

Tartu Ülikool

Loodus- ja täppisteaduskond

Molekulaar- ja rakubioloogia instituut

Rakubioloogia õppetool

Kaisa Kuus

**Pluripotentsusega seotud markervalkude ekspressioon inimese kolorektaalse
adenokartsinoomi Caco2 rakkudes**

Magistritöö (40 EAP)

Juhendajad: Martin Pook PhD

Loodus- ja täppisteaduskond

Molekulaar- ja rakubioloogia instituut

Ljudmila Õunpuu MSc

Keemilise ja Bioloogilise Füüsika instituut

Aleksandr Klepinin MSc

Keemilise ja Bioloogilise Füüsika instituut

Biomeditsiin

Tartu 2018

Pluripotentsusega seotud markervalkude ekspressioon inimese kolorektaalse adenokartsinoomi Caco2 rakkudes

Inimese kolorektaalse kasvaja rakkudes on eelnevalt kirjeldatud pluripotentsusega seotud transkriptsioonifaktorite markervalkude ekspressiooni RNA tasemel kuid tihti pole täpsemalt välja selgitatud spetsiifiliste transkripti vormide esinemist ja pole teada ka antud valkude ekspressioon. Antud magistritöö raames kirjeldati peamiste pluripotentsusega seotud markervalkude ekspressiooni Caco2 rakkudes ning tuvastati nende muutused rakkude diferentseerumisel butüraadiga. Leiti, et Caco2 rakud ekspresseerivad OCT4B transkripti, kuid butüraadiga diferentseerumisel seda enam ei detekteeritud. OCT4B1 transkript tuvastati vaid butüraadiga mõjutamise korral kuid selle tulemuse kinntamiseks on vaja teha rohkem korduskatsid. OCT4A transkripti ja valku Caco2 rakkudes ei esinenud. Olenemata butüraadiga mõjutamisest esines Caco2 rakkudes NANOG2 transkript ja NANOG2 valk, kuid NANOG1 puudus. Selgus, et SSEA4 ekspressioon suureneb ja SOX2 ekspressioon väheneb butüraadiga mõjutamise korral ning SSEA3 on ekspresseeritud vaid väga vähestes Caco2 rakkudes.

Märksõnad: tüvirakud, jämesoolevähk, pluripotentsus, diferentseerumine, butüraat

B200 Tsütoloogia, onkoloogia, kantseroloogia

Expression of pluripotency related markerproteins in human colorectal adenocarcinoma Caco2 cells.

The expression of pluripotency related transcriptionfactors has been perviously described in Caco2 cells, albeit only at RNA level and there is lack of information about the expression of specific transcripts and protein isoforms of these transcriptionfactors. In current study, the expression of these main pluripotency markers was characterized in Caco2 cells and the changes in expression were noted after treatment of sodium butyrate. It was detected that these cells express OCT4B transcript, but only in case of no treatment with butyrate. The opposite was detected for OCT4B1 transcript, but this needs further validation. Caco2 cells did not express OCT4A transcript and OCT4A protein. Independent of treatment with butyrate, NANOG2 transcript and NANOG2 protein was detected in these cells, but NANOG1 was not detected. Additonally, SSEA4 expression was increased and SOX2 expression decreased after treatment with butyrate. The percentage of cells expressing SSEA3 was very low.

Keywords: stem cells, colorectal cancer, pluripotency, diferentiation, butyrate

B200 Cytology, oncology, cancerology

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1.1 Jämesoole ehitus	7
1.2 Jämesoolevähi ülevaade.....	7
1.3 Jämesoolevähi tekkemehhanismid.....	8
1.4 Caco2 rakud jämesoolevähi ja peensoole epiteeli mudelina	10
1.5 Butüraat kui histooni deatsetülaaside inhibiitor.....	11
1.6 Kasvajätüvirakud ja normaalsed tüvirakud.....	12
1.7 Pluripotentsid tüvirakke iseloomustavad markerid.....	15
1.7.1 OCT4	15
1.7.2 NANOG.....	17
1.7.3 SOX2	18
1.7.4 SSEA-1, SSEA-3 ja SSEA-4	20
1.7.5 Aluseline fosfataas.....	20
1.8 Töö eesmärk.....	22
2. MATERJAL JA METOODIKA	23
2.1 Reaktiivid.....	23
2.2 Kasutatud lahused ja nende koostised	24
2.3 Uuritav materjal	24
2.3.1 Rakkude kultiveerimine.....	24
2.3.2 Rakkude diferentseerimine butüraadiga	25
2.4 Fraktsioneerimine	25
2.5 Valgusisalduse määramine.....	26
2.6 Voolutsütomeetria.....	26
2.7 Immunofluorestsentsmikroskoopia.....	26
2.8 Western blot analüüs.....	27
2.9 PCR.....	27
2.10 Andmetöötlus.....	29
3. Tulemused	30
3.1 OCT4 transkriptide analüüs PCR metoodikal	30
3.2 NANOG transkriptide analüüs PCR metoodikal	31

3.3	Pluripotentsusega seotud SSEA-4, SSEA-3, NANOG ja OCT4 valkude ekspressiooni tuvastamine immunofluorestsentsmikroskoopiaga	32
3.4	Soolestiku aluselise fosfataasi valgu ekspressiooni tuvastamine immunofluorestsentsmikroskoopiaga	35
3.5	Pluripotentsusega seotud transkriptsioonifaktorite ja diferentseerumismarkeri ALPi analüüs western blot meetodil.....	36
3.6	SSEA-3, SSEA-4 ja SOX2 valgu ekspressioon läbivoolutsütofluorimeetrilne analüüs 38	
4.	Arutelu.....	40
	KOKKUVÕTE	43
	SUMMARY	45
	TÄNUAVALDUSED.....	47
	KIRJADUSE LOETELU	48
	Lisa	67
	Lisa 1.....	67
	Lisa 2.....	68
	Lisa 3.....	68
	Lisa 4.....	68
	Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks	69

KASUTATUD LÜHENDID

+4 rakud- vaikeoleku tüvirakud ALP- aluseline fosfataas (*alkaline phosphatase*)

ALPi- soolestiku aluseline fosfataas (*intestinal alkaline phosphatase*)

CBCC- krüptipõhja sammasrakud (*crypt-base columnar cells*)

CSC- kasvaja tüvirakud (*cancer stem cells*)

ES rakud- embrüonaalsed tüvirakud

FACS- fluorestsents-aktiveeritud rakkude sorteerimine, *fluorescences-activated cell sorting*

FBS- veise loote seerum, *fetal bovine serum*

HAT- histooni atsetüültransferaas (*histone acetyltransferase*)

HDAC- histooni deatsetülaas (*histone deacetylase*)

hES rakud- inimese embrüonaalsed tüvirakud

IF- immunofluorestsents

NaB- naatriumbutüraat

NANOG- *NANOG homeobox*

OCT4- *POU class 5 homeobox 1*

PA- paraformaldehüüd

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

RIPA- radioaktiivse immunopretsipitatsiooni meetodiga kasutatav puhver

-RT- revertaasi töötluseta

SCFA- lühikese ahelaga rasvhape (*short-chain fatty acid*)

SOX2- *SRY-box 2*

SSEA-1- *stage-specific embryonic antigen-1*

SSEA-3- *stage-specific embryonic antigen-3*

SSEA-4- *stage-specific embryonic antigen-4*

SISSEJUHATUS

Arenenud riikides on südame- ja veresoonkonna haiguste järel levinuimaks surmapõhjuseks vähkkasvaja (Heron 2016). Pahaloomulistes kasvajatessse haigestumine on tõusnud ning tõenäoliselt kasvab see veelgi. Vähiteke on seotud erinevate faktoritega keskkonnas leiduvad kantserogeensed ühendid, elanikkonna vananemine, inimeste ebatervislikud eluviisid aga ka geneetilised faktorid (Antonarakis and Krawczak 2002; Stewart and Wild 2014). Jämesoolevähk kuulub enim diagnoositavate vähivormide hulka, samuti on see kõikidest surmajuhtumitest kopsuvähi järel teisel kohal (Ferlay et al. 2013; Yoruker et al. 2016).

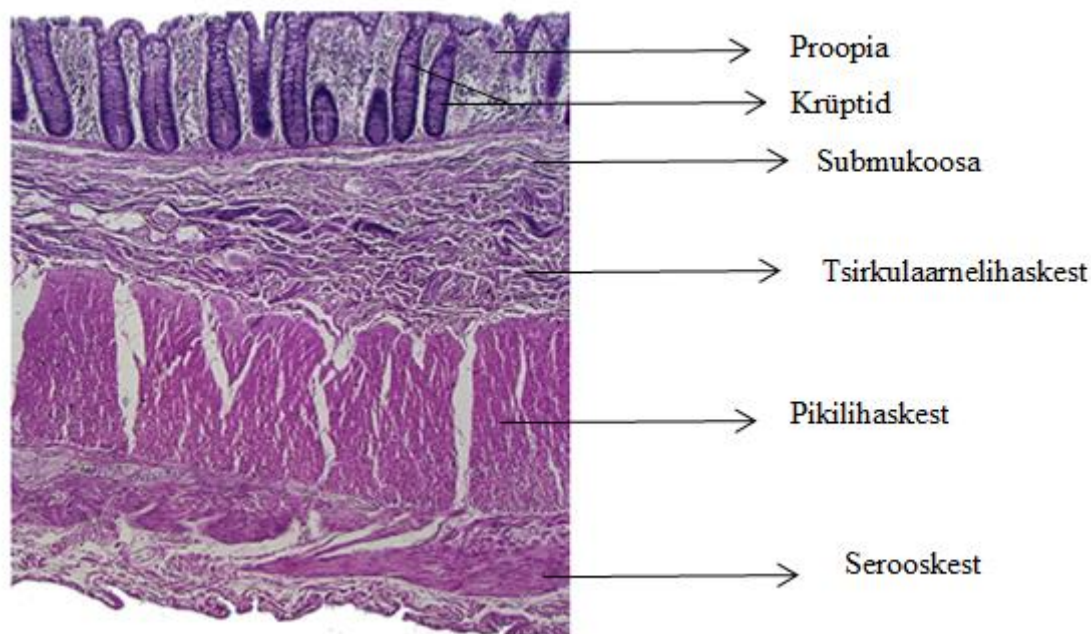
Vähiravis on üheks peamiseks probleemiks kasvajate metastaseerumine, just sellised kasvajad on peamiseks surmapõhjuseks. Nii kaugemale arenenud vähk ei allu ravile ning tihti tekib resistentsus keemiravi suhtes (Guan 2015). Üha enam on hakatud aru saama, et vähkkasvaja on heterogeenne rakkude kogum, kus muu hulgas eksisteerib väike kogus tüvirakuliste omadustega vähirakke, mis suudavad paljunedes taasluua kogu vähkkasvaja. Selliseid rakke on iseloomustatud ka jämesoolevähis ja just need rakud arvatakse olevat peamisteks metastaseeruvateks vähirakkudeks. Metastaseerunud kasvajates on omakorda leitud kasvajatüvirakke, mis ei allu keemiaravile (Dean et al. 2005; Vinogradov and Wei 2012). Sellest tulenevalt on oluline leida uusi ravi- ja diagnoosimeetodeid, mis oleksid suunatud just vähitüvirakkude kahjutustamisele ja nende varajasele avastamisele.

Antud töös iseloomustatakse peamisi pluripotentsusega seotud markervalke ning kirjeldatakse nende ekspresseerumist jämesoolevähis. Peamiselt keskendutakse kasvajatüvirakkudele, nende esinemisele jämesoolevähis ning nendele omaste markervalkude leidmisele. Käesoleva magistritöö eksperimentaalse osa peamiseks eesmärgiks oli võrrelda pluripotentsusega seotud markervalkude ekspressiooni diferentseerumata ja diferentseerunud jämesoolevähi rakuliinis Caco2.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Jämesoole ehitus

Normaalse jämesoole pind on sile, seal puuduvad soolehatud, mis peensooles on olemas. Jämesoole proopias leidub krüpte, mis ulatuvad limaskestast lihaskihini (Joonis 1.). Epiteelirakkudest on esindatud karik-, ääris-, ääriseta- ja endokriinrakud. Lihaskesta moodustavad sisemine tsirkulaarne ja välimine pikikiht (Arend and Aunapuu 2012).



Joonis 1. Jämesoole sein ehitus. *Normaalse jämesoole sein koosneb limaskestast, submukoos kihist, lihas- ja serooskihist. Erinevalt peensoolest jämesool soolehatte ei sisalda, seal on krüptid.* Modifitseeritud, (Arend and Aunapuu 2012).

1.2 Jämesoolevähi ülevaade

Naistel diagnoositakse enim rinnavähki, millele järgneb jämesoolevähk. Meeste seas on levinuimaks kopsuvähk, millele järgnevad eesnäärme- ja jämesoolevähk (Ferlay et al. 2014; Ghoncheh et al. 2016). Kõikidest jämesoole kasvajatest moodustavad adenokartsinoomid 90% (Munro, S. K. Wickremesekera, et al. 2017), vähem levinud jämesoole kartsinoomide hulka kuuluvad neuroendokriini, lamerakuline, adeno-lamerakuline, käävrakuline ja diferentseerumata kartsinoomid (Fleming et al. 2012).

Jämesoolevähk, mille lokalisatsioon piirdub soole seinaga (I-II staadium), on paremini ravile alluv, kui kasvaja, mis on sellest kaugemale levima hakanud ning moodustanud metastaase. Metastaseerumise käigus läbib kasvaja sooleseina ja levib lümfisoontesse ja –sõlmedesse ning teistesse organitesse. Haigestumine jämesoolevähki tõuseb pärast 50.eluaastaid (Hagggar and Boushey 2009; Siegel et al. 2017). Jämesoolevähi tekkel on olulisteks faktoriteks inimese

elustiil- ülekaalus, vale toitumine, suitsetamine, alkoholi liigtarvitamine, vähene liikumine, aga ka mõningad haigused nagu diabeet, lisaks ka geneetilised tegurid (Hagland and Søreide 2015; Jemal et al. 2011; Kuipers et al. 2015; Stewart and Wild 2014).

1.3 Jämesoolevähi tekkemehhanismid

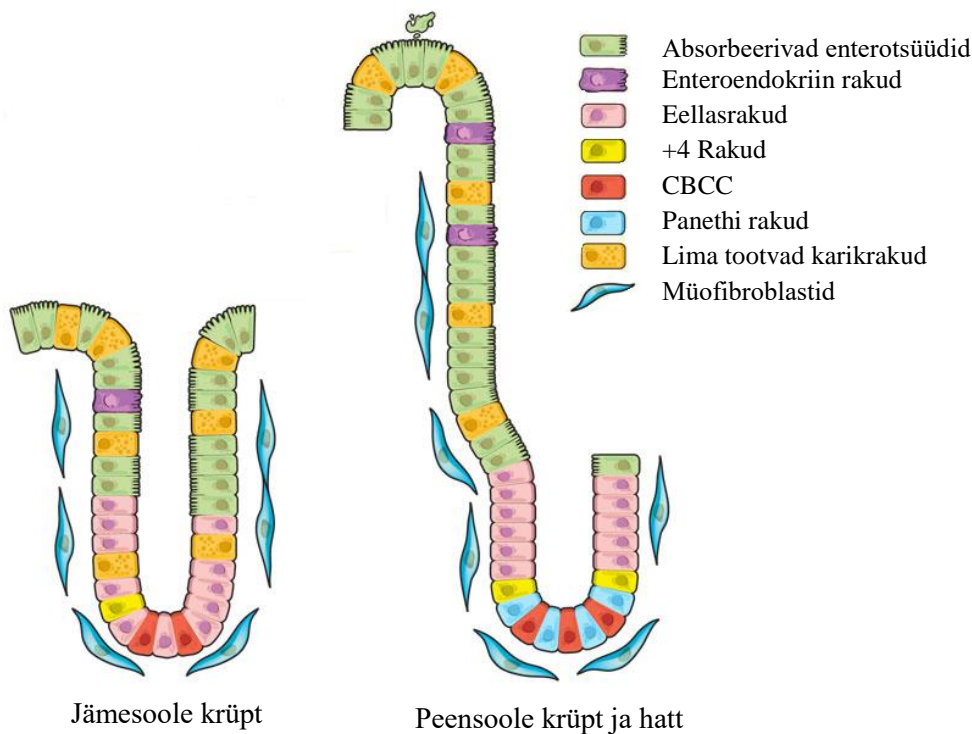
Jämesoolevähk on põhjustatud muteerunud rakkude kontrollimatust kasvust soole eriosades (Cooper 2000). Mutatsioonid rakkudes tekivad genoomi ebastabiilsusest-kromosomaalne, mikrosatelliitne ja DNA metülatatsiooniga seotud ebastabiilsus. Neist kolmest on levinuim genoomi ebastabiilsus, mis põhjustab muutuseid kromosoomide arvus ning struktuuris. Kromosomaalne ebastabiilsus võib viia supressorgeenide, nagu APC (*WNT signaling pathway regulator*), P53 (*tumor protein p53*), SMAD4 (*SMAD family member 4*), mis hoiavad ära maligne fenotüübi teket, kadumiseni (Kinzler and Vogelstein 2002; Yan et al. 2002). Mikrosatelliitse ebastabiilsuse puhul on inaktiveeritud geenid, mis vastutavad valesi paardunud DNA aluste parandamise eest (Chen et al. 1997). Imetajatel on CpG järjestuses levinud pürimidiini viiendas positsioonis oleva tsütosiini metülatatsioon. Vähitikke protsessis on täheldatud metüleerituse vähenemist (Weisenberger et al. 2006).

Tegemist on keemiaravi suhtes tugevalt resistentse vähivormiga (Longley and Johnston 2005), mis annab tihti metastaase (Siegel et al. 2016). Inimestel, kel on krooniline jämesoole põletik (Coussens and Werb 2002; Erdogan et al. 2016), geneetiline eelsoodumus või ebatervislikud eluviisid, on kõrgem risk haigestuda jämesoolevähki (Care 2017). Peamiselt on pahaloomuline kasvaja saanud alguse jämesoole limaskestale moodustunud healoomulistest polüüpidest (Aran et al. 2016). Enamasti healoomulised polüübid maligne ei muutu, kuid mõned võivad kasvada suuremaks ja muutuda siiski halvaloomulisteks. Kui polüüp muutub maligne, võib see kasvada sügavamale jämesoole seina, kust võib liikuda ka teistesse organitesse (Care 2017).

Jämesoolevähk on üks peamiseid kasvajatega seotud haigestumise ja surmajuhtude põhjustajaid (Jemal et al. 2011). Jämesoole vähkkasvajatest eraldatud rakuliinid on oluliselt aidanud mõista selle kasvaja iseärasusi. Neid kasutatakse tihti prekliinilistes eksperimentides, mõistmaks jämesoolevähi molekulaarseid ja rakulisi mehhanisme. Koekultuurid on olulised vahendid avastamiseks uusi vähivastaseid ühendeid, tuvastamiseks tundlikust ravimitele ja nende toksilisust. Teadustöodes on laialdaselt kasutatud ligikaudu 70 jämesoolevähi rakuliini (Mouradov et al. 2014), üks neist on Caco2, mida on kasutatud ka antud magistr töö eksperimentaalses osas. Teiseks laialdaselt levinud jämesoolevähi mudeliks on HT29 rakuliin, mis on samuti jämesoole adenokartsinoom. Antud rakuliini kasutatakse lisaks jämesoolevähi

udelina ka toitainete ja ravimite imendumise tuvastamisel, soolestiku immunvastuse uurimisel bakteriaalse infektsiooni korral, mikroorganismide elulemuse, adhesiooni või invasiooni tuvastamisel. Sarnaselt Caco2 rakkudele, meenutab diferentseerunud HT29 rakkude fenotüüp peensoole enterotsüüte (Martínez-Maqueda et al. 2015). Peamiseks erinevuseks Caco2 ja HT29 rakuliinide vahel seisneb selles, et viimastes on suurenenud mutsiinide ekspressioon (Huet et al. 1987).

Jämesoole ja peensoole krüptides arvatakse olevat kahte tüüpi tüvirakke: aktiivselt paljunevad krüptipõhja sammasrakud (CBCC) (Barker et al. 2007; Cheng and Leblond 1974) ja vaikeoleku tüvirakud (+4 rakud) (van der Flier and Clevers 2009; Mezoff and Shroyer 2015). Aktiivsed epiteliaalsed tüvirakud paiknevad peensoole ja jämesoole krüpti põhjas, kuid peensoole krüpti põhjas on need vaheldumisi Panethi rakkudega (Joonis 2.). Diferentseerumine toimub krüpti põhjast liikudest läbi transitoorselt paljunevate rakkude (*transit-amplifying*)- piirkonna ning tekivad täielikult diferentseerunud rakud (Potten et al. 1997). Peensoole krüpti põhjas paiknevad sellele iseloomulikud Panethi rakud, mis diferentseerumise protsessi läbi ei tee ning osalevad krüpti steriilsena hoidmises (Ouellette et al. 2000). Panethi rakud on üks viiest rakutüübist, milleks peensoole epiteliaalsed tüvirakud võivad diferentseeruda. Teisteks tüüpideks on absorbeerivad enterotsüüdid, hormone sekreteerivad endokriin rakud, lima tootvad karikrakud ja M rakud, mis on seotud antigeenide transpordiga (Wright and Alison 1984).



Joonis 2. Jämesoole krüpti ning peensoole krüpti ja hatu ehitus. *Peensooles leiduvad lisaks krüptidele ka hatud, mis jämesooles puuduvad. Erinevalt jämesoolest, leidub peensooles Panethi rakke. Nii peen- kui jämesools leidub +4 rakke ja CBCC-d.* (Modifitseeritud, Medema & Vermeulen, 2011).

Caco2 rakuliin on eraldatud inimese jämesoolevähist, kuid diferentseerumise käigus omandavad need rakud peensooles leiduvate enterotsüütidele sarnaneva fenotüübi (Meunier et al. 1995). Üheks viisiks eristada diferentseerunud Caco2 rakke, mis sarnanevad enterotsüütidele, ja diferentseerumata rakke, on kasutada markerina üldist aluselist fosfataasi (ALP, *alkaline phosphatase*), mis on ekspresseeritud Caco2 rakkude diferentseerumise alguses, kuid hilisemas, enterotsüütidele omase diferentseerumise käigus langeb (Engle et al. 1998) või vaadelda soolestiku ALP (ALPi, *intestinal alkaline phosphatase*) ekspressiooni, mille ekspressioon diferentseerumise käigus tõuseb (Dzierzewicz et al. 2002; Engle et al. 1998) (Yang et al. 2013).

