Curr. Top. Dev. Biol. 92: 367-409.
- Liu, W., Dong, X., Mai, M., Seelan, R. S., Taniguchi, K., Krishnadath, K. K., Halling, K. C., Cunningham, J. M., Boardman, L. A., Qian, C., Christensen, E., Schmidt, S. S., Roche, P. C., Smith, D. I. ja Thibodeau, S. N. (2000). Mutations in AXIN2 cause colorectal cancer with defective mismatch repair by activating beta-catenin/TCF signalling. Nat. Genet. 26: 146–147.
- Lee, E., Salic, A., Krüger, R., Heinrich, R. ja Kirschner, M. W. (2003). The Roles of APC and Axin Derived from Experimental and Theoretical Analysis of the Wnt Pathway. PLoS Biol. 1: E10.
- Maier, M. M. ja Gessler, M. (2000). Comparative analysis of the human and mouse Hey1 promoter: Hey genes are new Notch target genes. Biochemical and Biophysical Research Communications 275: 652–660.
- Mao, X. G., Song, S. J., Xue, X. Y., Yan, M., Wang, L., Lin, W., Guo, G. ja Zhang, X. (2013). LGR5 is a proneural factor and is regulated by OLIG2 in glioma stem-like cells. Cell Mol. Neurobiol. 33: 851–865.
- Marshman E., Booth, C. ja Potten, C. S. (2002). The intestinal epithelial stem cell. Bioessays 24: 91–98.
- Morin, P. J., Sparks, A. B., Korinek, V., Barker, N., Clevers, H., Vogelstein, B. ja Kinzler, K. W. (1997). Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. Science 275: 1787–1790.
- Nakata, S., Campos, B., Bageritz, J., Bermejo, J. L., Becker, N., Engel, F., Acker, T., Momma, S., Herold-Mende, C., Lichter, P., Radlwimmer, B. ja Goidts, V. (2013). LGR5 is a marker of poor prognosis in glioblastoma and is required for survival of brain cancer stem-like cells. Brain Pathol. 23: 60–72.
- Nakata S., Phillips E. ja Goidts V. (2014). Emerging role for leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptors LGR5 and LGR4 in cancer stem cells. Cancer Manag. Res. 6: 171-180.

- Northcott, P. A., Korshunov, A., Pfister, S. M. ja Taylor, M. D. The clinical implications of medulloblastoma subgroups. *Nat. Rev. Neurol.* 8: 340-351.
- Northup, J. K., Sternweis, P. C., Smigel, M. D., Schleifer, L. S., Ross, E. M. ja Gilman, A. G. (1980). Purification of the regulatory component of adenylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 6516-6520.
- Nüsslein-Volhard, C. ja Wieschaus, E. (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287: 795-801.
- Nwosu, B. U., Gourgiotis, L., Gershengorn, M. C. ja Neumann, S. (2006). A novel activating mutation in transmembrane helix 6 of the thyrotropin receptor as cause of hereditary nonautoimmune hyperthyroidism. *Thyroid* 16: 505-512.
- Ogawa, K., Nishinakamura, R., Iwamatsu, Y., Shimosato, D. ja Niwa, H. (2006). Synergistic action of Wnt and LIF in maintaining pluripotency of mouse ES cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 343: 159–166.
- Ohtsuka, T., Ishibashi M., Gradwohl G., Nakanishi S., Guillemot F. ja Kageyama R. (1999). Hes1 and Hes5 as notch effectors in mammalian neuronal differentiation. *EMBO J.* 18: 2196-2207.
- Pagan-Westphal, S. M. ja Tabin C. J. (1998). The transfer of left-right positional information during chick embryogenesis. *Cell* 93: 25-35.
- Parr, B. A. ja McMahon, A. P. (1995). Dorsalizing signal Wnt-7a required for normal polarity of D-V and A-P axes of mouse limb. *Nature* 374: 350–353.
- Peifer, M. ja Polakis, P. (2000). Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis--a look outside the nucleus. *Science* 287: 1606-1609.
- Perdigoto, C. N., Schweisguth, F. ja Bardin, A. J. (2011). Distinct levels of Notch activity for commitment and terminal differentiation of stem cells in the adult fly intestine. *Development* 138: 4585-4595.
- Pierce, K. L., Premont, R. T. ja Lefkowitz, R. J. (2002). Seven transmembrane receptors. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 3: 639–650.
- Potten, C. S. ja Loeffler, M. (1987). A comprehensive model of the crypts of the small intestine of the mouse provides insight into the mechanisms of cell migration and the proliferation hierarchy. *J. Theor. Biol.* 127: 381-391.
- Rasmussen, S. G., DeVree, B. T., Zou, Y., Kruse, A. C., Chung, K. Y., Kobilka, T. S., Thian, F. S., Chae, P. S., Pardon, E., Calinski, D., Mathiesen, J. M., Shah, S. T., Lyons, J. A., Caffrey, M., Gellman, S. H., Steyaert, J., Skiniotis, G., Weis, W. I., Sunahara, R. K. ja Kobilka, B. K. (2011). Crystal structure of the β_2 adrenergic receptor–Gs protein complex. *Nature* 477: 549–555.

- Riddle, R. D., Johnson, R. L., Laufer, E. ja Tabin, C. (1993). Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell* 75: 1401-1416.
- Rohatgi, R., Milenkovic, L. ja Scott, M. P. (2007). Patched1 regulates hedgehog signaling at the primary cilium. *Science* 317: 372-376.
- Ronchini, C. ja Capobianco, A. J. (2001). Induction of cyclin D1 transcription and CDK2 activity by Notch(ic): implication for cell cycle disruption in transformation by Notch(ic) *Molecular and Cellular Biology* 21: 5925–5934.
- Ross, E. M. ja Wilkie, T. M. (2000). GTPase-activating proteins for heterotrimeric G proteins: regulators of G protein signaling (RGS) and RGS-like proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 69: 795-827.
- Rubinfeld, B., Souza, B., Albert, I., Muller, O., Chamberlain, S. H., Masiarz, F. R., Munemitsu, S. ja Polakis, P. (1993). Association of the APC gene product with beta-catenin. *Science* 262: 1731–1734.
- Ruiz i Altaba, A. (1999). Gli proteins encode context-dependent positive and negative functions: implications for development and disease. *Development* 126: 3205-3216.
- Salzman, N. H., Hung, K., Haribhai, D., Chu, H., Karlsson-Sjoberg, J., Amir, E., Tegatz, P., Barman, M., Hayward, M., Eastwood, D., Stoel, M., Zhou, Y., Sodergren, E., Weinstock, G. M., Bevins, C. L., Williams, C. B. ja Bos, N. A. (2010) Enteric defensins are essential regulators of intestinal microbial ecology. *Nat. Immunol.* 11: 76–83.
- Sangiorgi, E. ja Capecchi, M. R. (2009). Bmi1 lineage tracing identifies a self-renewing pancreatic acinar cell subpopulation capable of maintaining pancreatic organ homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106: 7101-7106.
- Sampath, K., Cheng, A. M., Frisch, A. ja Wright, C. V. (1997). Functional differences among *Xenopus* nodal-related genes in left-right axis determination. *Development* 124: 3293–3302.
- Sato, T., van Es, J. H., Snippert, H. J., Stange, D. E., Vries, R. G., van den Born, M., Barker, N., Shroyer, N. F., van de Wetering, M. ja Clevers, H. (2011). Paneth cells constitute the niche for Lgr 5 stem cells in intestinal crypts. *Nature* 469: 415–418.
- Sato, T., Vries, R. G., Snippert, H. J., van de Wetering, M., Barker, N., Stange, D. E., van Es, J. H., Abo, A., Kujala, P., Peters, P. J. ja Clevers, H. (2009). Single Lgr 5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* 459: 262–265.
- Saxena, M. T., Schroeter, E. H., Mumm, J. S. ja Kopan, R. Murine notch homologs (N1–4)