1.4 Caco2 rakud jämesoolevähi ja peensoole epiteeli mudelina

Caco2 rakuliini puhul on tegemist heterogeensete jämesoolevähi epiteelirakkudega, mis on eraldatud jämesoole adenokartsinoomist. Neid rakke kasutatakse *in vitro* soolestikurakkude uurimiseks ja diferentseerimiseks. Diferentseerunud Caco2 rakke kasutatakse laialdaselt ka tuvastamiseks kandidaatravimite absorptsiooni. Antud rakuliini on võimalik diferentseerida rakkudeks, mille struktuur ja funktsioon sarnanevad peensoole epiteelirakkudega. Lisaks absorptsioonimudelina, kasutatakse neid ka ravimite metabolismi mudelina (van Breemen and Li 2005; Lea 2015; Rao, A.L., Sankar 2009).

Üldiselt peetakse rohkem diferentseerunud vähirakke mitte nii agressiivseks kui vähem diferentseerunud kasvajakarakke (Blenkinsopp et al. 1981; Smith 2010). Arvatakse, et vähirakkude populatsioonis esinevad nõ vähitüvirakud, mis suudavad taastoota kogu vähkkasvaja heterogeense kogumi (Munro, S. K. Wickremesekera, et al. 2017). Mõistes molekulaarseid mehhanisme, mis kontrollivad vähitüvirakkude diferentseerumise protsessi, võimaldaks see välja töötada uusi ning paremaid ravimeid (Clarke and Fuller 2006).

Caco2 rakkude diferentseerimiseks kasutatakse erinevaid viise. Üheks võimaluseks on rakkude spontaanne diferentseerumine, mis toimub rakkude konfulentsuse saavutamisel. Samuti on võimalik diferentseerimiseks kasvatada CaCo2 rakke koekultuuris kasutatavatel membraanidel, mis võivad olla valmistatud polükarbonaadist, polüestrist või polüetüleenist. (Lea 2015) (Ferruzza et al. 2012). Lisaks on võimalik Caco2 rakke diferentseerida kasutades

naatriumbutüraati (NaB). Kasvatades Caco2 rakke 50% konfulentsuseni, vahetades rakuöödet iga kahe päeva järel, saavutati kõrgem rakkude proliferatsiooni potentsiaal. Kui rakkudel lasti kasvada konfulentseks ning toimus diferentseerumine, formeeriti homogeensemaid rakkude kogumeid kui eelnevalt tihedamalt kasvatatud Caco2 kultuuris (Natoli et al. 2012).

1.5 Butüraat kui histoonide deatsetülaaside inhibiitor

Butüraat on lühikese ahelaga rasvhape (SCFA, *short-chain fatty acid*), mida sünteesitakse jämesoole normaalse mikrofloora bakterirakkude poolt toidust saadavatest kiudainetest (Orchel et al. 2005). SCFA-d absorbeerivad tavaliselt kolonotsüüdid ja kasutatakse lokaalselt limaskestast rakkude poolt energia saamiseks (Donohoe et al. 2012; Peng et al. 2007). Butüraat stimuleerib normaalsete jämesoole rakkude proliferatsiooni ning inhibeerib apoptoosi, kuid seevastu vähirakkudes inhibeeritakse proliferatsiooni ja soodustatakse diferentseerumist (Donohoe et al. 2012; Dzierzewicz et al. 2002). Vastus butüraadiga töötlemisele sõltub rakkude diferentseeritusest. Diferentseerumise käigus on täheldatud butüraadi mõju vähenemist, mis tuleneb tõenäoliselt sellest, et diferentseerunud rakud kasutavad butüraadi ära energia tootmiseks (Mariadason et al. 2001).

Butüraadi metaboliseerimise käigus tekib atsetüül-CoA, mis on oluline kofaktor histoonide atsetüültransferaasidele (HAT), mis reguleerivad geeniekspressiooni epigeneetiliselt. Kromosomaalsed ümberkorraldused, mis põhjustavad kõrvalekaldeid HAT töös on näiteks üheks enam levinud leukeemia tekkepõhjuseks. Kasvajarakkudes esinevad tihti kõrvalekaldeid histoonide atsetüleerituses ja teistes epigenoomsetes markerites, mille tulemusena muutub geeniekspressiooni muster ja genoomi stabiilsus. Lisaks sellele, et normaalsetele kolonotsüütidele on butüraat peamine energiaallikas, käitub see ka kui histoonide deatsetülaaside (HDAC) inhibiitor. Arvatakse, et põhjus, miks butüraat inhibeerib vähirakkude kasvu seiseb selles, et tegemist on HDAC inhibiitoriga, mis muudab mitmete geenide ekspressiooni, sealhulgas geenide, mille funktsioon on seotud proliferatsiooni, apoptoosi ja diferentseerumisega. Butüraat soodustab normaalsete kolonotsüütide proliferatsiooni, kuna seda kasutatakse oksüdatiivse energiaallikana. Samal ajal inhibeeritakse vähirakkudes proliferatsiooni, kuna butüraati metaboliseeritakse nendes rakkudes madalal tasemel ja nii käitub butüraat kui epigeneetiline faktor, mis liigub rakutuuma ja inhibeerib HDAC-d (Donohoe et al. 2012).

Histoonide atsetüleerimine ja deatsetüleerimine omab tähtsat rolli transkriptsiooni regulatsioonis (Mai et al. 2005). Histoonide atsetüleerituse taset määravad HDAC-d ja HAT-

d. Atsetüleeritus võimaldab transkriptsiooni aktivatsiooni ning HDAC-d võivad käituda kui transkriptsiooni repressorid (Gui et al. 2004). HDACi mõjutavad transkriptsiooni indutseerides histoonide, transkriptsioonifaktorite ja teiste valkude, mis reguleerivad transkriptsiooni, atsetülatsiooni (Glozak et al. 2005; Marks and Dokmanovic 2005).

HDACi toimivaid aineid on mitmeid, neist osa kasutatakse ka kliinilistes uuringutes (Marks and Dokmanovic 2005; Rosato and Grant 2004). Üheks kliinilistes uuringutes kasutuses olevaks HDACi-ks on vorinostat, mida kasutatakse vähiravis, peamiselt T-rakulise lümfoomi puhul (Duvic and Zhang 2006). Lisaks on kasutatud ka butüraati erinevate haigustega seotud kliinilistes uuringutes (Canani et al. 2011; Cushing et al. 2015). Näiteks on kasutatud arginiinbutüraati leukeemia esimese faasi kliinilises uuringus (Perrine et al. 2007).

1.6 Kasvajätüvirakud ja normaalsed tüvirakud

Tüvirakud on rakud, millel on potentsiaal piiramatult või pikaajakselt end taas toota, samuti annavad alguse vähemalt ühele diferentseerunud rakule (Weissman 2000). Pluripotentsed tüvirakud tuvastati esmalt embrüonaalse kartsinoomi rakkudes teratokartsinoomis, mis sisaldab lisaks vähirakkudele ka mitmeid somaatilisi rakke (Damjanov and Solter 1974; Friedman and Moore 1946; Stevens 1967a, 1967b). Arvatakse, et täiskasvanu tüvirakke ehk somaatilisi tüvirakke leidub vähe. Tegemist on rakkudega, mis on vaikeolekus ning millel on piiratud enda taastootmise ja diferentseerumise võime. Need rakud vastutavad kindlas organis surnud rakkude asendamise eest (Chagastelles and Nardi 2011). Esinevad erinevad somaatiliste tüvirakkude tüübid. Paremini on iseloomustatud hematopoeetilisi, epiteliaalseid, lihase ja neuraalseid somaatilisi tüvirakke (Alison and Islam 2009). Embrüonaalsete tüvirakkude (ES rakud) roll embrüonaalses arengus avastati esmalt hiires (Brinster 1974). ES rakud on pluripotentsed, võimelised diferentseeruma erinevateks rakutüüpideks ja säilitama sobilikes koekultuuri tingimustes diferentseerumata profiili pika aja jooksul (Chagastelles and Nardi 2011; Evans and Kaufman 1981) ES rakke on võimalik saada blastotsüsti rakusisesest massist (ICM) (Evans and Kaufman 1981; Martin 1981). Peamised ES rakkude pluripotentsuse regulaatorid on OCT4, SOX2 ja NANOG (Boyer et al. 2005).

ES ja vähirakkude ühiste omaduste hulka kuuluvad kiire proliferatsioon, sarnane metabolism ja vähene diferentseerituse aste (Solter and Solter 2006). On leitud, et vähkkasvajad sisaldavad rakke, millel on enda taastootmise ja osaliselt diferentseerumise võimekus. Sellistel rakkudel on sarnased omadused täiskasvanu tüvirakkudele, millest need

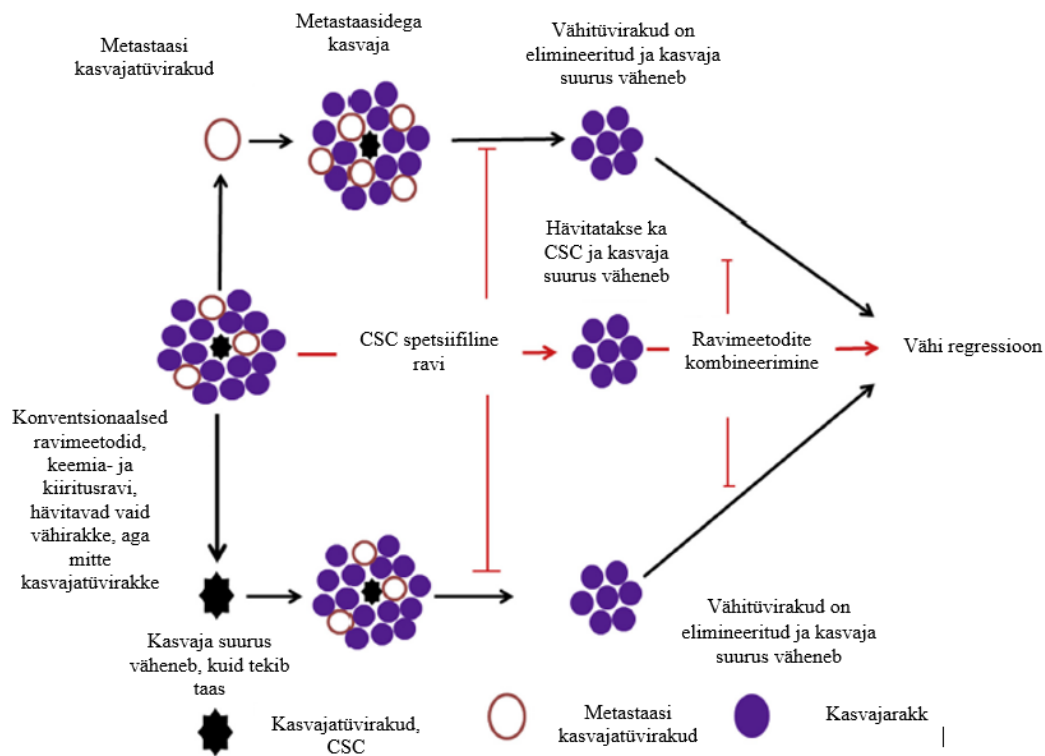
tõenäoliselt ka tekkinud on. Selliseid rakke nimetatakse kasvaja tüvirakkudeks (CSC) (Kreso and Dick 2014; Lobo et al. 2007; O'Connor et al. 2014).

Kasvajatüvirakke (CSC) peetakse vähi initsieerivateks rakkudeks ning arvatakse, et need vastutavad kasvajate moodustumise, resistentsuse, invasiivse kasvu, metastaseerumise ja vähi taastekke eest (L Ricci-Vitiani et al. 2009; Taniguchi et al. 2016; Wahab et al. 2017). Sarnaselt normaalsetele tüvirakkudele, on CSC-l eneseuuenemise ja heterogeensete rakupopulatsioonide tekitamise võime (Guo et al. 2006). Need rakud jagunevad asümmeetriliselt, andes diferentseerunud kasvajaraku ja identse tütaraku, neil on ebanormaalne kasv ja aeglane rakutsükli kulg, mis muudab need resistentseks ravimeetoditele, mille sihtmärgiks on kiiresti paljunevad rakud (Kreso and Dick 2014; L Ricci-Vitiani et al. 2009).

Arvatakse, et vähi kasvu juhivad CSC, millel võivad olla osaliselt ka ES rakkude omadused (Kreso and Dick 2014) (Zheng et al. 2013) (Shimokawa et al. 2017). CSC-l puudub kontroll replikatsiooni ja diferentseerumise üle, mis viib vähi tekkeni (Humphries and Wright 2008; Lucia Ricci-Vitiani et al. 2009).

CSC tekkimise viiside kohta on mitmeid hüpoteese- need võivad pärineda normaalsetest tüvirakkudest või eellasrakkudest või hoopiski toimub dediferentseerumine somaatilistest rakkudest (Guo et al. 2006; Kreso and Dick 2014; Munro et al. 2017; L Ricci-Vitiani et al. 2009; Taniguchi et al. 2016).

Konventsionaalsed ravimeetodid hävitavad kasvaja küll osaliselt, kuid võivad see läbi muuta haiguse agressiivsemaks (Islam et al. 2015). Peamised kasutusel olevad meetodid hävitavad diferentseerunud vähirakud, kuid mitte kasvajatüvirakke (Joonis 3.) (Vermeulen et al. 2012). Muutmaks ravi efektiivsemaks oleks vaja luua kombineeritud ravimeetodeid, mis võtaks sihikule ka CSC (Dragu et al. 2015).



Joonis 3. Kasvaja tüvirakud vähiravi sihtmärgina. *Metastaasi tüvirakud võivad anda siirdeid teistesse organitesse ning moodustada uue kasvaja. Kasutades vähitüvirakkude spetsiifilist ravi, võimaldaks see hävitada ka sellised rakupopulatsioonid. Teiste kasvajarakkude likvideerimises võib osaleda immuunsüsteem või kasutatakse keemia- või kiiritusravi. Tavameetodid ei hävita kõiki vähitüvirakke, kuna neil on resistentsus mehhanismid, mis on seotud nende vaikeoleku staadiumiga. Kasvajatüvirakkude spetsiifiline ravi ja konventsionaalsed teraapiad kombineerituna võiksid hävitada täielikult kogu kasvaja.* (Modifitseeritud, Wahab et al., 2017).

Praegusel hetkel diagnoositakse ja klassifitseeritakse kasvajaid peamiselt tuginedes kogu kasvaja patoloogilisele iseloomustusele. Kasvajad võivad histoloogiliselt olla sarnased, kuid nende CSC võivad pärineda erinevatest tüvirakkude või eellasrakkude populatsioonidest. Erinevused CSC tasandil on väga olulised diagnoosimise ja ravi seisukohalt (Castor et al. 2005; Taylor et al. 2005).

On leitud, et mõningad normaalsete tüvirakkude markerid oleksid sobilikud ka vähitüvirakkude identifitseerimiseks (Wahab et al. 2017). Üheks mitmetes töodes kasutatud markeriks on CD133 (Schmohl and Vallera 2016; Wu and Wu 2009; Yu et al. 2011). Vähhkasvajast eraldatud CD133⁺ rakud on võimelised formeerima hiire kasvaja, säilitades diferentseerumata profiili ja muutudes agressiivsemaks (Ricci-Vitiani et al. 2007). Lisaks CD133 on uuritud ka teisi tüviraku markereid, nagu OCT4, NANOG ja SOX2. Tegemist on geenidega, mis omavad dominantset rolli pluripotentsuse reguleerimises (Hadjimichael et al. 2015; Takahashi and Yamanaka 2006).

1.7 Pluripotentsid tüvirakke iseloomustavad markerid

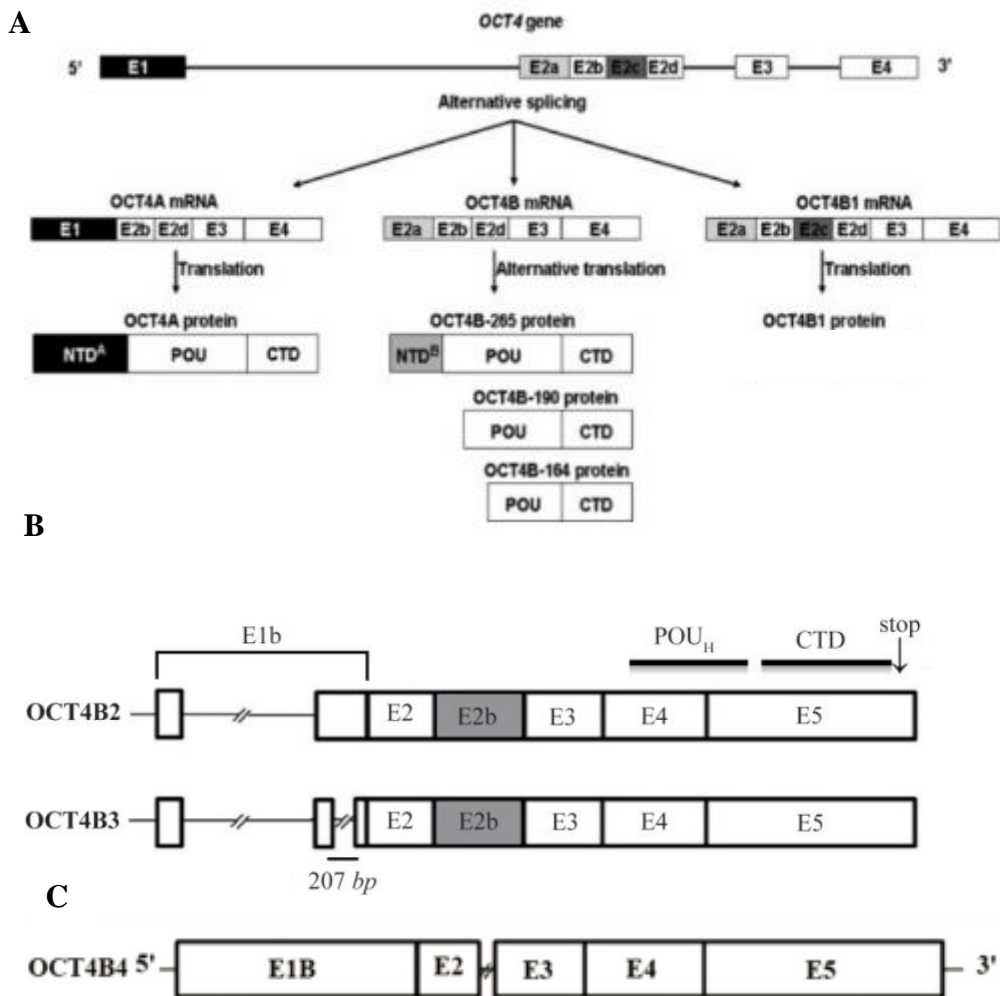
OCT4, *SOX2* ja *NANOG* on kolm geeni, millel on oluline roll pluripotentsuse reguleerimises embrüonaalsetes tüvirakkudes (Hadjimichael et al. 2015; Takahashi and Yamanaka 2006). Tegemist on transkriptsioonifaktoritega, mis teostavad enda ekspressiooni autoregulatsiooni seostudes muu hulgas ka iseenda promootor aladele (Boyer et al. 2005).

1.7.1 OCT4

POU5F1 (*OCT4*, *POU class 5 homeobox 1*) kuulub *POU* geenide perekonda. On teada *OCT4* oluline roll embrüonaalsete tüvirakkude (ES) ja embrüonaalse kartsinoomirakkude eneseuuenemises ja pluripotentsuse võrgustikes, samuti on tegemist olulise faktoriga varases arengus (Campbell et al. 2007; Martin et al. 2004; Schöler et al. 1990). *OCT4/Oct4* ekspressiooni mahasurumisel nii inimese kui hiire ES rakkudes väheneb nende pluripotentsus ning hakkab toimuma diferentseerumine (Martin et al. 2004; Nichols et al. 1998). Inimese *OCT4* geen paikneb kromosoomil 6p21.3 (Guillaudeux et al. 1993; Krishnan et al. 1995). Praeguseks on teada mitmeid erinevaid *OCT4* transkripte- *OCT4A*, *OCT4B* (Takeda, Seino, and Bell 1992) ja *OCT4B1* (Atlasi et al. 2008; Wang and Dai 2010), *OCT4B2* (Poursani et al. 2017), *OCT4B3* (Poursani et al. 2017), *OCT4B4* (E.M. Poursani et al. 2017), milledest on võimalik saada omakorda mitmeid valgusovorme, kuid kõikide puhul pole valgu olemasolu veel tõestatud.

Praegu on tõestatud vähemalt viie erineva valgu isovormi olemasolu: *OCT4A*, *OCT4B-265*, *OCT4-190*, *OCT4B-164* ja *OCT4B1* (Atlasi et al. 2008; Lee et al. 2006; Wang and Dai 2010). Varasemad tööd on näidanud, et *OCT4A* isovorm esineb ES rakkudes ja embrüonaalse kartsinoomi rakkudes (Hay et al. 2004; Martin et al. 2004; Zaehres et al. 2005) ning *OCT4B* isovormid on detekteeritud mitte-pluripotentsetes rakkudes (Atlasi et al. 2008). *OCT4A* seostatakse pluripotentsuse säilitamisega (Nichols et al. 1998; Niwa et al. 2000) ning *OCT4B* peetakse rakustressile vastajaks (Cauffman et al. 2006, 2005; Lee et al. 2006). Lisaks on leitud *OCT4B1* vorm, mida on tuvastatud peamiselt inimese ES rakkudes, mille ekspressioon diferentseerumise käigus väheneb (Atlasi et al. 2008). *OCT4A* ja *OCT4B* isovormil on identne *POU* DNA-ga seostuv ja C-terminaalne transaktivatsiooni domään, kuid erinevused on N-terminuses. *OCT4A* transkript koosneb eksonitest 1, 2b, 2d, 3 ja 4. *OCT4B* transkript on lühenenud, sel puudub ekson 1 ja lisaks on ekson 2a. *OCT4B1* on väga sarnane *OCT4B*-le, kuid sel on lisaks ekson 2c (Joonis 4.) (Atlasi et al. 2008; Wang and Dai 2010).