- undergo presenilin-dependent proteolysis. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 40268–40273.
- Schuijers, J. ja Clevers, H. (2012). Adult mammalian stem cells: the role of Wnt, Lgr5 and R-spondins. *EMBO J.* 31: 2685-2696.
- Schöneberg, T., Schulz, A., Biebermann, H., Hermsdorf, T., Römpler, H. ja Sangkuhl, K. (2004). Mutant G-protein-coupled receptors as a cause of human diseases. *Pharmacol. Ther.* 104: 173-206.
- Shawber, C., Boulter, J., Lindsell, C. E. ja Weinmaster, G. (1996). Jagged2: a serrate-like gene expressed during rat embryogenesis. *Developmental Biology* 180: 370–376.
- Skelding, K. A., Rostas, J. A. P. ja Verrills, N. M. (2011). Controlling the cell cycle: the role of calcium/calmodulin-stimulated protein kinases I and II. *Cell Cycle* 10: 631-639.
- Stark, K., Vainio, S., Vassileva, G. ja McMahon, A. P. (1994). Epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney regulated by Wnt-4. *Nature* 372: 679–683.
- St-Jacques, B., Dassule, H. R., Karavanova, I., Botchkarev, V. A., Li, J., Danielian, P. S., McMahon, J. A., Lewis, P. M., Paus, R. ja McMahon, A. P. (1998). Sonic hedgehog signaling is essential for hair development. *Curr. Biol.* 8: 1058–1068.
- St-Jacques, B., Hammerschmidt, M. ja McMahon, A. P. (1999). Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes & Dev.* 13: 2072-2086.
- Su, L. K., Vogelstein, B. ja Kinzler, K. W. (1993) Association of the APC tumor suppressor protein with catenins. *Science* 262: 1734–1737.
- Sumi, T., Tsuneyoshi, N., Nakatsuji, N. ja Suemori, H. (2008). Defining early lineage specification of human embryonic stem cells by the orchestrated balance of canonical Wnt/beta-catenin, Activin/ Nodal and BMP signaling. *Development* 135: 2969–2979.
- Tampere, M. (2013). Konstitutiivselt aktiivsete LGR5 mutantide iseloomustamine. Bakalaureusetöö. Tartu Ülikool.
- Tan, B. T., Park, C. Y., Ailles, L. E. ja Weissman, I. L. (2006). The cancer stem cell hypothesis: A work in progress. *Laboratory Investigation* 86: 1203–1207.
- Tanaka, T. (1988). Calmodulin-dependent calcium signal transduction. *Jpn. J. Pharmacol.* 46: 101-107.
- Taylor, S. S., Kim, C., Cheng, C. Y., Brown S. H., Wu, J. ja Kannan, N. (2008). Signaling through cAMP and cAMP-dependent protein kinase: diverse strategies for drug design. *Biochim. Biophys. Acta* 1784: 16-26.