OCT4A valk on lokaliseeritud rakutuumas ja käitub seal kui transkriptsioonifaktor, kuid on näidatud, et *OCT4B* paikneb peamiselt hoopis tsütoplasmas (Cauffman et al. 2006).

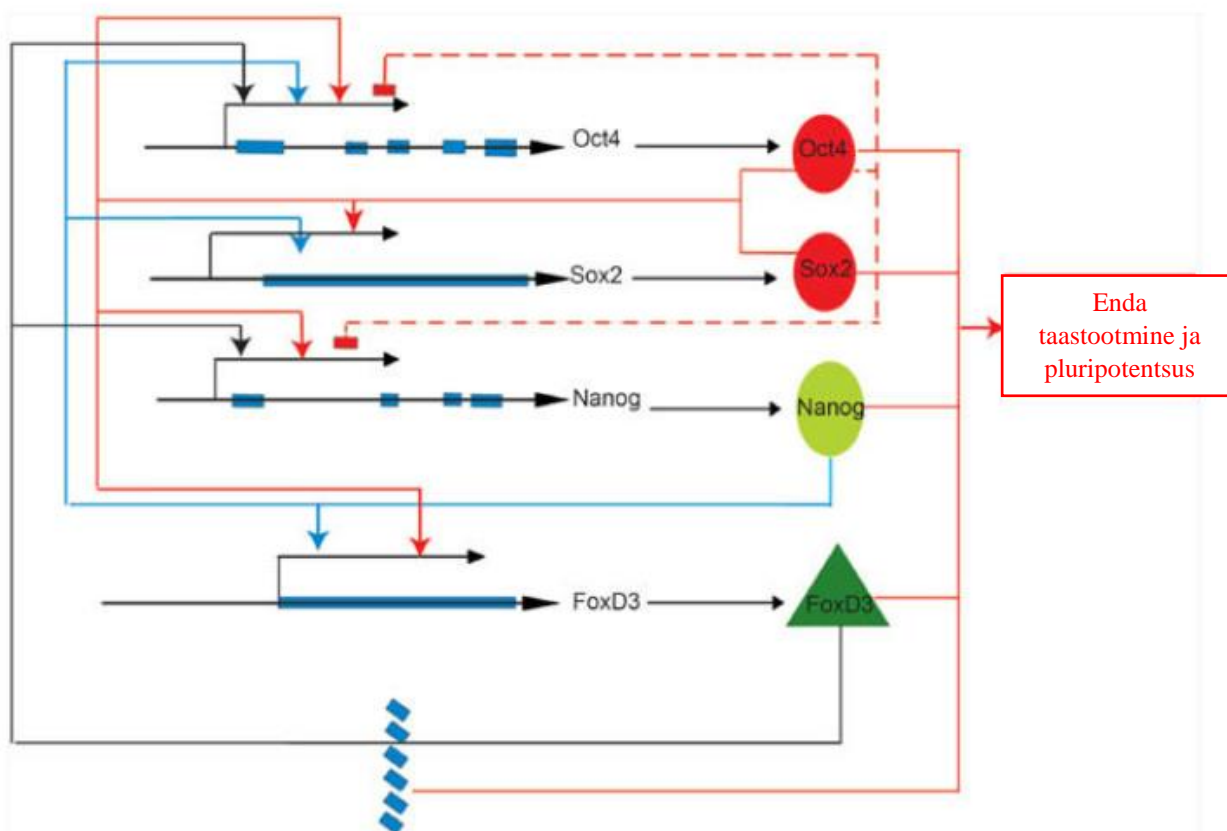


Joonis 4. Inimese OCT4 geeni transkriptid ja valguisovormid. A. Valgete kastidena on kujutatud regioonid, mis on omased kõikidele transkriptidele või valgu isovormidele. Tumedates kastides on kujutatud spetsiifilised piirkonnad (Modifitseeritud; Asadi et al., 2011; X. Wang & Dai, 2010) B. OCT4B2 ja OCT4B3 eksonite skeemid (Ensieh M. Poursani, Mehravar, Mohammad Soltani, et al. 2017). C. OCT4B4 eksoni skeem (E.M. Poursani et al. 2017).

Kuigi OCT4 puhul on tegemist olulise tüvirakuspetsiifilise markeriga, on selle ekspressiooni tuvastatud ka mitmetes somaatilistes rakkudes, vähi rakuliinides ning primaarsetes kasvajat. Arvatakse, et vähemalt osades somaatilistes rakkudes on OCT4 ekspresseerivad rakud täiskasvanu tüvirakud ning vähis markeerib OCT4 eelkõige kasvaja tüvirakke (Lengner et al. 2007; Tai et al. 2005).

On leitud, et OCT4 ekspressioon soodustab vähi taasteket ning viitab halvale prognoosile (Gazouli et al. 2012). OCT4 ekspressiooni jämesoolevähis on tuvastatud rakkudes, mis läbivad epiteliaal-mesenhümaal transitsiooni mis on võtmesündmuseks vähi progresseerumisel ja metastaseerumisel (Dai et al. 2013). OCT4 ekspressiooni uurimisel jämesoolevähis on tuvastatud OCT4B ja OCT4B1, kuid mitte OCT4A. Samuti on leitud, et vähi progresseerumisel OCT4 ekspressioon kasvab (Gazouli et al. 2012).

Lisaks OCT4-le esineb veel teisigi transkriptsioonifaktoreid, NANOG ja SOX2, mis koos toimides on pluripotentsuse säilitajaks (Hadjimichael et al. 2015; Takahashi and Yamanaka 2006). On teada, et OCT4 reguleerib kompleksis SOX2-ga NANOG ekspressiooni (Hadjimichael et al. 2015; Pan and Thomson 2007). See viitab sellele, et peamised pluripotentsusega seotud faktorid töötavad alati pigem koos kui iseseisvalt, kontrollimaks nii sihtmärk geenide kui ka üksteise ekspressiooni (Joonis 5.) (Pan and Thomson 2007).



Joonis 5. Peamiste pluripotentsust säilitavate transkriptsioonifaktorite reguloorne võrgustik. Regulaatorid nagu OCT4, NANOG, SOX2 ja FoxD3 seostuvad üksteise promootorigega ja reguleerivad üksteise ekspressiooni. Moodustub autoreguloorne võrgustik säilitamaks embrüonaalsete tüvirakkude pluripotentsus ja enda taastootmise võime. Nooled näitavad positiivset regulatsiooni ning katkendlikud nooled, mis on seotud OCT4-ga tähistavad negatiivset regulatsiooni (Modifitseeritud; Pan and Thomson 2007).

1.7.2 NANOG

Nagu OCT4, mõjutab ka NANOG pluripotentsust läbi transkriptsioonilise kontrolli. Tegemist on küll pluripotentsuse saavutamisel olulise faktoriga, kuid arvatakse, et NANOG ei ole otseselt vajalik pluripotentsuse säilitamiseks (Hadjimichael et al. 2015; Takahashi and Yamanaka 2006). NANOG ekspressiooni regulatsioonis osalevad OCT4 ja SOX2 ning need

kolm transkriptsioonifaktorit koos kontrollivad pluripotentsusega seotud geenide ekspressiooni (Hadjimichael et al. 2015; Pan and Thomson 2007; Wang et al. 2006).

Hiire omab Nanog tähtsat rolli pluripotentse ICM (rakusisene mass, *inner cell mass*) rakustaatuse regulatsioonil embrüonaalse arengu käigus, säilitab epiblasti pluripotentsust ja hoiab ära diferentseerumist primitiivseks endodermiks. Hiire arengu käigus on Nanog ekspressiooni võimalik esmalt detekteerida moorula sisemistes rakkudes, see järel piirneb ekspressioon ICM-ga ja kaob trofoektodermis blastotsüsti staadiumis. Hilisemas blastotsüsti staadiumis piirdub Nanog ekspressioon epiplastiga, lisaks ka primitiivse endodermiga. Pärast implantatsiooni reguleeritakse Nanog ekspressioon maha, kuid seda võib siiski detekteerida genitaalvalli idurakkudes E11.5 embrüos (Chambers et al. 2003).

NANOG on ekspresseeritud ES rakkudes, tuletatud ES rakkudes ja arenevates idurakkudes (Silva et al. 2009).

Nanog valgul eristatakse N-terminaalset domääni, homeodomääni ja C-terminaalseid domääne. On näidatud, et vaid C-terminaalsed domäänid omavad transkriptsioonilist aktiivsust (Oh et al. 2005).

NANOG-1 esineb kümme protsessitud pseudogeeni: *NANOGP2* kuni *NANOGP11* ning *NANOGP1* on tandem duplikaat (Booth and Holland 2004). *NANOGP8* ekspressioon on tuvastatud mitmetes vähitüüpides nagu rinnavähk (Zhang et al. 2006) ja eesnäärmevähk (Jeter et al. 2009, 2011), aga ka jämesoolevähk (Ishiguro et al. 2012; Jeter et al. 2009; Meng et al. 2010).

Kõrge NANOG ekspressioon on munasarja-, jämesoole- ja rinnavähis seotud halva prognoosiga (Lee et al. 2012; Meng et al. 2010; Nagata et al. 2014). On näidatud, et jämesoolevähis moodustavad NANOG ekspresseerivad vähitüvirakud umbes 2% kogu vähirakkude hulgast (Ibrahim et al. 2012). Valgutasemel on näidatud kolme isovormi ekspressiooni NANOG, NANOG2 ja NANOGP8 (Ambady et al. 2011; Eberle et al. 2010).

1.7.3 SOX2

SOX2 kuulub *SOX (SRY-Related HMG box)* geenide perekonda (Bani-Yaghoub et al. 2006). *SOX2* on pluripotentsusega seotud transkriptsiooni faktor, mis on oluline embrüogeneesis (Yuan et al. 1995) ja hilisemas arengus, kuid *SOX2* ekspressioon võib olla ka seotud vähkkasvajate tekkega (Wuebben and Rizzino 2017). Viimasel kümnendil on näidatud, et *SOX2* ekspresseeritakse vähemalt 25 erinevas kasvajas, kus see põhjustab kasvaja kasvu, ravimresistentsust ja metastaase (Wuebben and Rizzino 2017). Hiire embrüonaalse arengu puhul on näidatud, et *Sox2* ekspressiooni blokeerimine põhjustab hiire embrüote hukkumist, hiire embrüonaalsetes tüvirakkudes on aga häiritud enese-uuendamine ja *Sox2*

ekspressiooni puudumisel indutseeritakse diferentseerumist (Avilion et al. 2003; Chew et al. 2005).

SOX2 ekspressiooni on näidatud nii RNA kui valgu tasemel paljudes vähkkasvajates, kusjuures ekspressioon suureneb vähi progresseerumisel (Alonso et al. 2011). Kuid mõningate vähitüüpide puhul on täheldatud mõningates töödes vastupidist efekti, näiteks maovähi- ja lamerakulises kopsuvähi puhul on täheldatud, et haiguse progresseerumisel SOX2 ekspressioon langeb (Chen et al. 2016; Lu et al. 2010; Wilbertz et al. 2011; Zhang et al. 2010). Lisaks kasvajatele ekspresseeritakse SOX2 ka kasvaja tüvirakkudes (Wuebben and Rizzino 2017).

Võrreldes normaalset jämesoolt, düsplastilisi polüüpe ning adenokartsinoome, on näidatud korrelatsiooni SOX2 ekspressiooni ja jämesoomevähi vahel (Talebi, Kianersi, and Beiraghdar 2015). SOX2 ekspressiooni tase korreleerub vähirakkude metastaseerumise ja lümfisõlmedesse infiltreerumisega (Neumann et al. 2011). Samal ajal on teada, et SOX2 reguleerib OCT4 ekspressiooni ning pluripotentsuse saavutamisel on oluline nende transkriptsioonifaktorite koos toimimine (Avery et al. 2006; Hadjimichael et al. 2015).

Sox2 ekspresseeritakse nii ICM-s kui trofoektodermis, kuid on hiljem on vaid ICM-s (Avilion et al. 2003; Lorthongpanich et al. 2008). Sügoodis päädib Sox2 deletsioon varase embrüo hukkumisega, kuna ei suudeta moodustada pluripotentset epiblasti (Avilion et al. 2003).

Sox2 efekt ES rakkudes ense-uenemisele ja diferentseerumisele on ekspressiooni tasemest sõltuv (Kopp et al. 2008), viidates asjaolule, et eksisteerivad veel teised faktorid, mis pluripotentsuse regulatsioonis osalevad. Nendeks peamisteks lisafaktoriteks arvatakse olevat Oct4 ja Nanog.

Sox2 geeni mutatsioone on tuvastatud erinevates arenguhäiretes ja vähis. On leitud, et SOX2 käitub kui onkogeen mõnedes epiteeliaalsetes kasvajates. Näiteks on SOX2 lookus amplifitseeritud inimese lamerakulises kopsu kartsinoomis, söögitorus ja väikeserakulises kopsukasvajas (Bass et al. 2009; Rudin et al. 2012). SOX2 üleekspressioon hiire kopsudes põhjustab rakkude hüperproliferaatsiooni (Tompkins et al. 2009) ja mõnel juhul otseselt adenokartsinoomide teket (Lu et al. 2010), kuigi inimese kopsu adenokartsinoomides pole seda täheldatud. SOX2 knock-down inimese rakuliinides, mis pärinevad lamerakulisest kartsinoomist ja väikerakulisest kopsuvähist, on rakkude kasvukiirus vähenenud (Bass et al. 2009).

1.7.4 SSEA-1, SSEA-3 ja SSEA-4

Pluripotentsete tüvirakkude iseloomustamiseks ja markeerimiseks on kasutatud lisaks transkriptsioonifaktoritele ka spetsiifilisi raku pinnal asuvaid markervalke: SSEA-1 (*stage-specific embryonic antigen-1*), SSEA-3 ja SSEA-4 (Fenderson et al. 2006). SSEA-1 ekspresseeritakse hiire ES rakkude ja embrüonaalse kartsinoomi rakkude pinnal, kuid inimese ES rakkudel ekspressioon puudub (Solter and Knowles 1978). Diferentseerumata inimese ES rakkudes ekspresseeritakse SSEA-3/-4, kuid diferentseerumise käigus nende ekspressioon väheneb ning indutseeritakse SSEA-1 ekspressiooni (Henderson et al. 2002; R. Kannagi et al. 1983; Shevinsky et al. 1982).

SSEA-3 ja SSEA-4 on struktuurilt sarnased- neil on sama glükolipiid, kuid SSEA-4 on lisaks terminaalne siaalhappe motiiv (R Kannagi et al. 1983). SSEA-de ekspressiooni on tuvastatud nii hiire (Evans and Kaufman 1981; Solter and Knowles 1978; Takahashi and Yamanaka 2006) kui inimese (Takahashi et al. 2007; Thomson 1998) pluripotentsete tüvirakkude pinnal, varase embrüo rakusiseses massis (ICM), embrüonaalsetes tüvirakkudes ja indutseeritud pluripotentsetes (iPS) tüvirakkudes (Suzuki et al. 2013).

SSEA-1 ekspressiooni on näidatud inimese glioblastoomis (Son et al. 2009), kus see on seotud halva prognoosiga (Kannagi 1997). Munasarjavähis on näidatud, et langenud SSEA-4 ekspressioon viitab halvale prognoosile (Ye et al. 2010). SSEA-3 ekspressiooni erinevates vähitüüpides on uuritud vähe, kuid on leitud, et 77,5% rinnavähi kliinilisest materjalist on SSEA-3 positiivne (Chang et al. 2008).

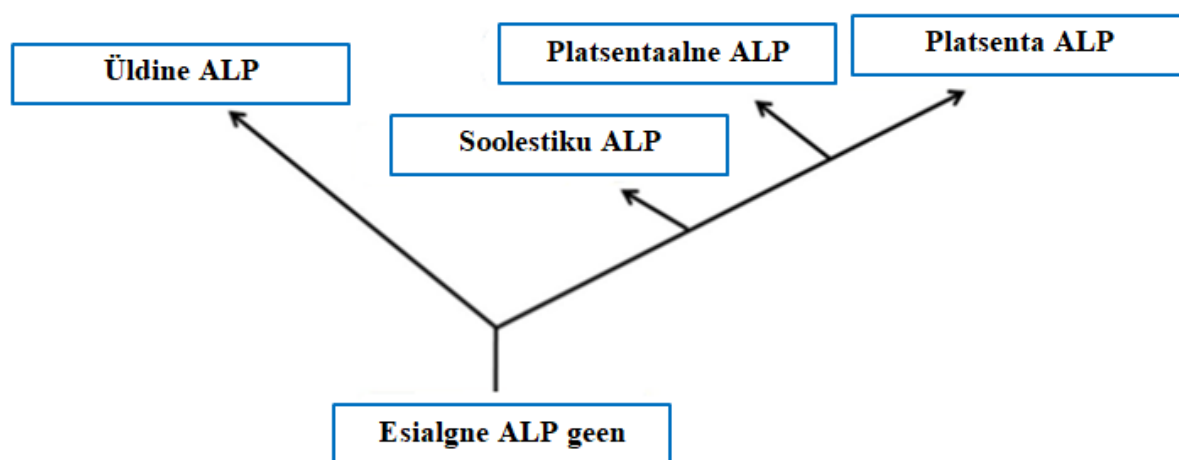
Inimese jämesoole epiteelirakkudes on samuti tuvastatud SSEA-3 ekspressioon (Chang et al. 2008), viidates sellele, et jämesoolevähi kude sisaldab samuti SSEA-3 ekspresseerivaid rakke. Tõenäoliselt on sellisteks rakkudeks jämesoolevähis leiduvad kasvajatüvirakud (Suzuki et al. 2013). SSEA-4 ekspressiooni on näidatud ka jämesoolevähi rakuliinides (Lou et al. 2014).

1.7.5 Aluseline fosfataas

Aluseline fosfataas (ALP) on väga laialdaselt ekspresseeritud membraanseotud glükoproteiin (McComb et al. 1979; Tsai et al. 2000), mis katalüüsib fosfaatmonoestrite hüdrolyüsi (Weiss et al. 1986). ALP on jagatud neljaks isosüümiks (Joonis 6), sõltuvalt sellest, millises koes seda ekspresseeritakse. Isovormideks on soolestiku ALP (ALPi), platsenta ALP, idurakkude ALP ja üldine või maksa/luu/neeru ALP (Sligbrand 1984).

Platsentaalne isovorm on termostabiilne ensüüm, mida leidub kõrgetes kontsentratsioonides platsentas, kuid vähesel määral ka vereseerumis (Vergote et al. 1992). Platsenta vormi võivad re-ekspresseerida ka vähirakud (Fishman et al. 1968). Idurakkude ALP isovorm on samuti

termostabiilne ning seda leidub vähestes kogustes idurakkudes (Tsai et al. 2000), embrüonaalsetes ja mõnedes kasvaja kudedes (Hofmann et al. 1989; Millán and Manes 1988). Üldist ALP-i ekspresseeritakse erinevates kudedes, enim maksa-, skeleti- ja neerukoos, aga leidub mõningal määral ka näiteks soolestikus (Harris 1986). *ALPi* paikneb inimese 2. kromosoomi pikal õlal. Antud isovormi leidub rohkesti soolestikus (Komoda and Sakagishi 1978), kusjuures on teada erinevused loote ja täiskasvanu ALPi vormide vahel. Kuna erinevused esinevad, siis arvatakse, et arengu käigus võidakse erinevatel ajahetkedel ekspresseerida erinevaid ALPi vorme. Embrüonaalse ALPi geeni võidakse re-ekspresseerida ka vähirakkudes (Higashino et al. 1990).



Joonis 6. Aluselise fosfataasi põhilised isovormid. *Inimesel esineb neli olulisemat aluselise fosfataasi (ALP) isovormi, milleks on platsenta ALP, platsentalaadne või idutee rakkude ALP, soolestiku ALP ja maksa-luu-neeru ehk üldine ALP.* (Modifitseeritud; Sharma, Pal, and Prasad 2014).

Maksa ja luu ALP aktiivsust analüüsitakse rutiinselt vereanalüüside käigus (Epstein et al. 1986) ning suurenenud aktiivsus võib viidata luu, maksa ja teiste haiguste olemasolule, sapijuhade ummistusele, vitamiin D puudusele, kahjustunud maksarakkudele jm (Rodan and Rodan 1984). Platsenta ALP hulk suureneb näiteks idurakkude kasvajate korral testises (Lange et al. 1982). Vähenenud ALP tase on seotud näiteks erinevate aneemia vormidega, akondroplaasia, kreatinismi, müoloogeenise leukeemiaga (Schiele et al. 1998).

ALP-del on erinevad rollid rakuliste protsesside reguleerimisel- valkude fosforüleerimine, raku kasv, apoptoos ja rakkude migratsioon embrüonaalse arengu käigus (Tsai et al. 2000). ALP-de ekspressiooni on seostatud ka erinevate vähkkasvajatega. Näiteks on rinnavähis üleekspresseeritud platsenta-laadne ALP isovorm, samuti on see markeriks munasarja, testise, kopsu ja seedetrakti kasvajate diagnoosimisel (Le Du and Millan 2002).

Kõrgenenud üldise ALP isovormi tase esineb osteosarkoomis ja osteoblastiliste luu metastaasides (Le Du and Millan 2002). Tõusnud ALPi taset on täheldatud maksa

kartsinoomi korral (Usono et al. 2010). Kuna kasvajates on toimunud ALP geenide ekspressiooni muutused, siis arvatakse, et ALP erinevad isovormid osalevad vähitekke protsessis (Sadeghirizi and Yazdanparast 2007).

Nii inimese kui hiire pluripotentses ES rakkudes kasutatakse ALP-i markerina. Kõrge ALP ekspressioon on seotud enamiku pluripotentsete tüvirakkudega- embrüonaalsete vähi- ja idurakkudega ning indutseeritud pluripotentses tüvirakkudes. ICM-s on ALP kõrgel tasemel ekspresseeritud, kuid blastotsüsti staadiumis trofoblasti rakkudes mitte (Brons et al. 2007; Tesar et al. 2007) . Diferentseerumise käigus reguleeritakse pluripotentses tüvirakkudes ALP ekspressioon alla (Williams et al. 1988).