- Teo, J. L. ja Kahn, M. (2010). The Wnt signaling pathway in cellular proliferation and differentiation: a tale of two coactivators. *Advanced Drug Delivery Reviews* 62: 1149-1155.
- Tian, H., Biehs, B., Warming, S., Leong, K. G., Rangell, L., Klein, O. D. ja de Sauvage, F. J. (2011). A reserve stem cell population in small intestine renders Lgr5-positive cells dispensable. *Nature* 478 :255-259.
- Tonacchera, M., Vitti, P., Agretti, P., Giulianetti, B., Mazzi, B., Cavaliere, R., Ceccarini, G., Fiore, E., Viacava, P., Naccarato, A., Pinchera, A. ja Chiovato, L. (1998). Activating thyrotropin receptor mutations in histologically heterogeneous hyperfunctioning nodules of multinodular goiter. *Thyroid* 8: 559-564.
- Van Camp, J. K., Beckers, S., Zegers, D., Van Hul, W. (2014). Wnt signaling and the control of human stem cell fate. *Stem Cell Rev.* 10: 207-229.
- van den Heuvel, M. ja Ingham, P. (1996). W. smoothed encodes a receptor-like serpentine protein required for hedgehog signalling. *Nature* 382: 547-551.
- Van der Flier, L. G., Sabates-Bellver, J., Oving, I., Haegebarth, A., De Palo, M., Anti, M., Van Gijn, M. E., Suijkerbuijk, S., Van de Wetering, M., Marra, G. ja Clevers, H. (2007). The Intestinal Wnt/TCF Signature. *Gastroenterology* 132: 628-632-
- van de Wetering, M. Sancho, E., Verweij, C., de Lau, W., Oving, I., Hurlstone, A., van der Horn, K., Batlle, E., Coudreuse, D., Haramis, A. P., Tjon-Pon-Fong, M., Moerer, P., van den Born, M., Soete, G., Pals, S., Eilers, M., Medema, R. ja Clevers H. (2002). The b-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell* 111: 241–250.
- Van Keymeulen, A. ja Blanpain, C. (2012). Tracing epithelial stem cells during development, homeostasis, and repair. *J. Cell Biol.* 197: 575-584.
- Vassart, G. ja Costagliola, S. (2011). G protein-coupled receptors: mutations and endocrine diseases. *Nat. Rev. Endocrinol.* 7: 362-372.
- Visvader, J. E. ja Lindeman, G. J. (2008). Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat. Rev. Cancer* 8: 755–768.
- Watanabe, Y. ja Nakamura, H. (2000). Control of chick tectum territory along dorsoventral axis by Sonic hedgehog. *Development* 127: 1131-1140.
- Weng, A. P., Millholland, J. M., Yashiro-Ohtani, Y., Arcangeli, M. L., Lau, A., Wai, C., Del Bianco, C., Rodriguez, C. G., Sai, H., Tobias, J., Li, Y., Wolfe, M. S., Shachaf, C., Felsher, D., Blacklow, S. C., Pear, W. S. ja Aster, J. S. (2006). C-Myc is an important direct target of Notch1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Genes & Development* 20: 2096–2109.

- Wilson, C. L., Ouellette, A. J., Satchell, D. P., Ayabe, T., Lopez-Boado, Y. S., Stratman, J. L., Hultgren, S. J., Matrisian, L. M., Parks, W. C. (1999). Regulation of intestinal alpha-defensin activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense. *Science* 286: 113–117
- Wu, L., Aster, J. C., Blacklow, S. C., Lake, R., Artavanis-Tsakonas, S. ja Griffin, J. D. (2000). MAML1, a human homologue of *Drosophila* mastermind, is a transcriptional co-activator for NOTCH receptors. *Nature Genetics* 26: 484–489.
- Yamamoto, Y., Sakamoto, M., Fujii, G., Tsuiji, H., Kenetaka, K., Asaka, M. ja Hirohashi, S. (2003). Overexpression of orphan G-protein-coupled receptor, Gpr49, in human hepatocellular carcinomas with beta-catenin mutations. *Hepatology* 37: 528–533.
- Zhang, Y. V., Cheong, J., Ciapurin, N., McDermitt, D. J. ja Tumber, T. (2009). Distinct self-renewal and differentiation phases in the niche of infrequently dividing hair follicle stem cells. *Cell Stem Cell* 5: 267–278.
- Zhao, X., Malhotra, G. K., Lele, S. M., Lele, M. S., West, W. W., Eudy, J. D., Band, H. ja Band, V. (2010). Telomerase-immortalized human mammary stem/progenitor cells with ability to self-renew and differentiate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107: 14146–14151.

KASUTATUD VEEBILEHEKÜLJED

<http://www.ensembl.org/index.html>

<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/>

<http://www.operon.com/tools/oligo-analysis-tool.aspx>

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina Kaspar Eigi (13.06.1992)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „LGR5 ja kasvajaseoselised signaalirajad“ mille juhendajad on Kristina Mäemets-Allas ja Viljar Jaks

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

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **01.07.2017** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

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

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

Tartus, 26.05.2014