ALPi-1 on tähtis roll soolestiku limaskesta kaitsefunktsioonis (Fawley and Gourlay 2016). On näidatud, et peamiselt ekspresseeritakse ALPi-t soolestiku epiteeli rakkudes. ALPi on oluline soolestiku homöostaasi säilitamisel- reguleeritakse bikarbonaatide segregatsiooni ja duodenaalse pinna pH-d, pikkade rasvhapete absorptsiooni, vähendab soolestiku põletikulisi protsesse läbi detoksifikatsiooni (Lallès 2014, 2010).

1.8 Töö eesmärk

Antud töö eesmärgiks oli iseloomustada pluripotentsusmarkerite ekspressiooni jämesoolevähi adenokartsinoomi Caco2 rakuliinis ja vaadelda kuidas ekspressioon muutub butüraadiga indutseeritud diferentseerumise käigus.

2. MATERJAL JA METOODIKA

2.1 Reaktiivid

Trüpsiin (*PAA Labosatories*)

FBS (veise loote seerum, ingl *fetal bovine serum*) (*PAA Labosatories*)

PBS (fosfaat puhverdatud soolalahus, ingl *phosphate buffered saline*) (*PAA Labosatories*).

EMEM (*Eagle's Minimum Essential Medium*) rakusööde (*Corning*)

ECL reagent (*enchanced chemoluminescence*) (*Millipore*).

DAPI (*Sigma Aldrich*)

Naatriumbutüraat (*Sigma Aldrich*)

Tabel 1. Kasutatud antikehad

Antikeha nimetus	Tootja	Kataloogi number	Kolonaalsus	Päritolu	Kasutatud meetod
NANOG_ASB	Aviva Systems Biology	P100591_P050	Polükloonaalne	Küülik	Western Blot (3µl/10ml)
ALPi_NB	NovusBiologicals	NBP2-37387	Monokloonaalne (IgG1)	Hiir	Western Blot (10 µl/10 ml)
ALPi_LSB	LifeSpan Biosciences	LS-C98228	Polükloonaalne	Küülik	IF (1:200)
OCT3/4_BL	BioLegend	653710	Monokloonaalne (IgG2b)	Hiir	IF (1:50) FACS
OCT3/4_SC	Santa Cruz Biotechnology	5279	Monokloonaalne (IgG2b)	Hiir	IF (1:50) Western Blot (6µl/10ml) FACS
NANOG_SC	Santa Cruz Biotechnology	33759	Polükloonaalne	Küülik	IF (1:50) FACS
Aktiin	Santa Cruz Biotechnology	1616	Polükloonaalne	Küülik	Western Blot (3µl/10ml)
SSEA-4	BD BioSciences	560308	Mokokloonaalne (IgG3)	Hiir	IF (1:50) FACS
SSEA-3	eBioscience	53-8833	Monokloonaalne	Hiir	IF (1:50) FACS
HRP_DAG	Santa Cruz Biotechnology	2020		Eesel	Western Blot
HRP_GAR	Santa Cruz	2004		Kits	Western Blot

	Biotechnology				
DAM_488	Invitrogen	A21202		Eesel	IF
GAR_488	Life Technologies	A21441		Kana	IF
Sox2	BD BioScience	561506	Monoklonaalne (IgG1)	Hiir	FACS
NANOG_SC_Gt	Santa Cruz Biotechnology	SC-30331	Polükloonaalne	kits	Western blot, FACS
RNA PolIII (4H8)	NovusBiologicals	NB200-598	Monoklonaalne (IgG1)	Hiir	Western blot

OCT4 praimerite paarid F, G, O_ALL saadi Tag Copenhagen A/S-st.

NANOG praimerite paarid B kuni E (Eberle et al. 2010) saadi *Primetech LLC*-st.

2.2 Kasutatud lahused ja nende koostised

30% akrüülamiid/0,8% bisakrüülamiid: akrüülamiid, N,N'-metüleen-bisakrüülamiid, H₂O.

Laemli proovipuhver: 50 mM Tris-HCl; 10 % SDS; 0,1 % broomfenoolsinine; 10% glütserool; pH 6,8

Kontsentreeriva geeli puhver: 0,5 M Tris-HCl; 0,4 % SDS; pH 6,8

Separeeriva geeli puhver: 1,5 M Tris-HCl, 0,4% SDS; pH 8,8

Western bloti ülekandepuhver: 20 mM Tris; 50mM glütsiin; 20% metanool

Elektroforeesi puhver: 0,125 M Tris; 0,96 M glütsiin, 0,5% SDS; pH 8,3

PERM puhver (*eBioscience*)

RIPA (radioaktiivse immunopretsipitatsiooni meetodiga kasutatav puhver), 10 mM Tris-HCl (pH 7,2), 150 mM NaCl, 0,1% SDS, 1% Triton X-100, 1% naatrium deoksükolaat, 5 mM EDTA ja proteaaside inhibiitorid (*Roche Diagnostics*).

Fraksioneerimise puhver: 20 mM HEPES (pH 7,4), 10 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 M DTT, 25% proteaaside inhibiitorid.

2.3 Uuritav materjal

Antud töö käigus kasutati Caco2 rakuliini, mis on jämesoolevähi mudeliks ning inimese embrüonaalseid tüvirakke H9 (WA09).

2.3.1 Rakkude kultiveerimine

Caco2 rakud saadi American Type Culture Collection-st (ATCC, number: HTB-37), neid kasvatati 37 °C ja 5% CO₂ juures inkubaatoris 3-4 päeva 50-60% konfulentsuseni, mis järel

teostati passeerimine. Rakkude kasvatamisel kasutati madala glükoosi sisaldusega (1 g/l) söödet, mis koosnes EMEM-st, FBS (10% või 20%) seerumist ja antibiootikumidest (penitsilliin 100 U/ml ja streptomütsiin 100 µg/ml). Rakke kasvatati 100 mm tassil ning passeeriti trüpsiiniga (0,05% trüpsiin/0,02% EDTA).

H9 rakkude kasvatamise teostas Annika Trei, neid kasvatati 37 °C ja 5% CO₂ juures inkubaatoris 3-4 päeva, misjärel teostati manuaalne passeerimine rakuklompidena. H9 rakke kasvatati Matrigeliga kaetud kuuekannulistest koekultuuri plaatides kommertsiaalses mTeSR1 (StemCell Technologies) söötmes.

2.3.2 Rakkude diferentseerimine butüraadiga

Esmalt passeeriti 100 mm tassile 10⁶ rakke ning lasti neil 3 päeva kasvada CO₂ inkubaatoris 37° C juures. Rakkude diferentseerimiseks töödeldi neid seejärel 1 mM NaB-ga lahustatuna 10% FBS EMEM söötmes. Inkubatsioon NaB-ga. kestis 48 h 37° C juures CO₂ inkubaatoris (Orchel et al. 2005). (Vt Lisa, Joonis 1). Antud diferentseerimise protokoll kasutati samaaegselt ka koostöö laboris Keemilise ja Bioloogilise Füüsika Instituudis, kus tuvastati ALP aktiivsuse mõõtmise kaudu Caco2 rakkude diferentseerumine butüraadi toimel (Vt Lisa, Joonis 2).

2.4 Fraktsioneerimine

Rakud eemaldati nende kasvukeskkonnast kasutades trüpsiini nagu rutiinse passeerimise korral (vt rakkude kultiveerimine). Trüpsiini inaktiveerimiseks kasutati 10%-st FBS raku söödet. Rakud tsentrifugeeriti 300xg 5 min RT (toatemperatuur, *room temperature*), saadud raku suspensiooni fraktsioneerimispuhvril (vt kasutatud reagentid) ning homogeniseeriti süstlaga. Esmalt kasutati 27G suurusega süstalt ja see järel 25G, kuni moodustus homogeenne lahus. Pärast esimest homogeniseerimist materjal tsentrifugeeriti ning supernatant säilitati -80 °C juures tsütoplasma, membraanide ning mitokondrite edasiseks uurimiseks. Saadud raku sademele, mis sisaldas rakutuumi, lisati fraktsioneerimispuhvrit ning suspensiooni homogeniseeriti kasutades 25G suurusega süstalt ja tsentrifugeeriti. Supernatant eemaldati ning rakupelletile lisati RIPA puhvrit (vt kasutatud reagentid) koos proteaaside inhibiitoritega (*Complete, Roche*) ning säilitati kuni eksperimentide läbiviimiseni -80 °C juures.

2.5 Valgusisalduse määramine

Proovides valgu kontsentratsiooni määramiseks kasutati Pierce BCA valgu analüüsi komplekti (*Thermo Scientific*) tootja protokoll järgi. Enne mõõtmiseid inkubeeriti proove 37° C juures 30 minutit ning neelduvused mõõdeti plaadilugejaga (*Thermo Multiskan Ascent*) $\lambda=562$ nm juures. Kontsentratsiooni arvutamiseks kasutati tootja poolt soovitatud BSA põhinevat referentslahuseid.

2.6 Voolutsütomeetria

Rakkude eraldamiseks kasvukeskkonnast kasutati 1x happelist soolalahust (KCl+Na₃C₆H₅O₇). Esmalt viidi läbi pesu PBS lahusega, millele järgnes rakkude inkubeerimine happelise soolalahusega 10 min CO₂ inkubaatoris 37° C juures. Rakke suspendeeriti seni kuni need eraldusid teineteise küljest ning viidi 1% BSA-PBS+ 2 mM EDTA lahusesse ning tseentrifuugiti 300xg juures 5 min. Supernatant eemaldati, rakud suspendeeriti 1% BSA-PBS+2 mM EDTA lahuses ning rakud loendati ja jaotati 300 000 raku FACS tuubi kohta. Rakud tseentrifuugiti ning supernatant aspireeriti. Fikseerimiseks töödeldi rakke 1,6% PA-ga 10 min RT ning pesti kaks korda, vastavalt PBS ja PERM lahusega, tseentrifuugides ja eraldades pesulahus. Järgnevalt lisati primaarsed antikehad 50 µl lõppmahus proovi kohta ning inkubeeriti toatemperatuuril 45 min. Pärast inkubatsiooni antikehadega, viidi läbi pesu PERM puhvis ning tseentrifuugimine. Seejärel lisati vajadusel sekundaarsed antikehad 50 µl lõppmahus ning inkubeeriti 30 min toatemperatuuril ning teostati pesu PERM puhvriga. Rakud suspendeeriti PERM puhvis, millele lisati DNA värv DAPI (1:2000). Enne FACS (fluorestsents-aktiveeritud rakkude sorteerimine, *fluorescence-activated cell sorting*) (*FACSAria*, *BD Biosciences*) analüsaatorisse viimist suspensioonid filtreeriti. Saadud tulemusi analüüsiti FACS Diva (*BD Biosciences*) programmiga. Analüüsi *FACSAria* ja *FACS Diva*-ga teostas Martin Pook.

2.7 Immunofluorestsentsmikroskoopia

Valkude visualiseerimiseks kasvatati rakud steriilsetel ümaratel 12 mm diameetriga katteklaasidel (*Marienfield*).

Rakke pesti PBS-ga ning see järel fikseeriti rakud 2% PA-s 15 min RT. Sellele järgnes pesu PBS-ga kolmes korduses ning blokeerimine 1% BSA-PBS/Saponiin (0,1%) lahusega 1 h toatemperatuuril. Primaarsete antikehadega inkubeerimine teostati PBS/Saponiin (0,1%) lahuses, inkubeeriti 1 h RT (vt reagentid). Pärast pesu PBS-ga lisati sekundaarsed antikehad (1:500), inkubatsiooni ajaks 1 h toatemperatuuril. Pärast inkubatsioone antikehadega ja pesu PBS-ga, lisati DAPI (1:1000), mis märgistab rakutuumad. Primaarsed ja sekundaarsed

antikehad ning DAPI pipeteeriti parafilmile ning rakkudega klaas viidi lahusele. Enne sulustamist (*FluorSave Reagent, Calbiochem*) pesti rakke veelkord PBS-ga. Edasine analüüsimine toimus mikroskoobiga (*Olympus IX81*) ning analüüsiti CellR programmiga (Olympus).

2.8 Western blot analüüs

Esmalt võrdsustati proovide valgukontsentratsioonid. Selleks määrati eelnevalt proovides valgu kontsentratsioonid (vt valgusisalduse määramine). Valgukontsentratsioonide võrdsustamiseks kasutati RIPA puhvrit koos proteaaside inhibiitoritega. Proovid segati 6x proovipuhvriga (vt reagentid). Proove kuumutati 95 °C juures 5 min.

Valkude analüüsimiseks kasutati 10% SDS-poliüakrüülamiidgeeli. Molekulmassi markerina kasutati *Thermo Scientific 26616* valgumarkerit. Valgud lahutati elektroforeetiliselt (100 V) ning kanti polüvinüülideenfluoriid-aktiveeritud membraanile. Kasutati nn „märja“ ülekande-meetodit (*BioRad*) üks tund 100 v juures. Vabade alade blokeerimiseks membraanil kasutati 5% lõssipulbrilahust PBS-Tweenis (PBS, 0,1% Tween-20) 1 h RT. Seejärel inkubeeriti membraane primaarsete antikehadega üleöö 4 °C juures (vt reagentid). Membraane pesti PBS-Tween lahusega 15 min kolm korda. Sellele järgnes inkubatsioon sekundaarsete antikehadega (lahjendus 1:5000) 1 h RT. Membraani pesti kolm korda 15 min PBS-Tween lahusega. Membraane töödeldi võimendatud kemoluminestsents meedodil spetsiaalses reaktsioonisegus (*ECL, Millipore*) 5 min. ECL reagentiga töödeldud membraane vaadeldi UVP (*Biospectrum Imaging System*) masinas ning analüüsiti UVP Software 510 programmiga.

2.9 PCR

Tabel 2. NANOG transkriptide tuvastamiseks kasutatud praimerid. F- pärisuunaline, R- vastassuunaline

Praimer	Järjestus	Produkt	Tuvastab
B	F 5'-GCCTCCAGCAGATGCAAGAAC-3'	418 bp	NANOG1/ NANOG2
	R 5'-GCAGGAGAATTTGGCTGGAAC -3'	370 bp	
D	F 5'-GTTAATGTGGTTACAAAACGTGAC-3'	351 bp	NANOG2 alternatiivn e splaiising
	R 5'-GCCACCTCTTAGATTTTCATTCTCTGGTTCTGG-3'		
E	F 5'-CAAAGCTTGCCTTGCTTTGAAGA -3'	525 bp	NANOGP8 transkript
	R 5'-CTGGTGGTAGGAAGAGTAAAGG -3'		

Tabel 3. OCT4 transkriptide tuvastamiseks kasutatud praimerid. F-pärisuunaline, R-vastassuunaline

Praimer	Järjestus	Produkt	Tuvastab
F	F 5'-AGACTATTCCTTGGGGCCACAC-3'	267 bp	OCT4B
	R 5'-CTCAAAGCGGCAGATGGTTCG-3'	492 bp	OCT4B1
G	F 5'-CTTCTCGCCCCCTCCAGGT-3'	496 bp	OCT4A
	R 5'-AAATAGAACCCCCAGGGTGAGC-3'		
O_ALL	F 5'-GAGAATTTGTTTCCTGCAGTGC-3'	470 bp	OCT4A, OCT4B, OCT4B1
	R 5'-GTTCCCAATTCCTTCCTTAGTG-3'		

Esmalt eraldati NaB töödeldud rakkudest ning töötlemata rakkudest RNA vastavalt kiti tootjapoolsele juhendile (*Favorgen*). See järel töödeldi eraldatud RNA-d Dnase-ga (*Thermo EN0521*) genoomse DNA kontaminatsiooni vältimiseks ning viidi läbi pöördtranskriptsioon cDNA saamiseks (*Thermo kit K1622*). Dnase töötamise läbiviimiseks segati omavahel RNA, 10x reaktsiooni puhver, Dnase ja RiboLock ning inkubeeriti 37° C juures 30 min. Lisati 50 mM EDTA ning inkubeeriti 65° C 10 min. cDNA sünteesiks kasutati Dnase-ga töödeldud materjali, millele lisati 5x reaktsiooni puhvrit, RiboLock, nukleotiidid, juhusliku heksameetri praimerisegu ja revertaas vastavalt tootjapoolsele juhendile. Kasutati järgnevat programmi: 25° C 10 min, 42° C 60 min ning 70° C 5 min.

Veendumaks eralduse õnnestumises, viidi läbi kontroll PCR GAPDH praimeritega. Selleks kasutati päri- ja vastassuunalisi primereid: F 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGT-3' ning R 5'-GAAGATGGTGATCGGATTTC-3', mis tuvastab 248 bp pikkust GAPDH transkripti (Vt Lisa, Joonis 3).

Tabel 4. Kasutatud reaktsioonisegu koostis

	Kontsentratsioon	Maht 1 reaktsiooni kohta
Solis 5x FirePol Mix	5x	4 µl
F praimer	10 µM	1 µl
R praimer	10 µM	1 µl
Nuclease-free water		13 µl
cDNA		1 µl

Tabel 5. NANOg transkriptide amplifitseerimiseks kasutatud programmid

Programm	Temperatuur °C	Kestvus	Praimer
Algne denaturatsioon	94	120 s	B, D, E
Denaturatsioon	94	30 s	B, D, E
Praimerite seondumine	58	30 s	B, D
	59	30 s	E
Elongatsioon	72	90 s	B
	72	60 s	D, E
Lõplik ekstensioon	72	5 min	B, D, E

40x

Tabel 6. OCT4A, OCT4B ja OCT4B1 transkriptide amplifitseerimiseks kasutatud programm

Programm	Temperatuur °C	Kestvus
Algne denaturatsioon	94	120 s
Denaturatsioon	94	30 s
Praimerite seondumine	64	30 s
Elongatsioon	72	35 s
Lõplik ekstensioon	72	10 min

35x

Tabel 7. OCT4_ALL transkripti amplifitseerimiseks kasutatud programm

Programm	Temperatuur °C	Kestvus
Algne denaturatsioon	93	50 s
Denaturatsioon	94	30 s
Praimerite seondumine	60	30 s
Elongatsioon	72	35 s
Lõplik ekstensioon	68	5 min

30x

2.10 Andmetöötlus

Andmete töötlemiseks kasutati MS Office 2010 (Microsoft), CellR (Olympus Corporation), UVP Software 510 programmi (UVP, LLC), Imarise (Bitplane) ja FACS Diva programmi (BD Biosciences).

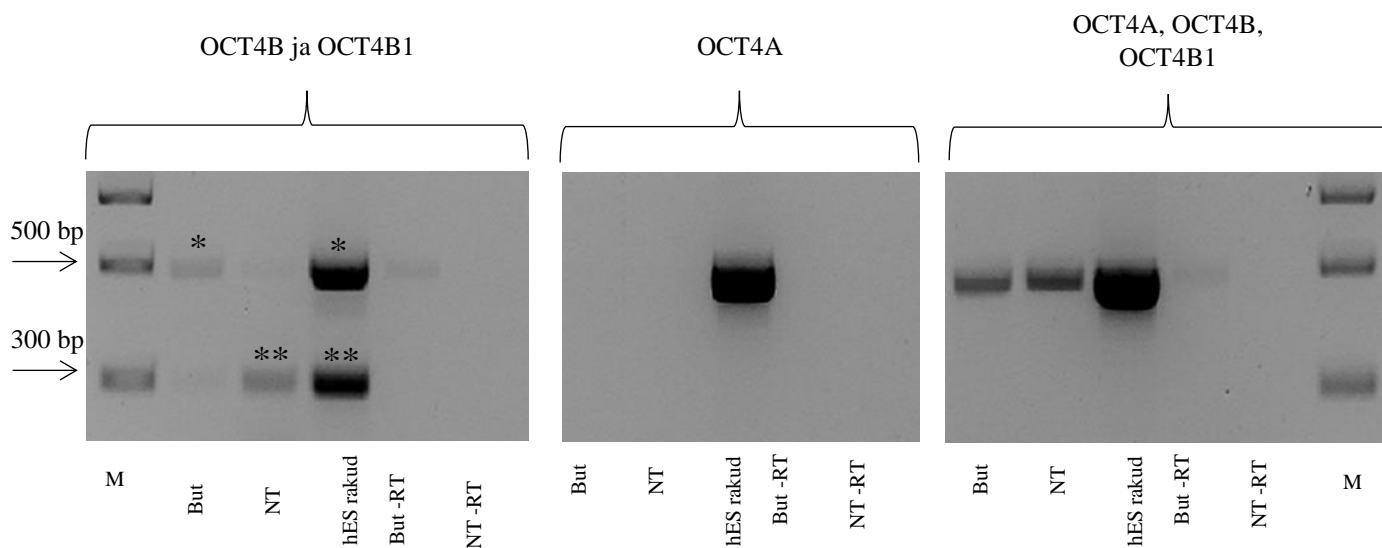
3. Tulemused

Pluripotentsusmarkeritena kasutuses olevate *POU5F1 (OCT4)* ja *NANOG* puhul on teada paljude erinevate transkriptide ekspresseerumise võimalus. Kuid Caco2 rakkude puhul pole põhjalikult kirjeldatud nende variantide ekspresseerumist. Kuna *SOX2* puhul on teada vaid ühe transkripti variandi esinemine ning seda on eelnevalt ka kirjeldatud Caco2 rakkudes (Amini et al. 2014), siis antud töös selle transkripti olemasolu ei vaadeldud. Küll aga pole eelnevalt näidatud *SOX2* ekspresseerumist valgutasemel ning pole teada ka *OCT4* ja *NANOG* valkude esinemine selles rakuliinis. Töö eesmärgiks oligi iseloomustada nende ning ka teiste tüvirakke iseloomustavate markerite ekspressiooni Caco2 rakuliinis valgu tasemel ja kirjeldada nende muutumist Caco2 rakkude diferentseerumisel butüraadiga.

3.1 *OCT4* transkriptide analüüs PCR meetodikal

Varasemalt on näidatud, et võrreldes normaalse koega on jämesoolevähis *OCT4* ekspressioon kõrgem (Gazouli et al. 2012). Tihti ei ole aga kirjanduses täpselt väljatoodud, milliseid *OCT4* variante on detekteeritud. Täpsustamiseks spetsiifiliste transkriptide ekspressiooni, kasutati semi-kvantitatiivset RT-PCR meetodikat ning praimerpaare, mis võimaldasid detekteerida eraldi *OCT4A*, *OCT4B* ja *OCT4B1* transkripte (vt. Tabel 3. *OCT4* transkriptide tuvastamiseks kasutatud praimerid, (Atlasi et al. 2008). *OCT4B* ja *OCT4B1* transkriptide eristamiseks kasutati nende PCR produktide erinevaid suuruseid- nimelt on *OCT4B1* produkt ligikaudu kaks korda pikem kui *OCT4B* produkt. Positiivse kontrollina kasutati inimese embrüonaalseid tüvirakke (hES) H9, kus on eelnevalt näidatud nende praimeritega *OCT4A*, *OCT4B* ja *OCT4B1* transkriptide ekspressiooni (Atlasi et al. 2008). Lisaks kasutati antud töö tulemuste valideerimisel ka ilma revertaasita saadud proove (-RT), vältimaks valepositiivseid tulemusi, mis võiksid tuleneda DNA saastusest. Antud töös uuritud jämesoolevähi Caco2 koekultuuris kasvanud mõjutamata rakkudes tuvastati peamiselt *OCT4B* transkripti ekspressioon, kuid nende rakkude butüraadiga (1 mM, 48 h) diferentseerumise indutseerimisel oli *OCT4B* transkript vaid vähesel määral detekteeritav (Joonis 7). Nende rakkude butüraadiga töötlemisel detekteeriti ka *OCT4B1* transkripti vähest olemasolu, kuid kuna vastava proovi -RT kontrollis oli ka sama produkt tuvastatav, siis võis see pärineda DNA saastusest. Mõlemad, nii *OCT4B* kui ka *OCT4B1* transkriptid olid olemas positiivse kontrollina hES-rakkude proovis. *OCT4A* transkripti õnnestus detekteerida vaid hES-rakkude proovis, Caco2 rakkudes seda pluripotentsetele tüvirakkudele iseloomulikku transkripti ei tuvastatud (Joonis 7). Praimeritega, mis detekteerivad kõikide *OCT4* transkriptide olemasolu neid eristamata, detekteeriti *OCT4* transkriptide esinemist nii Caco2 kui ka hES-rakkude proovides, kusjuures hES-rakkude puhul viitab tulemus *OCT*

transkriptide suuremale ekspressioonile võrreldes Caco2 rakkudega (Joonis 7). Kahjuks on nende praimeritega näha ka vähest produkti esinemist Caco2 butüraadi töötlusel –RT proovis.

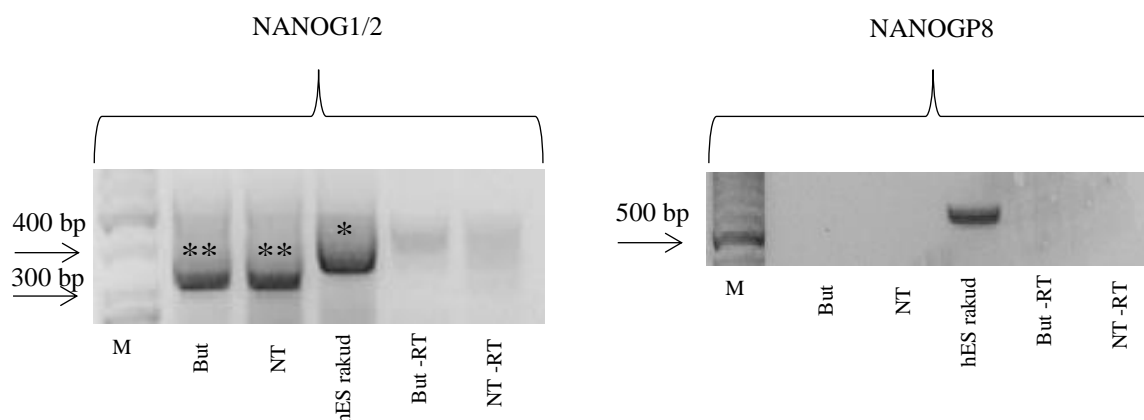


Joonis 7. OCT4 transkriptide ekspressioon Caco2 ja hES rakkudes. Kasutatud on jämesoolevähi rakuliini Caco2 butüraadiga mõjutatud (But) rakke ning mõjutamata (NT) rakke. Positiivse kontrollina on kasutatud hES rakke. Samuti on välja toodud revertaasi töötletud proovid (-RT). Ühe tärniga (*) on tähistatud OCT4B1 transkript, mille pikkus on 492 bp ning kahe tärniga (**) OCT4B transkript, mille suurus on 297 bp. Kasutati 2% agarosgeeli. Teostati kaks tehnilist katset.

3.2 NANOG transkriptide analüüs PCR meetodikal

Järgnevalt uuriti NANOG transkriptide esinemist jämesoolevähi rakuliinis Caco2 ning võrreldi ekspressiooni hES rakkudega. Eelnevate töödega on näidatud NANOG ekspressiooni suurenemist jämesoole vähkkasvaja formeerumisel (Zhang et al. 2013). Saamaks ülevaadet erinevate NANOG transkriptide ekspressioonist viidi läbi semi-kvantitatiivne RT-PCR. Erinevate NANOG transkriptide tuvastamine on raskendatud nende suure sarnasuse tõttu. RT-PCR teostamisel kasutati erinevaid praimerpaare, mis tuvastavad koos NANOG1 ja NANOG2 erineva suurusega produkte, NANOG2 alternatiivse splaissingu esinemist või NANOGP8 olemasolu (vt Tabel 2. NANOG transkriptide tuvastamiseks kasutatud praimerid; Amini et al. 2014; Eberle et al. 2010). Selleks, et hinnata varem publitseeritud praimerite spetsiifilisust, kontrolliti lisaks veebis vabalt kasutatava Primer-Blast otsinguga. Nagu ka eelnevalt OCT4 transkriptide tuvastamisel, kasutati siingi positiivse kontrollina hES rakuliini H9. Samuti on DNA saastusest tulenevate vale-positiivsete tulemuste vältimiseks kasutatud –RT proove. Esmalt kasutati praimerite paari, mis tunneb ära nii NANOG1 kui NANOG2 transkripti, kuid need on eristatavad suuruse järgi. Nimelt on NANOG1 transkripti produkt pikem kui NANOG2 puhul. Töös kasutatud ilma butüraadi töötletud Caco2 rakkudest (NT)

tuvastati NANOG2 transkripti olemasolu. Samuti on NANOG2 transkripti ekspressioon detekteeritav samade rakkude butüraadiga (But) töötlemisel (1 mM, 48 h) (Joonis 8). Tulemuste valideerimiseks kasutatud –RT proovidest sama pikkusega produkte ei esinenud. NANOG1 transkripti olemaolu tuvastati positiivse kontrollina kasutatud hES rakkudes, kuid mitte butüraadiga töödeldud ja töötlemata Caco2 rakkudes (Joonis 8). Lisaks uuriti NANOGP8 transkripti ekspressiooni, mis oli detekteeritav vaid hES rakkudes (Joonis 8). Analüüsi ka võimaliku NANOG2 alternatiivse splaissingu esinemist (Eberle et al. 2010), kuid vastavat transkripti ei detekteeritud (Vt Lisa, Joonis 4).

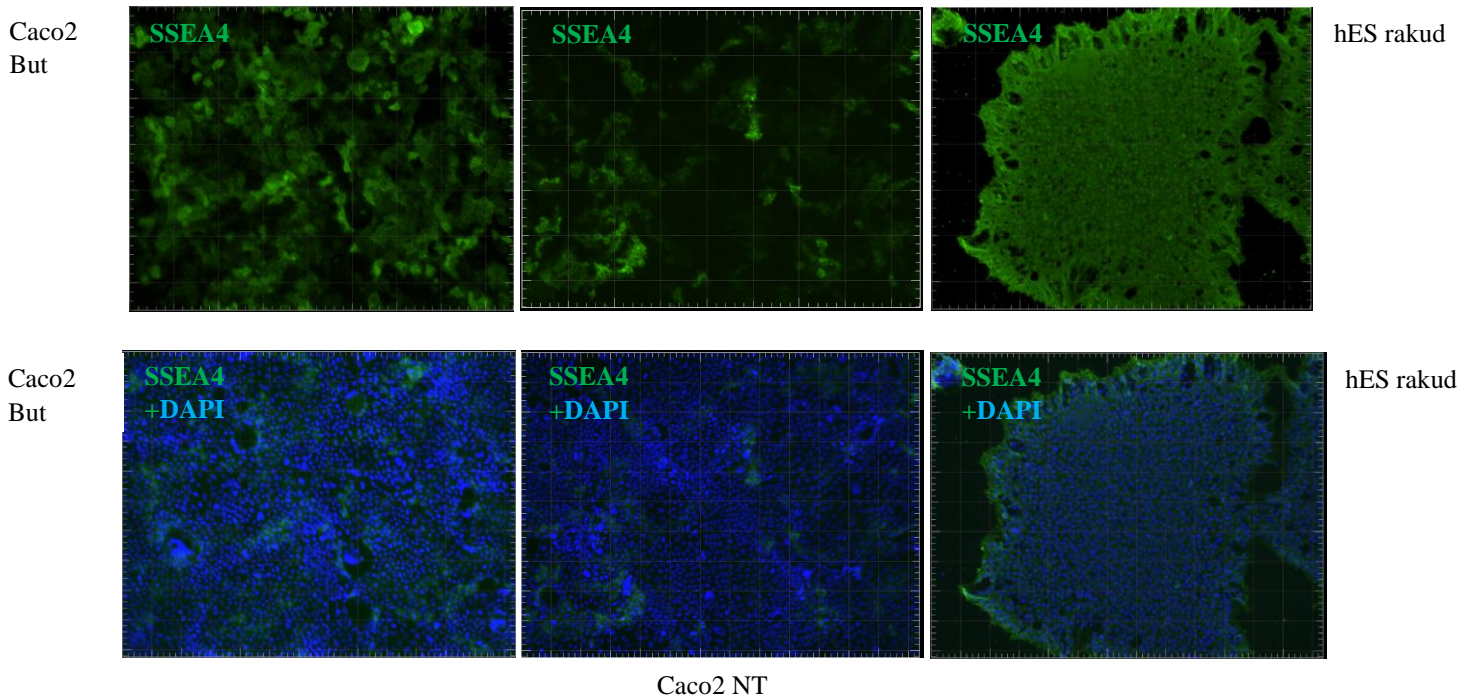


Joonis 8. NANOG transkriptide tuvastamine. Kasutatud on jämesoolevähi rakuliini Caco2 butüraadiga mõjutatud (But) rakke ning mõjutamata (NT) rakke. Positiivse kontrollina on kasutatud hES rakke. Samuti on välja toodud revertaasi töötseta proovid (-RT). Ühe tärniga (*) on tähistatud NANOG1 transkript (418 bp) ja kahe tärniga (**) NANOG2 transkript (370 bp). Kasutati 2% agarosgeeli. Teostati kaks tehnilist katset.

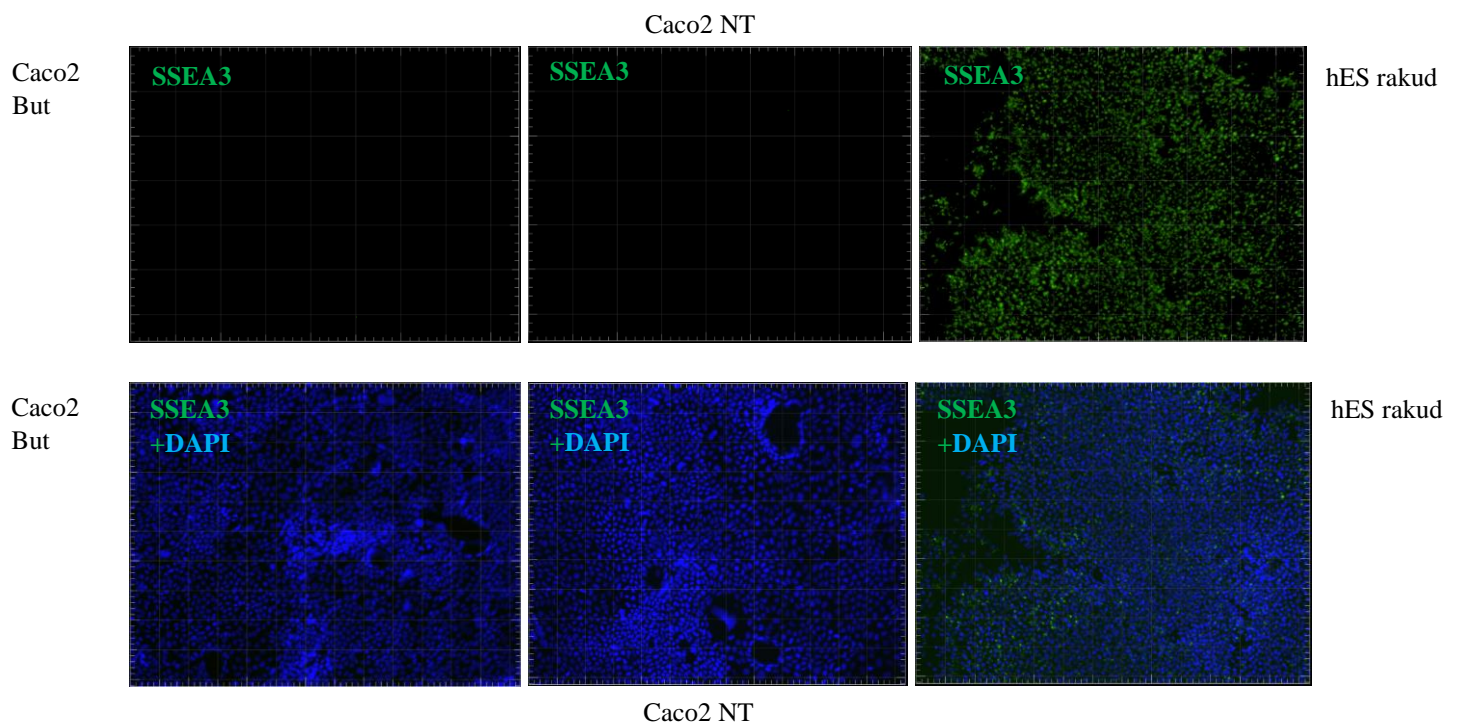
3.3 Pluripotentsusega seotud SSEA-4, SSEA-3, NANOG ja OCT4 valkude ekspressiooni tuvastamine immunofluorestsentsmikroskoopiaga

Kuna varasemalt on kirjeldatud, et Caco2 rakkude hulgas esineb väike populatsioon SSEA-3 ekspresseerivaid rakke (Suzuki et al. 2013), teostati antud magistritöö raames IF meetodikal põhinev analüüs SSEA-3 ja ka SSEA-4 tuvastamiseks (vt Tabel 1, Kasutatud antikehad). Selgus, et SSEA-4 on ekspresseeritud nii butüraadiga mõjutatud Caco2 rakkudes (NaB) kui ka butüraadiga mõjutamata rakkudes (NT) (Joonis 9). Oli märgata ka tendentsi, kus Caco2 rakkude butüraadiga mõjutamisel suurenes SSEA-4 positiivsete rakkude hulk võrreldes mõjutamata rakkudega. IF meetodikat kasutati ka SSEA-3 detekteerimiseks, kuid SSEA-3 positiivseid rakke ei õnnestunud tuvastatud (Joonis 10).

Caco2 NT



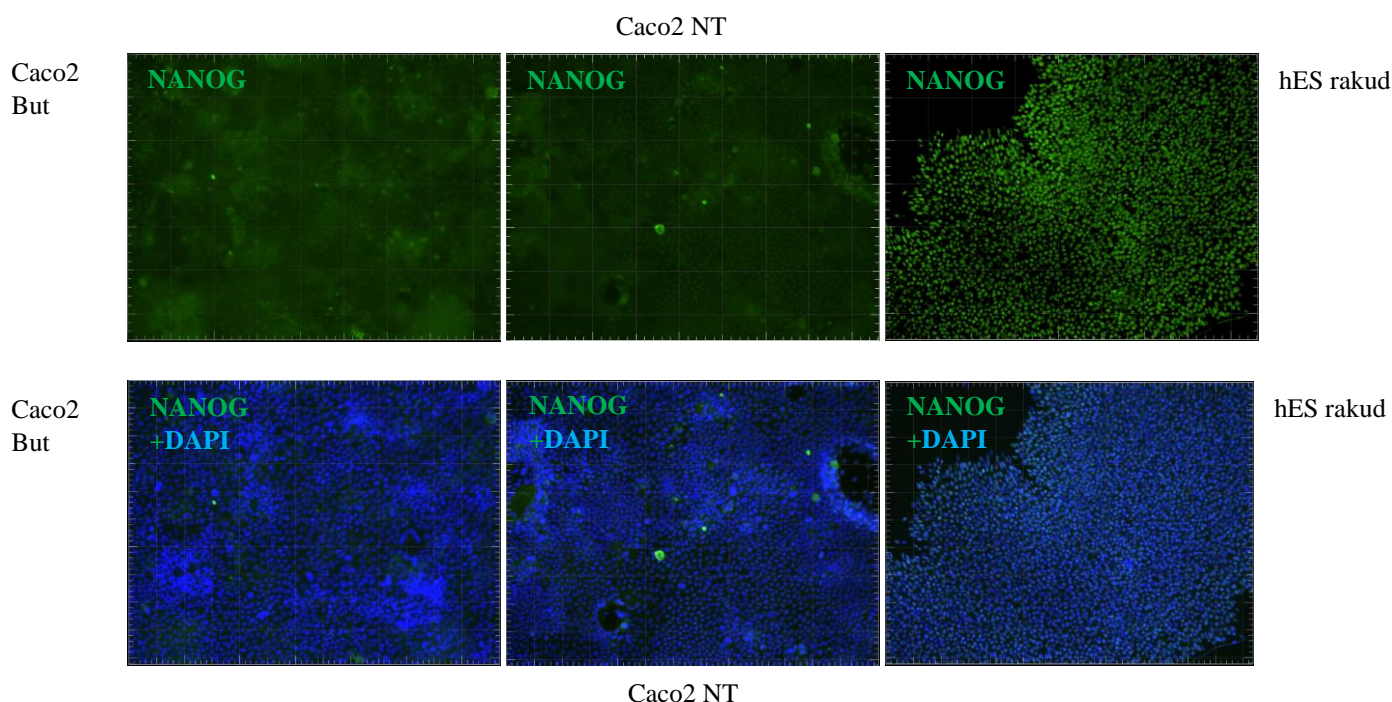
Joonis 9. SSEA-4 ekspressioon butüraadiga töödeldud ja töötlemata Caco2 rakkudes. SSEA-4 ekspressioon tuvastati nii butüraadiga mõjutatud (1 mM, 48 h) kui mõjutamata rakkudes. Pildid on saadud kasutades 10x suurendusega objektiivi. Teostati 2 korudskatset.



Joonis 10. SSEA-3 ekspressioon butüraadiga töödeldud ja töötlemata Caco2 rakkudes. SSEA-3 ekspressiooni ei tuvastatud butüraadiga mõjutatud ega mõjutamata Caco2 rakkudest. Pildid on saadud kasutades 10x suurendusega objektiivi. Teostati kaks bioloogilist katset.

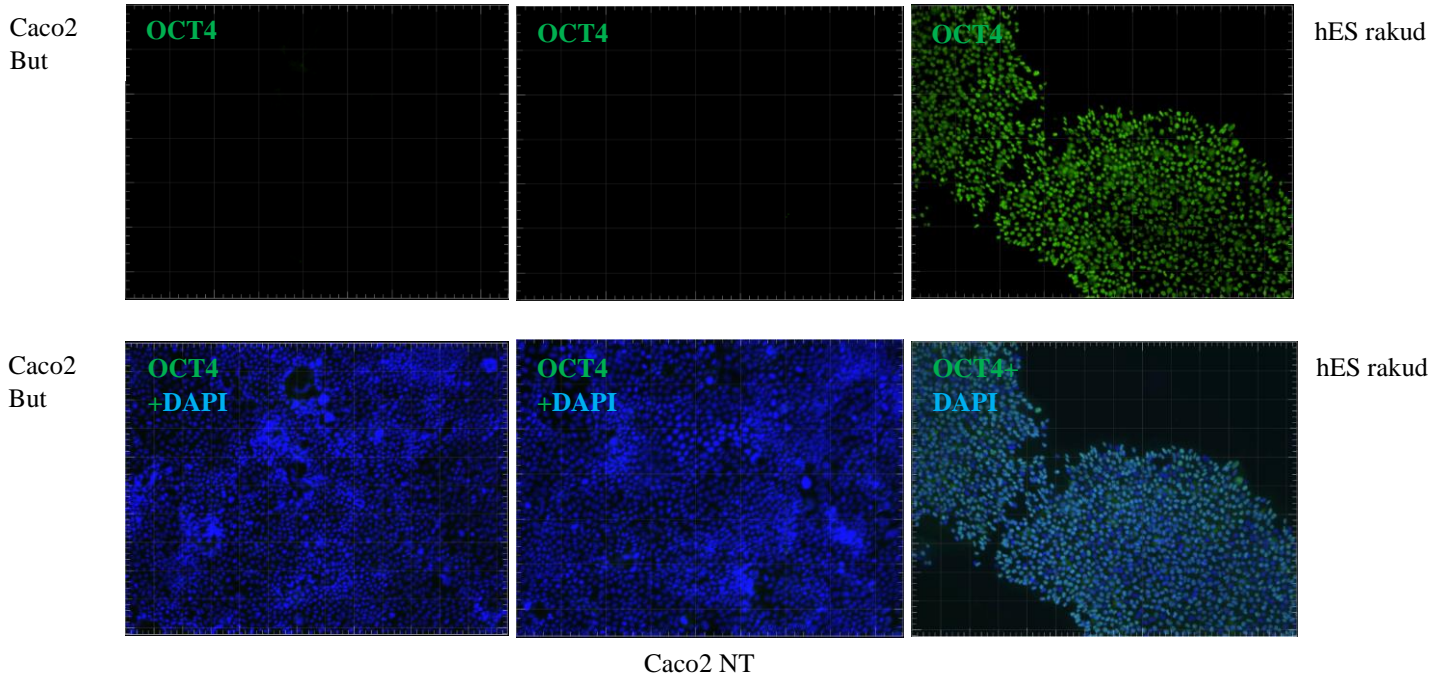
Järgnevalt vaadeldi pluripotentsusega seotud transkriptsioonifaktorite ekspressiooni valgu tasemel.

Antud magistritöö raames teostatud RT-PCR tulemused viitasid NANOG2 valgu võimalikule ekspressioonil Caco2 rakkudes. Seetõttu valiti IF meetodikaga kasutamiseks polüklooraalne NANOG vastane antikeha (NANOG_SC, vt Tabel 1. Kasutatud antikehad), mis peaks samuti detekteerima muu hulgas ka NANOG2 valgu isovormi (kirjeldatud tootja infolehel). Joonisel 11. on näha, et NANOG valku ekspresseeritakse Caco2 rakkudes sõltumata butüraadiga rakkude mõjutamisest.



Joonis 11. NANOG ekspressioon butüraadiga mõjutatud ja mõjutamata Caco2 rakkudes. *NANOG on ekspresseeritud nii butüraadiga indutseeritud diferentseerumise korral (1 mM, 48 h) kui ka mõjutamata rakkude tuumades. Pildid on saadud kasutades 10x suurendusega objektiivi. Teostati kaks bioloogilist katset.*

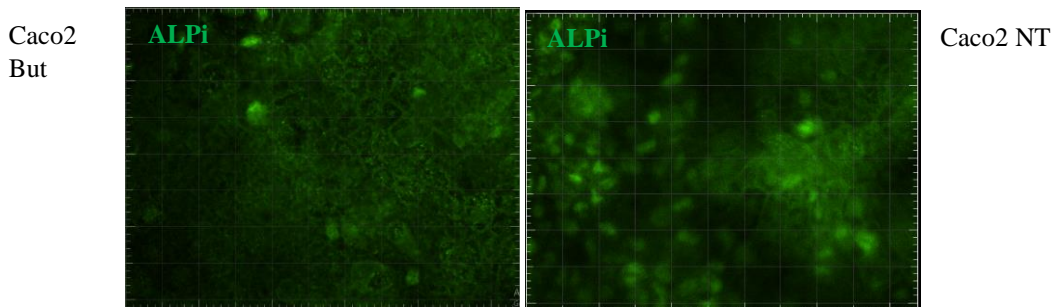
Lisaks NANOG-le teostati ka OCT4 valgu detekteerimine IF meetodikat kasutades. Antud juhul oli meie laboris võimalik kasutada IF meetodika jaoks vaid üks monoklonaalne antikeha (OCT3/4_SC, vt Tabel 1, Kasutatud antikehad), mis peaks eelistatult ära tundma OCT4A valgu isovormi (Atlasi et al. 2008). Sarnaselt RT-PCR tulemusele, ei olnud ka IF meetodikaga võimalik tuvastada OCT4A valgu ekspressiooni Caco2 rakkudes (Joonis 12).



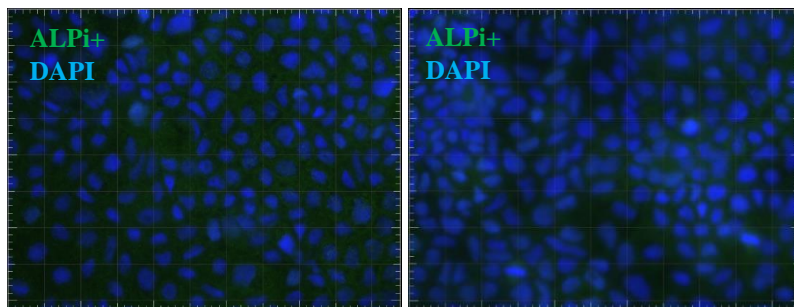
Joonis 12. OCT4 ekspressioon butüraadiga mõjutatud ja mõjutamata Caco2 rakkudes. *OCT4* ekspressiooni ei detekteeritud butüraadiga mõjutatud ega mõjutamata Caco2 rakkudes. Pildid on saadud kasutades 10x suurendusega objektiivi. Teostati kaks bioloogilist katset.

3.4 Soolestiku aluselise fosfataasi valgu ekspressiooni tuvastamine immunofluorestsentsmikroskoopiaga

Järgnevalt uuriti soolerakkude diferentseerumise markeri ALPi (ALPi_LSB, vt Tabel 1. Kasutatud antikehad) ekspressiooni butüraadiga mõjutatud ja mõjutamata rakkudes (Joonis 13). ALPi ekspressioon antud antikehaga oli detekteeritav nii diferentseerunud kui diferentseerumata rakkudes, kuid selle lokaliseerimine muutus butüraadiga indutseeritud diferentseerumise käigus. Nimelt Caco2 rakkudes, mis polnud butüraadiga mõjutatud, ekspresseeriti ALPi enamasti rakutuumades, kuid pärast diferentseerumise indutseerimist butüraadiga, oli ALPi ekspressioon detekteeritav peamiselt tsütoplasmas ja/või membraanis.



Caco2
But



Caco2 NT

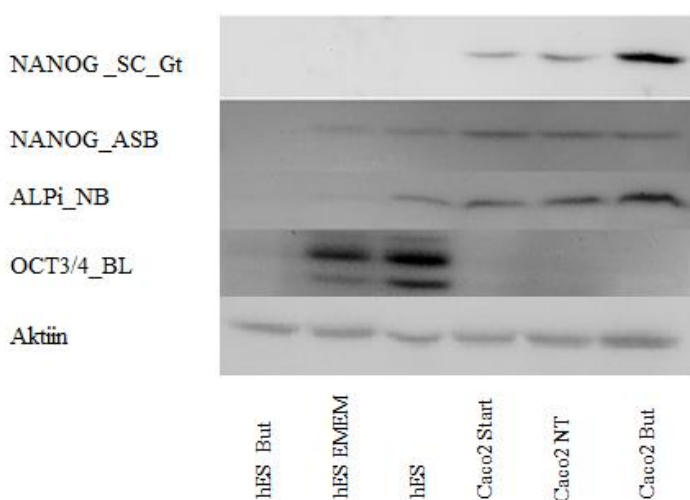
Joonis 13. Soolestiku aluselise fosfataasi (ALPi) ekspressioon Caco2 rakkudes. ALPi ekspressioon oli detekteeritav nii diferentseerumisele indutseeritud (1 mM butüraadiga töötlus 48 h vältel) kui ka mõjutamata Caco2 rakkudes. Butüraadiga mõjutamise korral on ekspressioon detekteeritav peamiselt tsütoplasmas ja/või membraanis, kuid mõjutamata rakkudes on ALPi detekteeritav hoopis rakutuumades. Pildid on saadud kasutades 10x suurendusega objektiivi. Teostati kaks bioloogilist katset.

3.5 Pluripotentsusega seotud transkriptsioonifaktorite ja diferentseerumismarkeri ALPi analüüs western blot meetodil

Selleks, et valideerida IF tulemusi pluripotentsusega seotud transkriptsioonifaktorite ja diferentseerumismarkeri ALPi osas, teostati lisaks veel valgu ekspressiooni analüüs western blot meetodil. Siinkohal kasutati positiivse kontrollina pluripotentsusega seotud markervalkude puhul diferentseerumata hES rakke ning kuna on üldteada, et butüraat ja seerumit sisaldav sööde indutseerivad hES rakkude diferentseerumist, teostati negatiivse kontrolli jaoks hES rakkude puhul samasugune butüraadiga mõjutamine nagu seda olu tehtud Caco2 rakkude puhul. Et paremini hinnata butüraadi mõju hES rakkude diferentseerumisele, kasutati ka sellist proovi, kus hES rakke oli kasvatatud samas seerumit sisaldavas söötmes, milles Caco2 rakke, kuid ilma butüraadita.

OCT4 valgu ekspressioon tuvastati hES rakkudes, mille kultiveerimisel oli kasutatud pluripotentsust toetavat mTesR1 söödet ning Caco2 rakusöödet EMEM (Joonis 14). Kui EMEM rakusöötmele lisati NaB, siis OCT4 valgu ekspressioon polnud enam detekteeritav (Joonis 14). Sarnaselt eelnevale IF analüüsile, ei tuvastatud ka selle eksperimendi käigus OCT4 valgu ekspressiooni kuigi antud juhul kasutati alternatiivset OCT3/4_BL antikeha (Joonis 14). Järgnevalt uuriti pluripotentsusega seotud NANOG ekspressiooni, kasutades kahte erinevat NANOG vastast antikeha: NANOG_SC_Gt ja NANOG_ASB. Jooniselt 14 on näha, et NANOG_ASB tunneb valgu ära nii butüraadiga mõjutatud kui mõjutamata Caco2 rakkudes ning ka Caco2 „Start“ rakkudes, mis representeerivad rakke enne mõjutamise algust. Diferentseerumata hES rakkudes ja mõningal määral ka EMEM rakusöötmes kasvatatud hES rakkudes tuvastati selle antikehaga NANOG valgu ekspressioon, kuid butüraadiga hES rakkude mõjutamise korral NANOG valgu ekspressioon pole enam detekteeritav (Joonis 14).

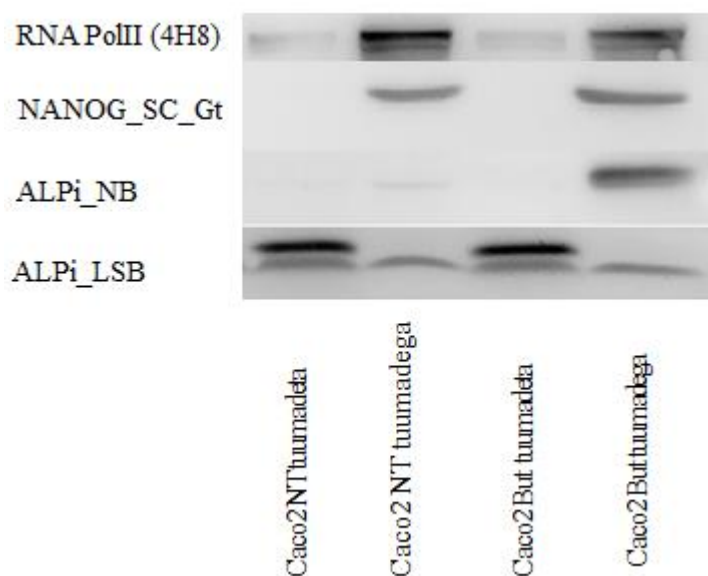
NANOG_SC_Gt detekteerib valku kõigis Caco2 rakude proovides, kuid kuna hES rakkudes antud NANOG vastase antikehaga ekspressiooni ei tuvastatud, viitab see koos RT-PCRi tulemustega antud antikeha spetsiifilisusele NANOG2 suhtes (Joonis 14). Diferentseerumise markeri ALPi puhul on märgatav mõningane ekspressiooni suurenemine Caco2 butüraadiga mõjutatud rakkudes, kuid valku ekspresseeritakse ka mõjutamata Caco2 rakkudes. Vastupidiselt Caco2 rakkudele väheneb hES rakkudes diferentseerumise käigus ALPi ekspressioon. Kui diferentseerumata hES rakkudes on valk veel olemas, siis EMEM rakusöötmes kasvatatuna on ekspressioon vaevumärgatav ning butüraadiga mõjutades kaob üldse (Joonis 14).



Joonis 14. Pluripotentsusmarkerite OCT4, NANOG ning diferentseerumismarkeri ALPi ekspressioon CaCo-2 ja inimese embrüonaalsetes tüvirakkudes (hES rakud). *Butüraadiga mõjutatud Caco2 rakud on tähistatud kui „Caco2 But“, mõjutamata rakud „Caco2 NT“. „Caco2 Start“ tähistab rakke enne butüraadiga diferentseerumise indutseerimist. „hES“ tähistab diferentseerumata hES rakke, tähistus „EMEM“ viitab rakusöötme EMEM kasutamisel hES rakkude kasvatamisel ning „hES But“ tähistab butüraadi kasutamist rakusöötmes EMEM. Teostati kolm bioloogilist korduskatset.*

Kuna IF meetodikaga ALPi ekspressiooni uurides selle lokalisatsioon diferentseerumise käigus muutus, siis viidi läbi fraktsioneerimine erinevates rakukompartimentides ALPi ekspressiooni tuvastamiseks (Joonis 15). Western blot meetodil analüüsiti butüraadiga mõjutatud ja mõjutamata rakkude rakutuumadega rikastunud fraktsiooni ning valdavalt rakutuumadeta fraktsiooni. Tuleb arvestada, et antud fraktsioneerimismeetod ei võimalda täielikku tuumade eraldamist ühte ja ainsasse fraktsiooni ning seda on näha ka RNA Polümeraas II detekteerimisest erinevates fraktsioonides (Joonis 15). Fraktsioneerimise tulemustest on näha, et alternatiivne NANOG isovorm esineb rakutuumades. Lisaks on näha, et erinevad väidetavalt ALPi spetsiifilised antikehad tunnevad ära erinevaid sihtmärke. Kui ALPi_NB detektsioon, mille kaudu tuvastati antud töös eelnevalt

ka ALPi ekspressiooni mõnevõrra suurenemise dententsi näib olevat butüraadiga mõjutatud Caco2 rakkude tuumas, siis ALPi_LSB detektsioon, mida kasutati antud töös ka IF analüüsil, näitab antud juhul tuumas mittepaiknemist sõltumata butüraadi juuresolust. Kahjuks ei ole need tulemused heas kooskõlas eelnevaga ja vajavad seetõttu täiendavat uurimist. Antud magistritöö ALPi ekspressiooni praegused tulemused Caco2 rakkudes viitavad selle markeri ebasobivusele nende rakkude diferentseerumise iseloomustamiseks ja osutavad võimalikule probleemile erinevate antikehade spetsiifilisuse osas.

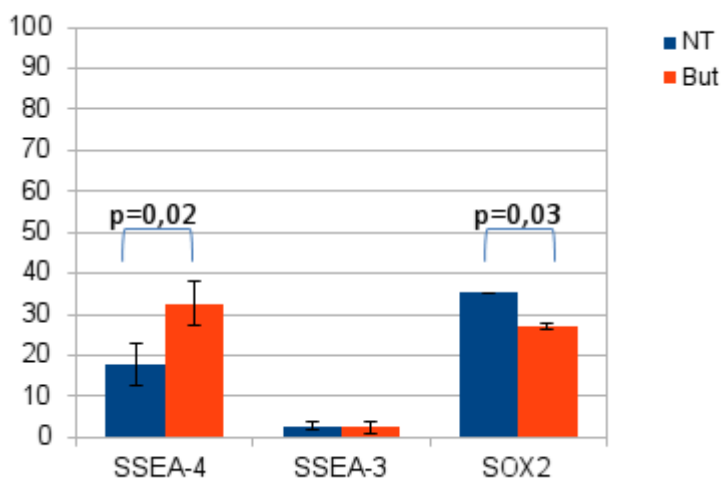


Joonis 15. NANOG ja ALPi ekspressioon rakutuumadega rikastatud ning rakutuumarikastuseta fraktsioonides. *NANOG ja ALPi valkude ekspressiooni uuriti butüraadiga mõjutatud Caco2 rakkude rakutuumadega rikastatud fraktsioonis (Caco2 But tuumadega) ja tuumarikastuseta fraktsioonis (Caco2 But tuumadeta) ning butüraadiga mõjutamata Caco2 rakkude rakutuumadega rikastatud fraktsioonis (Caco2 NT tuumadega) ja tuumarikastuseta fraktsioonis (Caco2 NT tuumadeta). Teostati üks bioloogiline katse.*

3.6 SSEA-3, SSEA-4 ja SOX2 valgu ekspressioon läbivoolutsütomeetria analüüs

Antud magistritöö eelnevate tulemuste põhjal otsustati teostada valgu ekspressiooni analüüs üksikraku tasandil kasutades läbivoolutsütomeetriat, hindamaks pluripotentsusega seotud markervalkude SSEA-4, SSEA-3 ja SOX2 ekspressiooni Caco2 rakkudes ning jälgida võimalikke muutusi butüraadiga indutseeritud diferentseerumise korral. Kuna eelnevad tulemused OCT4 ekspressiooni osas näitasid vaid vähesel määral alternatiivsete isovormide OCT4B ja OCT4B1 esinemist ning nende valgu isovormide eristamiseks antikehasid kasutada ei olnud, ei teostatud OCT4 analüüsi voolutsütomeetria abil. Ka NANOG spetsiifilised antikehad, mida kasutati IF või western blot meetodite puhul, ei osutunud läbivoolutsütomeetrias kasutatavas protokollis sobivaks. Teostatud analüüsi tulemustest

selgus, et rakkude diferentseerumise käigus suureneb SSEA-4 ekspressioon (Joonis 16), mis läheb kokku ka IF meetodikal saadud tulemustega. SSEA-3 positiivsete Caco2 rakkude hulk (erinevates korduskatsetes 1,6% kuni 3,7%) on madal nii diferentseerunud kui diferentseerumata Caco2 rakkudes (Joonis 16). Erinevalt SSEA-4-st selgus, et butüraadiga diferentseerumise indutseerimise käigus SOX2 ekspressioon langeb (Joonis 16).



Joonis 16. SSEA-3, SSEA-4 ja SOX2 valgu ekspressiooni läbivoolutsütofluorimeetriline analüüs. Joonise y-teljel on toodud vastavate markerite suhtes positiivsete rakkude hulk protsentides kogu analüüsitud populatsioonist. Teostatud on kolm bioloogilist korduskatset. Joonisel toodud ceapiirid näitavad 95% usaldusvahemikku. Statistiliselt olulised erinevused on märgitud vastava p-väärtusega (t-test, kahepoolne, tüüp 2).

4. Arutelu

Varasemalt on näidatud jämesoolevähi rakuliinis pluripotentsusmarkerite OCT4 ja NANOG transkriptide esinemist, kuid valgutasemel pole nende ekspressiooni näidatud. Töodes, kus on analüüsitud pluripotentsusega seotud markereid, on tihti peale probleemiks see, et ei ole täpsemalt defineeritud, milliseid transkripti variante või valgu isovorme on detekteeritud. Antud töös uuritud jämesoolevähi rakuliini Caco2 butüraadiga mõjutamata proovidest tuvastati OCT4B transkripti ekspressioon, mis butüraadiga töödeldes vähenes. Kuigi butüraadiga mõjutatud rakkude proovist tuvastati OCT4B1 transkripti ekspressioon, võib see tuleneda ka DNA saastusest, kuna –RT proovis esines sama pikkusega produkt. Huvitav on siinkohal välja tuua, et varasemalt on näidatud OCT4B1 ekspressiooni just pigem vähe diferentseerunud jämesoolevähi koes (Gazouli et al. 2012), aga antud magistris töös oli see vorm detekteeritav butüraadiga mõjutamata rakkude proovis. Jättes kõrvale DNA saastuse, võivad sellised erinevused tuleneda erinevustest analüüsitava materjalis, kuna primaarse kasvaja rakud võivad olla teistsuguse fenotüübiga võrreldes koekultuuri erinevate rakuliinidega. Käesolevas töös tuvastati OCT4B ja OCT4B1 transkriptide ekspressioon ka hES rakkudes, mis on koos kõlas ka varasema tööga (Atlasi et al. 2008). OCT4A transkripti ekspressioon detekteeriti vaid hES rakkudes, mille ekspressiooni on neis rakkudes korduvalt näidatud ka varasemate töödega (Hay et al. 2004; Martin et al. 2004; Zaehres et al. 2005). Valgu tasemel proovide uurimiseks kasutatud meetoditega Caco2 rakkudes OCT4 ekspressiooni ei tuvastatud. See tulenes sellest, et kasutatud antikehad tunnevad ära OCT4 valgu isovorme, mis antud rakkudes puuduvad, kuid on omased hES rakkudele.

Järgnevalt uuritud NANOG valgu puhul on näidatud jämesoolevähis kõrgemat ekspressiooni kui normaalses sooles. (Meng et al. 2010). RT-PCR tulemustest lähtuvalt võiks eeldada NANOG2 valgu ekspresseerumist ja NANOG1 valgu ekspressiooni puudumist Caco2 rakkudes. Kasutades IF meetodikat, näidati antud tööga NANOG valgu ekspressiooni nii butüraadiga töödeldud kui töötlemata rakkudes ning sarnased tulemused saadi eelnevalt ka RT-PCR-ga. Kasutades wester blot analüüsi, näidati NANOG_SC_Gt antikehaga antud valgu ekspressiooni vaid Caco2 rakkudes, aga mitte hES rakkudes, mis viitab antud antikeha spetsiifilisusele erinevale valgu isovormile, kui seda on NANOG1, mis tõenäoliselt on NANOG2. Eelnevalt on kirjeleatud NANOG ekspressiooni jämesoolevähi rakkudes mRNA tasemel (Amini et al. 2014; Ishiguro et al. 2012; Jeter et al. 2009). Käesoleva töö käigus detekteeriti NANOG2 transkripti ekspressioon nii mõjutamata kui butüraadiga mõjutatud ning NANOGP8 ja NANOG1 esinemist neis rakkudes ei tuvastatud. NANOG1 ja NANOGP8 transkriptid olid samas tuvastatavad hES rakkudes. Vastupidiselt antud töös kasutatud Caco2

rakkudele, on varasemalt näidatud NANOGP8 ekspressiooni jämesoolevähi teistes kultuurides kui Caco2 (Ishiguro et al. 2012). Selle avaldatud töö praimereid kasutades on aga võimalik saada veebipõhise Praimer-Blast otsinguga hoopis teistsuguseid tulemusi kui autorid kirjeldavad. Tundub, et osades varasemates töödes pole olnud spetsiifiliste praimerite disainime edukas ilmselt järjestusandmete selleaegse vähesuse tõttu võrreldes praegusega.

Pluripotentsusega seotud markeritest uuriti valgu tasemel veel SSEA-3 ja SSEA-4. IF analüüsil oli märgatav mõningane SSEA-4 ekspressiooni suurenemine Caco2 rakkude töötlemisel butüraadiga. Sarnased tulemused esinesid ka üksikraku analüüsis läbivoolutsütomeetriaga, kus näidati SSEA-4 ekspressiooni suurenemist diferentseerumise käigus (Joonis 16). IF meetodiga ei õnnestunud tuvastada SSEA-3 ekspressiooni Caco2 rakkudes, kuna antud valku ekspresseerivate rakkude hulk on tõenäoliselt väga väike. Üksikraku tasemel, läbivoolutsütomeetrilise analüüsiga, näidati väikest populatsiooni rakke (erinevates korduskatsetes 1,6%-3,7%), mis ekspresseerisid SSEA-3. Sellise väikse SSEA-3 populatsiooni esinemine läheb üldjoontes kokku ka varem avaldatuga, kus on näidatud, et SSEA-3 ekspresseerivaid Caco2 rakke on ligikaudu 0,2% (Suzuki et al. 2013). Tundub aga, et SSEA-4 ekspressiooni pole eelnevalt Caco2 rakkudes vaadeldud ning selle ekspressiooni muutus rakkude diferentseerumise käigus tuvastati esmakordselt.

Pluripotentsusega seotud SOX2 transkriptsioonifaktori ekspressiooni analüüsiti vaid läbivoolutsütomeetria meetodikat kasutades, kus näidati selle ekspressiooni vähenemist Caco2 rakkudes butüraadiga diferentseerumise indutseerimisel. Siinkohal on huvitav väljatuu, üks jämesoolevähi kliiniline uuring, kus leiti, et SOX2 ekspressioon jämesoolevähis on kõrgem kui normaalses koes (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01589900>). Käesoleva magistr töö saadud tulemused, kus butüraat aitas kaasa SOX2 ekspressiooni vähenemisele Caco2 rakkudes, osutavad butüraadi olulisusele normaalsete soolerakkude alalhoiul ja vähkkasvaja tekke pidurdamisel ja sellised tulemused on heas kooskõlas varem avaldatuga (Encarnaçõ et al. 2015).

Eelnevate töödega on näidatud, et Caco2 rakkude diferentseerumisel ALPi ekspressioon suureneb (Mariadason et al. 2001), mis on teatud määral kooskõlas ka antud töö tulemustega, kus täheldati mõningast ekspressiooni suurenemist butüraadiga töödeldud rakkudes. Selle magistr töö raames kasutatud ALPi vastased antikehad ga näisid tunvat ära erinevaid sihtmärke või selle vorme ning lõplikku järeldust kahjuks selle tõttu teha ALPi ekspressiooni osas ei saa. IF meetodikaga tuvastatud ALPi lokaliseerumise muutus võib tuleneda erinevate vormide ekspresseerumisest erinevatel arengujärgudel. Nimelt võidakse vähkkasvajas re-ekspresseerida näiteks ALPi embrüonaalset vormi (Higashino et al. 1990).

Eelnevalt on näidatud küll OCT4 ja NANOG erinevate transkriptide ekspressiooni, kuid varasemalt polnud erinevate transkriptide esinemist iseloomustatud Caco2 rakkudes. Esmakordselt uuriti Caco2 rakkudes pluripotentsusega seotud markervalku SSEA-4. Saadud tulemusi tuleks võrrelda inimese jämesoolevähi kliinilise materjaliga ning tulemuste kattumisel oleks võimalik kasutada näiteks SSEA-4 ekspressiooni suurenemist kui vähkkasvaja formeerumise markerit. Käesolevas töös tuvastatud SOX2 ekspressiooni muutus Caco2 rakkude diferentseerumisel kinnitab juba eelnevalt kirjeldatud SOX2 olulisust jämesoole vähkkasvaja iseloomustamisel.

KOKKUVÕTE

Antud magistritöö näitas, et Caco2 rakkudes ekspresseeritakse pluripotentsusega seotud markereid, kusjuures tuvastati erinevused isovormide suhtes võrreldes hES rakkudega.

Butüraadiga Caco2 rakkudes diferentseerumise indutseerimisel tuvastati vähesel määral OCT4B1 transkripti ekspressioon, mis butüraadiga mõjutamata rakkudes puudus, kuid selle tulemuse kinnitamine vajab korduskatsete teostamist. See-eest detekteeriti mõjutamata rakkudes OCT4B transkripti ekspressioon, mis butüraadiga Caco2 rakkude mõjutamisel polnud enam detekteeritav. OCT4A transkript Caco2 rakkudes ei tuvastatud, samuti ei detekteeritud OCT4A valgu ekspressiooni IF meetodikal, kus kasutatud OCT4 vastane antikeha tunneb ära peamiselt OCT4A valgu isovormi. Lisaks kinnitas viimast ka western blot analüüs.

NANOG transkriptide uurimisel tuvastati nii butüraadiga mõjutatud kui mõjutamata Caco2 rakkudes NANOG2 transkripti ekspressioon, mida hES rakkudes ei tuvastatud. hES rakkudes ekspresseeriti NANOG1 transkripti. IF meetodiga tuvastati nii butüraadiga kui mõjutamata rakkudes NANOG valgu ekspressioon. Western blot analüüsil oli võimalik kasutada alternatiivse NANOG isovormi vastast antikeha, mis tuvastas ekspressiooni vaid Caco2 rakkudes ja üldist NANOG vastast antikeha, mis tuvastas ekspressiooni mõlemas rakuliinis (Caco2 ja hES H9), viidates sellele, et esimene NANOG vastane antikeha võiks ära tunda just NANOG2 valgu isovormi.

Pluripotentsusega seotud valkude SSEA-3 ja SSEA-4 uurimisel tuvastati SSEA-3 ekspressioon vaid läbivoolutsütomeetria meetodit kasutades, kus SSEA-3 ekspresseerivate rakkude hulk oli väga madal. SSEA-4 ekspressiooni tõusu butüraadiga diferentseerumise indutseerimisel tuvastati nii IF kui ka läbivoolutsütomeetria meetodit kasutades.

Diferentseerumismarker ALPi valguekspressiooni uurimisel detekteeriti western blot meetodit kasutades mõningane ekspressiooni suurenemine. ALPi valgu ekspressiooni analüüsimisel kasutades IF meetodit tuvastati antud valgu lokalisatsiooni muutus, mis võib viidata erinevatele ALPi vormidele, mida ekspresseeritakse erinevatel arengujärgudel. Kahjuks esines küsitavusi kasutatud ALPi vastaste antikehade spetsiifilisuses ja seetõttu oli raskendatud antud markeri ekspressiooni uurimine ja lõplike järelduste tegemine.

Antud magistritöö lisas teadmisi jämesoolevähi rakuliini Caco2 edukaks kasutamiseks teadustöös ja töö tulemused osutavad, et pluripotentsusega seotud markerite OCT4, SOX2 ja SSEA-4 ekspressiooni saaks kasutada jämesoolevähkkasvaja diagnoosimisel ja pärast tuleviku kliiniliste uuringute tulemusi arvestades ehk ka haiguse prognoosi määramisel.

Lisaks viitavad antud töö tulemused butüraadi olulisusele jämesoole vähkasvajate preventatiivses ravis soodustades vähirakkude diferentseerumist.

SUMMARY

This Master's thesis showed that in Caco2 cells the pluripotency markers are expressed, but also detected differences between the particular isoforms when compared between the Caco2 and human embryonic stem cells (hES cells).

During the differentiation of Caco2 cells with butyrate treatment the expression of OCT4B1 transcript was detected, while without treatment the transcript was not detected. To confirm these results, further tests need to be carried out. However, in non-treated cells, the expression of OCT4B transcript was detected, while it was undetectable in Caco2 cells after treatment with butyrate. OCT4A transcript expression was not detected in Caco2 cells and the expression of OCT4A protein was also not identified using immunofluorescence assay (IFA) together with western blot analysis. Analysing NANOG transcripts, it was detected that the butyrate treated and non-treated Caco2 cells expressed NANOG2 transcript, which was not detected in hES cells. hES cells expressed NANOG1 transcript. IFA showed NANOG protein expression in butyrate treated and non-treated cells. Western blot analysis was performed with an antibody specific for alternative NANOG isoform, which detected expression only in Caco2 cells and with a general anti-NANOG antibody, which detected expression in both cell-lines (Caco2 and hES H9). These results imply that this alternative NANOG specific antibody could recognize the NANOG2 protein isoform.

During investigation of pluripotency marker proteins SSEA-3 and SSEA-4, the expression of SSEA-3 was detected only by using flow cytometry, as the amount of cells expressing SSEA-3 was very low. When differentiation was induced by butyrate treatment, an increase in SSEA-4 expression was detected both by IFA and flow cytometry method.

Western blot analysis of differentiation marker ALPi protein expression showed tendency towards increased expression after butyrate treatment. IFA showed ALPi protein to be expressed in different cellular compartments depending on the butyrate treatment. This could be a hint of different forms of ALPi, which can be expressed in different stages of development and mirrored in cells with different differentiation level. Unfortunately, there were problems with specificity of anti-ALPi antibodies and because of that, studying the expression of this marker and making conclusions of it was complicated.

This master's thesis added knowledge to successfully use the colorectal cancer cell line Caco2 in research and the results of this thesis point out that pluripotency markers OCT4, SOX2 and SSEA-4 could be used to characterize the colorectal cancer and hopefully in the

future, also help to determine prognosis and diagnosis. In addition, the results of this thesis imply to the importance of the butyrate in preventive treatment of colorectal cancer.

TÄNUAVALDUSED

Suurimad tänud kuuluvad mu juhendajale, Martin Pookile. Samuti tänan rakubioloogia õppetoolist Indrek Teinot, kes aitas nõu ja jõuga antud töö valmimisel. Lisaks tänan koostöö laboratooriumipoolseid juhendajaid Aleksandr Klepininit ja Ljudmila Õunpuud Keemilise ja Bioloogilise Füüsika Instituudi bioenergeetika laboratooriumist. Suured tänud kuuluvad ka perele ja sõpradele, kes olid toeks käesoleva magistritöö valmimisele.

KIRJADUSE LOETELU

- Alison, M. R. and S. Islam. 2009. "Attributes of Adult Stem Cells." *The Journal of Pathology* 217(2):144–60. Retrieved (papers3://publication/doi/10.1002/path.2498).
- Alonso, Marta M. et al. 2011. "Genetic and Epigenetic Modifications of Sox2 Contribute to the Invasive Phenotype of Malignant Gliomas." *PLoS ONE* 6(10).
- Ambady, Sakthikumar et al. 2011. "Expression of NANOG and NANOGP8 in a Variety of Undifferentiated and Differentiated Human Cells." *International Journal of Developmental Biology* 54(11–12):1743–54.
- Amini, Sabrieh, Fardin Fathi, Jafar Mobalegi, Heshmatollah Sofimajidpour, and Tayyeb Ghadimi. 2014. "The Expressions of Stem Cell Markers: Oct4, Nanog, Sox2, Nucleostemin, Bmi, Zfx, Tcl1, Tbx3, Dppa4, and Esrrb in Bladder, Colon, and Prostate Cancer, and Certain Cancer Cell Lines." *Anatomy & Cell Biology*.
- Antonarakis, S. E. and M. Krawczak. 2002. "The Genetic Basis of Human Cancer - Bert Vogelstein, Kenneth W. Kinzler - Google Books." ... *Genetic Basis of Human ...* Retrieved (<http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=pYG09OPbXp0C&oi=fnd&pg=PA7&dq=The+nature+and+mechanisms+of+human+gene+mutation&ots=iueCh3sXR9&sig=HRuarbRVt0QvLNx53VTFi74jlp5%5Cnpapers2://publication/uuid/B35699C4-8589-4884-A6B8-4A8388221085>).
- Aran, Veronica, Ana Paula Victorino, Luiz Claudio Thuler, and Carlos Gil Ferreira. 2016. "Colorectal Cancer: Epidemiology, Disease Mechanisms and Interventions to Reduce Onset and Mortality." *Clinical Colorectal Cancer* 15(3):195–203.
- Asadi, Malek H. et al. 2011. "OCT4B1, a Novel Spliced Variant of OCT4, Is Highly Expressed in Gastric Cancer and Acts as an Antiapoptotic Factor." *International Journal of Cancer*.
- Atlasi, Yaser, Seyed J. Mowla, Seyed A. M. Ziaee, Paul J. Gokhale, and Peter W. Andrews. 2008. "OCT4 Spliced Variants Are Differentially Expressed in Human Pluripotent and Nonpluripotent Cells." *STEM CELLS* 26(12):3068–74. Retrieved (<http://doi.wiley.com/10.1634/stemcells.2008-0530>).
- Avery, S., K. Inniss, and H. Moore. 2006. "The Regulation of Self-Renewal in Human Embryonic Stem Cells." *Stem Cells Dev* 15(5):729–40.

- Avilion, Ariel A. et al. 2003. "Multipotent Cell Lineages in Early Mouse Development Depend on SOX2 Function." *Genes and Development* 17(1):126–40.
- Bani-Yaghoub, M. et al. 2006. "Role of Sox2 in the Development of the Mouse Neocortex." *Developmental Biology* 295:52–66.
- Barker, Nick et al. 2007. "Identification of Stem Cells in Small Intestine and Colon by Marker Gene Lgr5." *Nature*.
- Bass, Adam J. et al. 2009. "SOX2 Is an Amplified Lineage-Survival Oncogene in Lung and Esophageal Squamous Cell Carcinomas." *Nature Genetics* 41(11):1238–42.
- Blenkinsopp, W. K., S. Stewart-Brown, L. Blesovsky, G. Kearney, and L. P. Fielding. 1981. "Histopathology Reporting in Large Bowel Cancer." *Journal of Clinical Pathology* 34(5):509–13. Retrieved (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=493334&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Booth, H. Anne F. and Peter W. H. Holland. 2004. "Eleven Daughters of NANOG." *Genomics* 84(2):229–38.
- Boyer, Laurie A. et al. 2005. "Core Transcriptional Regulatory Circuitry in Human Embryonic Stem Cells." *Cell* 122:947–56.
- van Breemen, Richard B. and Yongmei Li. 2005. "Caco-2 Cell Permeability Assays to Measure Drug Absorption." *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*.
- Brinster, R. L. 1974. "The Effect of Cells Transferred into the Mouse Blastocyst on Subsequent Development." *The Journal of Experimental Medicine* 140(4):1049–56. Retrieved (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2139639&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Brons, I. Gabrielle M. et al. 2007. "Derivation of Pluripotent Epiblast Stem Cells from Mammalian Embryos." *Nature* 448(7150):191–95.
- Campbell, Pearl A., Carolina Perez-Iratxeta, Miguel A. Andrade-Navarro, and Micheal A. Rudnicki. 2007. "Oct4 Targets Regulatory Nodes to Modulate Stem Cell Function." *PLoS ONE* 2(6).
- Canani, Roberto Berni et al. 2011. "Potential Beneficial Effects of Butyrate in Intestinal and Extraintestinal Diseases." *World Journal of Gastroenterology* 17(12):1519–28.

- Care, IQWiG (Institute for Quality and Efficiency in Health. 2017. “Colorectal Cancer: Overview.” Retrieved (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0072382/>).
- Castor, Anders et al. 2005. “Distinct Patterns of Hematopoietic Stem Cell Involvement in Acute Lymphoblastic Leukemia.” *Nature Medicine* 11(6):630–37.
- Cauffman, G., H. Van de Velde, I. Liebaers, and A. Van Steirteghem. 2005. “Oct-4 MRNA and Protein Expression during Human Preimplantation Development.” *Molecular Human Reproduction* 11(3):173–81.
- Cauffman, Greet, Inge Liebaers, André Van Steirteghem, and Hilde Van de Velde. 2006. “POU5F1 Isoforms Show Different Expression Patterns in Human Embryonic Stem Cells and Preimplantation Embryos.” *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 24(12):2685–91. Retrieved (<http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=16916925&retmode=ref&cmd=prlinks%5Cnpapers2://publication/doi/10.1634/stemcells.2005-0611>).
- Chagastelles, Pedro C. and Nance B. Nardi. 2011. “Biology of Stem Cells: An Overview.” *Kidney International Supplements* 1(3):63–67.
- Chambers, Ian et al. 2003. “Functional Expression Cloning of Nanog, a Pluripotency Sustaining Factor in Embryonic Stem Cells.” *Cell* 113(5):643–55.
- Chang, W. W. et al. 2008. “Expression of Globo H and SSEA3 in Breast Cancer Stem Cells and the Involvement of Fucosyl Transferases 1 and 2 in Globo H Synthesis.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(33):11667–72. Retrieved (<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0804979105>).
- Chen, W. S. et al. 1997. “Microsatellite Instability in Sporadic-Colon-Cancer Patients with and without Liver Metastases.” *International Journal of Cancer Journal International Du Cancer* 74(4):470–74. Retrieved (<papers://5aefcca-9729-4def-92fe-c46e5cd7cc81/Paper/p113463>).
- Chen, Yansu et al. 2016. “SOX2 Inhibits Metastasis in Gastric Cancer.” *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 142(6):1221–30.
- Cheng, Hazel and C. P. Leblond. 1974. “Origin, Differentiation and Renewal of the Four Main Epithelial Cell Types in the Mouse Small Intestine I. Columnar Cell.” *American Journal of Anatomy* 141(4):461–79.
- Chew, J. L. et al. 2005. “Reciprocal Transcriptional Regulation of Pou5f1 and Sox2 via the

- Oct4/Sox2 Complex in Embryonic Stem Cells.” *Molecular and Cellular Biology* 25(14):6031–46. Retrieved (<http://mcb.asm.org/cgi/doi/10.1128/MCB.25.14.6031-6046.2005>).
- Clarke, Michael F. and Margaret Fuller. 2006. “Stem Cells and Cancer: Two Faces of Eve.” *Cell* 124(6):1111–15.
- Coussens, L. M. and Z. Werb. 2002. “Inflammation and Cancer.” *Nature* 420(6917):860–67. Retrieved (<http://www.scopus.com/record/display.url?eid=2-s2.0-0037180757&origin=inward&txGid=nrzrWhg2oR6fypyvyqK169:76>).
- Cushing, Kelly, David M. Alvarado, and Matthew A. Ciorba. 2015. “Butyrate and Mucosal Inflammation: New Scientific Evidence Supports Clinical Observation.” *Clinical and Translational Gastroenterology* 6(8).
- Dai, Xinzheng, Jing Ge, Xuehao Wang, Xiaofeng Qian, and Xiangcheng Li. 2013. “OCT4 Regulates Epithelial-Mesenchymal Transition and Its Knockdown Inhibits Colorectal Cancer Cell Migration and Invasion.” *Oncology Reports* 29(1):155–60.
- Damjanov, Ivan and Davor Solter. 1974. “Experimental Teratoma.” *Curr. Top. Pathol.* 59:69–130.
- Dean, Michael, Tito Fojo, and Susan Bates. 2005. “Tumour Stem Cells and Drug Resistance.” *Nature Reviews Cancer* 5(4):275–84.
- Donohoe, Dallas R. et al. 2012. “The Warburg Effect Dictates the Mechanism of Butyrate-Mediated Histone Acetylation and Cell Proliferation.” *Molecular Cell* 48(4):612–26.
- Dragu, Denisa L., Laura G. Necula, Coralia Bleotu, Carmen C. Diaconu, and Mihaela Chivu-Economescu. 2015. “Therapies Targeting Cancer Stem Cells: Current Trends and Future Challenges.” *World Journal of Stem Cells* 7(9):1185–1201. Retrieved (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4620424&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Le Du, Marie-Hélène and Jose Luis Millan. 2002. “Structural Evidence of Functional Divergence in Human Alkaline Phosphatases.” *The Journal of Biological Chemistry* 277(51):49808–14. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12372831>).
- Duvic, M. and C. Zhang. 2006. “Clinical and Laboratory Experience of Vorinostat (Suberoylanilide Hydroxamic Acid) in the Treatment of Cutaneous T-Cell Lymphoma.” *British Journal of Cancer* 95:S13–19.

- Dzierzewicz, Zofia, Arkadiusz Orchel, Ludmila Weglarz, Malgorzata Latocha, and Tadeusz Wilczok. 2002. "Changes in the Cellular Behaviour of Human Colonic Cell Line Caco-2 in Response to Butyrate Treatment." *Acta Biochimica Polonica* 49(1/2002):211–20.
- Eberle, Irina, Birgit Pless, Miriam Braun, Theo Dingermann, and Rolf Marschalek. 2010. "Transcriptional Properties of Human NANOG1 and NANOG2 in Acute Leukemic Cells." *Nucleic Acids Research* 38(16):5384–95.
- Encarnação, J. C., A. M. Abrantes, A. S. Pires, and M. F. Botelho. 2015. "Revisit Dietary Fiber on Colorectal Cancer: Butyrate and Its Role on Prevention and Treatment." *Cancer and Metastasis Reviews*.
- Engle, M. J., G. S. Goetz, and D. H. Alpers. 1998. "Caco-2 Cells Express a Combination of Colonocyte and Enterocyte Phenotypes." *Journal of Cellular Physiology* 174(3):362–69.
- Epstein, E., Frederick L. Kiechle, J. D. Artiss, and B. Zak. 1986. "The Clinical Use of Alkaline Phosphatase Enzymes." *Clinics in Laboratory Medicine* 6(3):491–505.
- Erdogan, Serpil et al. 2016. "Inflammation and Chemerin in Colorectal Cancer." *Tumor Biology* 37(5):6337–42.
- Evans, M. J. and M. H. Kaufman. 1981. "Establishment in Culture of Pluripotential Cells from Mouse Embryos." *Nature* 292(5819):154–56.
- Fawley, Jason and David M. Gourlay. 2016. "Intestinal Alkaline Phosphatase: A Summary of Its Role in Clinical Disease." *Journal of Surgical Research* 202(1):225–34.
- Fenderson, B. A., M. P. De Miguel, A. D. Pyle, and P. J. Donovan. 2006. "Staining Embryonic Stem Cells Using Monoclonal Antibodies to Stage-Specific Embryonic Antigens." *Methods Mol Biol* 325:207–24. Retrieved (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16761728).
- Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. 2014. "GLOBOCAN 2012 v1.1, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11."
- Ferlay, J. et al. 2013. "Cancer Incidence and Mortality Patterns in Europe: Estimates for 40 Countries in 2012." *European Journal of Cancer* 49(6):1374–1403.
- Ferruzza, Simonetta, Carlotta Rossi, Maria Laura Scarino, and Yula Sambuy. n.d. "A Protocol for Differentiation of Human Intestinal Caco-2 Cells in Asymmetric Serum-Containing

- Medium.” *Toxicology in Vitro*.
- Fishman, William H. et al. 1968. “Immunology and Biochemistry of Regan Isoenzyme of Alkaline Phosphatase in Human Cancer.” *Nature* 219(5155):697–99.
- Fleming, Matthew, Sreelakshmi Ravula, Sergei F. Tatishchev, and Hanlin L. Wang. 2012. “Colorectal Carcinoma: Pathologic Aspects.” *Journal of Gastrointestinal Oncology* 3(3):153–73.
- van der Flier, Laurens G. and Hans Clevers. 2009. “Stem Cells, Self-Renewal, and Differentiation in the Intestinal Epithelium.” *Annual Review of Physiology*.
- Friedman, N. and R. Moore. 1946. “Tumors of the Testis; a Report on 922 Cases.” *Mil. Surg* 99:573–93.
- Gazouli, Maria et al. 2012. “OCT4 Spliced Variant OCT4B1 Is Expressed in Human Colorectal Cancer.” *Molecular Carcinogenesis* 51(2):165–73.
- Ghoncheh, Mahshid, Maryam Mohammadian, Abdollah Mohammadian-Hafshejani, and Hamid Salehiniya. 2016. “The Incidence and Mortality of Colorectal Cancer and Its Relationship With the Human Development Index in Asia.” *Annals of Global Health* 82(5):726–37.
- Glozak, Michele A., Nilanjan Sengupta, Xiaohong Zhang, and Edward Seto. 2005. “Acetylation and Deacetylation of Non-Histone Proteins.” *Gene* 363(1–2):15–23.
- Guan, Xiangming. 2015. “Cancer Metastases: Challenges and Opportunities.” *Acta Pharmaceutica Sinica B* 5(5):402–18.
- Gui, C. Y., L. Ngo, W. S. Xu, V. M. Richon, and P. A. Marks. 2004. “Histone Deacetylase (HDAC) Inhibitor Activation of P21WAF1 Involves Changes in Promoter-Associated Proteins, Including HDAC1.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101(5):1241–46. Retrieved (<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0307708100>).
- Guillaudeux, T., MG Mattei, D. Depetris, and Et Al. 1993. “In Situ Hybridization Localizes the Human OTF3 to Chromosome 6p21.3-P22 and OTF3L to 12p13.” *Cytogenet Cell Genet* 63:212–14.
- Guo, Wei, Joseph L. Lasky, and Hong Wu. 2006. “Cancer Stem Cells.” *Pediatric Research* 59(4 PART. 2).
- Hadjimichael, Christiana et al. 2015. “Common Stemness Regulators of Embryonic and

- Cancer Stem Cells.” *World Journal of Stem Cells* 7(9):1150–84. Retrieved (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4620423&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Haggar, Fatima A. and Robin P. Boushey. 2009. “Colorectal Cancer Epidemiology: Incidence, Mortality, Survival, and Risk Factors.” *Clinics in Colon and Rectal Surgery* 22(4):191–97.
- Hagland, Hanne R. and Kjetil Søreide. 2015. “Cellular Metabolism in Colorectal Carcinogenesis: Influence of Lifestyle, Gut Microbiome and Metabolic Pathways.” *Cancer Letters* 356(2):273–80.
- Harris, H. 1986. “The Harvey Lectures: Series 76.” *New York: Academic* 95–123.
- Hay, David C., Linda Sutherland, John Clark, and Tom Burdon. 2004. “Oct-4 Knockdown Induces Similar Patterns of Endoderm and Trophoblast Differentiation Markers in Human and Mouse Embryonic Stem Cells.” *Stem Cells* 22(2):225–35. Retrieved (<http://doi.wiley.com/10.1634/stemcells.22-2-225>).
- Henderson, J. K. et al. 2002. “Preimplantation Human Embryos and Embryonic Stem Cells Show Comparable Expression of Stage-Specific Embryonic Antigens.” *Stem Cells* 20(4):329–37. Retrieved (<http://doi.wiley.com/10.1634/stemcells.20-4-329>).
- Heron, Melonie. 2016. “Deaths: Leading Causes for 2014.” *National Vital Statistics Reports : From the Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Health Statistics, National Vital Statistics System* 65(5):1–96. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27376998>).
- Higashino, Kazuya et al. 1990. “Purification and Some Properties of the Fast Migrating Alkaline Phosphatase in FL-Amnion Cells (the Kasahara Isoenzyme) and Its CDNA Cloning.” *Clinica Chimica Acta* 186(2):151–64.
- Hofmann, MC, W. Jeltsch, J. Brecher, and H. Walt. 1989. “Alkaline Phosphatase Isozymes in Human Testicular Germ Cell Tumors, Precancerous Stage, and Three Related Cell Lines.” *Cancer Research* 49.
- Huet, C., C. Sahuquillo-Merino, E. Coudrier, and D. Louvard. 1987. “Absorptive and Mucus-Secreting Subclones Isolated from a Multipotent Intestinal Cell Line (HT-29) Provide New Models for Cell Polarity and Terminal Differentiation.” *Journal of Cell Biology* 105(1):345–57.

- Humphries, Adam and Nicholas A. Wright. 2008. "Colonic Crypt Organization and Tumorigenesis." *Nature Reviews Cancer* 8(6):415–24.
- Ibrahim, Elsayed E. et al. 2012. "Embryonic NANOG Activity Defines Colorectal Cancer Stem Cells and Modulates through AP1- and TCF-Dependent Mechanisms." *Stem Cells* 30(10):2076–87.
- Ishiguro, Tatsuya et al. 2012. "Differential Expression of Nanog1 and Nanogp8 in Colon Cancer Cells." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 418(2):199–204.
- Islam, Farhadul, Vinod Gopalan, Riajul Wahab, Robert A. Smith, and Alfred K. Y. Lam. 2015. "Cancer Stem Cells in Oesophageal Squamous Cell Carcinoma: Identification, Prognostic and Treatment Perspectives." *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 96(1):9–19.
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. 2011. "Global Cancer Statistics." *Cancer J Clin* 61:69–90.
- Jeter, C. R. et al. 2011. "NANOG Promotes Cancer Stem Cell Characteristics and Prostate Cancer Resistance to Androgen Deprivation." *Oncogene* 30(36):3833–45.
- Jeter, Collene R. et al. 2009. "Functional Evidence That the Self-Renewal Gene *NANOG* Regulates Human Tumor Development." *Stem Cells* 27(5):993–1005. Retrieved (<http://doi.wiley.com/10.1002/stem.29>).
- Kannagi, R. et al. 1983. "New Globoseries Glycosphingolipids in Human Teratocarcinoma Reactive with the Monoclonal Antibody Directed to a Developmentally Regulated Antigen, Stage-Specific Embryonic Antigen 3." *Journal of Biological Chemistry* 258(14):8934–42.
- Kannagi, R. et al. 1983. "Stage-Specific Embryonic Antigens (SSEA-3 and -4) Are Epitopes of a Unique Globo-Series Ganglioside Isolated from Human Teratocarcinoma Cells." *The EMBO Journal* 2(12):2355–61. Retrieved (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=555457&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Kannagi, Reiji. 1997. "Carbohydrate-Mediated Cell Adhesion Involved in Hematogenous Metastasis of Cancer." *Glycoconjugate Journal* 14(5):577–84.
- Kinzler, K. W. and B. Vogelstein. 2002. "Colorectal Tumors." Pp. 583–612 in *The genetic basis of human cancer*.

- Komoda, Tsugikazu and Yoshikatsu Sakagishi. 1978. "The Function of Carbohydrate Moiety and Alteration of Carbohydrate Composition in Human Alkaline Phosphatase Isoenzymes." *BBA - Enzymology* 523(2):395–406.
- Kopp, Janel L., Briana D. Ormsbee, Michelle Desler, and Angie Rizzino. 2008. "Small Increases in the Level of Sox2 Trigger the Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells." *Stem Cells* 26(4):903–11. Retrieved (<http://doi.wiley.com/10.1634/stemcells.2007-0951>).
- Kreso, Antonija and John E. Dick. 2014. "Evolution of the Cancer Stem Cell Model." *Cell Stem Cell* 14(3):275–91.
- Krishnan, B. Rajendra, Isabela Jamry, and David D. Chaplin. 1995. "Feature Mapping of the HLA Class I Region: Localization of the POU5F1 and TCF19 Genes." *Genomics* 30(1):53–58.
- Kuipers, Ernst J. et al. 2015. "Colorectal Cancer." *Nature Reviews Disease Primers* 1.
- Lallès, Jean-Paul. 2014. "Intestinal Alkaline Phosphatase: Novel Functions and Protective Effects." *Nutrition Reviews* 72(2):82–94. Retrieved (<https://academic.oup.com/nutritionreviews/article-lookup/doi/10.1111/nure.12082>).
- Lallès, Jean Paul. 2010. "Intestinal Alkaline Phosphatase: Multiple Biological Roles in Maintenance of Intestinal Homeostasis and Modulation by Diet." *Nutrition Reviews* 68(6):323–32.
- Lange, P. H. et al. 1982. "Placental Alkaline Phosphatase as a Tumor Marker for Seminoma." *Cancer Research* 42(8):3244–47. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7093962>).
- Lea, Tor. 2015. "Caco-2 Cell Line." *The Impact of Food Bioactives on Health* 103–11. Retrieved (http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-16104-4_10).
- Lee, Jungwoon, Hye Kyoung Kim, Jeung Yon Rho, Yong Mahn Han, and Jungho Kim. 2006. "The Human OCT-4 Isoforms Differ in Their Ability to Confer Self-Renewal." *Journal of Biological Chemistry* 281(44):33554–65.
- Lee, M. et al. 2012. "Prognostic Impact of the Cancer Stem Cell-Related Marker NANOG in Ovarian Serous Carcinoma." *International Journal of Gynecological Cancer* 22(9).
- Lengner, Christopher J. et al. 2007. "Oct4 Expression Is Not Required for Mouse Somatic Stem Cell Self-Renewal." *Cell Stem Cell* 1(4):403–15.

- Lobo, N. a, Y. Shimono, D. Qian, and M. F. Clarke. 2007. "The Biology of Cancer Stem Cells." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 23:675–99. Retrieved (<papers://4a2a0975-c75d-46d6-a805-07ce5ecc7f39/Paper/p569>).
- Longley, D. B. and P. G. Johnston. 2005. "Molecular Mechanisms of Drug Resistance." *The Journal of Pathology* 205(2):275–92. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15641020>).
- Lorthongpanich, Chanchao, Shang Hsun Yang, Karolina Piotrowska-Nitsche, Rangsun Parnpai, and Anthony W. S. Chan. 2008. "Development of Single Mouse Blastomeres into Blastocysts, Outgrowths and the Establishment of Embryonic Stem Cells." *Reproduction* 135(6):805–13.
- Lou, Y. W. et al. 2014. "Stage-Specific Embryonic Antigen-4 as a Potential Therapeutic Target in Glioblastoma Multiforme and Other Cancers." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111(7):2482–87. Retrieved (<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1400283111>).
- Lu, Yun et al. 2010. "Evidence That SOX2 Overexpression Is Oncogenic in the Lung." *PLoS ONE* 5(6).
- Mai, Antonello et al. 2005. "Histone Deacetylation in Epigenetics: An Attractive Target for Anticancer Therapy." *Medicinal Research Reviews* 25(3):261–309.
- Mariadason, John M., Anna Velcich, Andrew J. Wilson, Leonard H. Augenlicht, and Peter R. Gibson. 2001. "Resistance to Butyrate-Induced Cell Differentiation and Apoptosis during Spontaneous Caco-2 Cell Differentiation." *Gastroenterology* 120(4):889–99.
- Marks, Paul A. and Milos Dokmanovic. 2005. "Histone Deacetylase Inhibitors: Discovery and Development as Anticancer Agents." *Expert Opinion on Investigational Drugs* 14(12):1497–1511. Retrieved (<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/13543784.14.12.1497>).
- Martin, G. R. 1981. "Isolation of a Pluripotent Cell Line from Early Mouse Embryos Cultured in Medium Conditioned by Teratocarcinoma Stem Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 78(12):7634–38. Retrieved (<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.78.12.7634>).
- Martínez-Maqueda, Daniel, Beatriz Miralles, and Isidra Recio. 2015. "HT29 Cell Line." Pp. 113–24 in *The Impact of Food Bioactives on Health: In Vitro and Ex Vivo Models*.

- Matin, Maryam M. et al. 2004. "Specific Knockdown of Oct4 and Beta2-Microglobulin Expression by RNA Interference in Human Embryonic Stem Cells and Embryonic Carcinoma Cells." *Stem Cells* 22(5):659–68.
- McComb, Robert B., George N. Jr Bowers, and Solomon Posen. 1979. "Alkaline Phosphatase." Pp. 633–2322 in *Alkaline Phosphatase*, vol. Suppl 116. Retrieved (http://www.drkaslow.com/html/alkaline_phosphatase.html).
- Medema, Jan Paul and Louis Vermeulen. 2011. "Microenvironmental Regulation of Stem Cells in Intestinal Homeostasis and Cancer." *Nature*.
- Meng, Hui Min et al. 2010. "Overexpression of Nanog Predicts Tumor Progression and Poor Prognosis in Colorectal Cancer." *Cancer Biology and Therapy* 9(4):295–302.
- Meunier, V., M. Bourrie, Y. Berger, and G. Fabre. 1995. "The Human Intestinal Epithelial Cell Line Caco-2; Pharmacological and Pharmacokinetic Applications." *Cell Biology and Toxicology* 11(3–4):187–94.
- Mezoff, E. and N. Shroyer. 2015. "Anatomy and Physiology of the Small and Large Intestines." Pp. 345–59 in *Pediatric Gastrointestinal and Liver Disease*.
- Millán, J. L. and T. Manes. 1988. "Seminoma-Derived Nagao Isozyme Is Encoded by a Germ-Cell Alkaline Phosphatase Gene." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85(9):3024–28. Retrieved (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=280135&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Mouradov, Dmitri et al. 2014. "Colorectal Cancer Cell Lines Are Representative Models of the Main Molecular Subtypes of Primary Cancer." *Cancer Research* 74(12):3238–47.
- Munro, Matthew J., AC Wickremesekera, and et al Davis, PF. 2017. "Renin-Angiotensin System and Cancer: A Review." *Integr Cancer Sci Ther* 4:1–6.
- Munro, Matthew J., Susrutha K. Wickremesekera, Lifeng Peng, Swee T. Tan, and Tinte Itinteang. 2017. "Cancer Stem Cells in Colorectal Cancer: A Review." *Journal of Clinical Pathology* jclinpath-2017-204739. Retrieved (<http://jcp.bmj.com/lookup/doi/10.1136/jclinpath-2017-204739>).
- Nagata, Takuya et al. 2014. "Prognostic Significance of NANOG and KLF4 for Breast Cancer." *Breast Cancer* 21(1):96–101.
- Natoli, Manuela, Bruno D. Leoni, Igea D'Agnano, Flavia Zucco, and Armando Felsani. 2012.

- “Good Caco-2 Cell Culture Practices.” *Toxicology in Vitro*.
- Neumann, Jens et al. 2011. “SOX2 Expression Correlates with Lymph-Node Metastases and Distant Spread in Right-Sided Colon Cancer.” *BMC Cancer* 11.
- Nichols, Jennifer et al. 1998. “Formation of Pluripotent Stem Cells in the Mammalian Embryo Depends on the POU Transcription Factor Oct4.” *Cell* 95(3):379–91.
- Niwa, H., J. Miyazaki, and AG Smith. 2000. “Quantitative Expression of Oct-3/4 Defines Differentiation, Dedifferentiation or Self-Renewal of ES Cells.” *Nature Genetics* 24:372–76.
- O’Connor, Michael L. et al. 2014. “Cancer Stem Cells: A Contentious Hypothesis Now Moving Forward.” *Cancer Letters* 344(2):180–87.
- Oh, Jong-Hyun et al. 2005. “Identification of a Putative Transactivation Domain in Human Nanog.” *Experimental & Molecular Medicine* 37(3):250–54. Retrieved (<http://www.nature.com/doi/10.1038/emm.2005.33>).
- Orchel, Arkadiusz, Zofia Dzierzewicz, Beata Parfiniewicz, Ludmiła Weęlarz, and Tadeusz Wilczok. 2005. “Butyrate-Induced Differentiation of Colon Cancer Cells Is PKC and JNK Dependent.” *Digestive Diseases and Sciences* 50(3):490–98.
- Ouellette, Andre J., Donald P. Satchell, Matthew M. Hsieh, Susan J. Hagen, and Michael E. Selsted. 2000. “Characterization of Luminal Paneth Cell α -Defensins in Mouse Small Intestine: Attenuated Antimicrobial Activities of Peptides with Truncated Amino Termini.” *Journal of Biological Chemistry* 275(43):33969–73.
- Pan, Guangjin and James A. Thomson. 2007. “Nanog and Transcriptional Networks in Embryonic Stem Cell Pluripotency.” *Cell Research* 17(1):42–49.
- Peng, Luying, Zhenjuan He, Wei Chen, Ian R. Holzman, and Jing Lin. 2007. “Effects of Butyrate on Intestinal Barrier Function in a Caco-2 Cell Monolayer Model of Intestinal Barrier.” *Pediatric Research* 61(1):37–41.
- Perrine, Susan P. et al. 2007. “A Phase 1/2 Trial of Arginine Butyrate and Ganciclovir in Patients with Epstein-Barr Virus-Associated Lymphoid Malignancies.” *Blood* 109(6):2571–78.
- Potten, C. S., C. Booth, and D. M. Pritchard. 1997. “The Intestinal Epithelial Stem Cell: The Mucosal Governor.” *International Journal of Experimental Pathology* 78(4):219–43. Retrieved

(<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2694540&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).

- Poursani, E. M., M. Mehravar, B. M. Soltani, and S. J. Mowla. 2017. "Novel Variant of OCT4B4 Is Differentially Expressed in Human Embryonic Stem and Embryonic Carcinoma Cells." *Gene* 627.
- Poursani, Ensieh M., Majid Mehravar, Bahram Mohammad Soltani, Seyed Javad Mowla, and James E. Trosko. 2017. "A Novel Variant of OCT4 Entitled OCT4B3 Is Expressed in Human Bladder Cancer and Astrocytoma Cell Lines." *Avicenna Journal of Medical Biotechnology* 9(3):142–45.
- Poursani, Ensieh M., Majid Mehravar, Bahram Mohammad Soltani, and Seyed Javad Mowla. 2017. "OCT4B2, a Novel Alternative Spliced Variant of OCT4, Is Significantly Upregulated under Heat-Stress Condition and Downregulated in Differentiated Cells." *Tumor Biology* 39(10):1–8.
- Rao, A.L., Sankar, G. G. 2009. "Caco-2 Cells: An Overview." *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Health Care* 1(2):260–75. Retrieved (<http://jprhc.in/index.php/ajprhc/article/view/70>).
- Ricci-Vitiani, L., E. Fabrizio, E. Palio, and R. De Maria. 2009. "Colon Cancer Stem Cells." *J. Mol. Med.* 87(11):1097–1104. Retrieved (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19727638).
- Ricci-Vitiani, Lucia et al. 2007. "Identification and Expansion of Human Colon-Cancer-Initiating Cells." *Nature* 445(7123):111–15.
- Ricci-Vitiani, Lucia, Eros Fabrizio, Elisabetta Palio, and Ruggero De Maria. 2009. "Colon Cancer Stem Cells." *Journal of Molecular Medicine* 87(11):1097–1104.
- Rodan, GA and SB Rodan. 1984. "Advances in Bone and Mineral Research Annual II." *Amsterdam: Excerpta Medica*.
- Rosato, R. .. and S. Grant. 2004. "Histone Deacetylase Inhibitors in Clinical Development." *Expert Opinion on Investigational Drugs* 13:21–38.
- Rudin, Charles M. et al. 2012. "Comprehensive Genomic Analysis Identifies SOX2 as a Frequently Amplified Gene in Small-Cell Lung Cancer." *Nature Genetics* 44(10):1111–16.

- Sadeghirizi, Akram and Razieh Yazdanparast. 2007. "Plasma Membrane Homing of Tissue Nonspecific Alkaline Phosphatase under the Influence of 3-Hydrogenkwadaphnin, an Antiproliferative Agent from *Dendrostellera Lessertii*." *Acta Biochimica Polonica* 54(2):323–29.
- Schiele, F., M. Vincent-Viry, B. Fournier, M. Starck, and G. Siest. 1998. "Biological Effects of Eleven Combined Oral Contraceptives on Serum Triglycerides, Gamma-Glutamyltransferase, Alkaline Phosphatase, Bilirubin and Other Biochemical Variables." *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 36(11):871–78.
- Schmohl, Jörg U. and Daniel A. Vallera. 2016. "CD133, Selectively Targeting the Root of Cancer." *Toxins* 8(6).
- Schöler, H. R., S. Ruppert, N. Suzuki, K. Chowdhury, and P. Gruss. 1990. "New Type of POU Domain in Germ Line-Specific Protein Oct-4." *Nature* 344:435–39.
- Sharma, Ujjawal, Deeksha Pal, and Rajendra Prasad. 2014. "Alkaline Phosphatase: An Overview." *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 29(3):269–78.
- Shevinsky, Lynne Hamburger, Barbara B. Knowles, Ivan Damjanov, and Davor Solter. 1982. "Monoclonal Antibody to Murine Embryos Defines a Stage-Specific Embryonic Antigen Expressed on Mouse Embryos and Human Teratocarcinoma Cells." *Cell* 30(3):697–705.
- Shimokawa, Mariko et al. 2017. "Visualization and Targeting of LGR5 + Human Colon Cancer Stem Cells." *Nature* 545(7653):187–92.
- Siegel, Rebecca, Carol Desantis, and Ahmedin Jemal. 2017. "Colorectal Cancer Statistics , 2017." *CA Cancer J Clin* 67(3):1–17.
- Siegel, Rebecca L., Kimberly D. Miller, and Ahmedin Jemal. 2016. "Cancer Statistics." *CA Cancer J Clin* 66(1):7–30.
- Silva, Jose et al. 2009. "Nanog Is the Gateway to the Pluripotent Ground State." *Cell* 138(4):722–37.
- Sligbrand, T. 1984. "Present Status and Future Trends of Human Alkaline Phosphatases." *Prog Clin Biol Res* 1663–14.
- Smith, T. .. 2010. "Differentiation and Cancer Grading."
- Solter, D. and B. B. Knowles. 1978. "Monoclonal Antibody Defining a Stage-Specific Mouse Embryonic Antigen (SSEA-1)." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*

- United States of America* 75(11):5565–69. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/281705%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC393007>).
- Solter, Davor and Davor Solter. 2006. “From Teratocarcinomas to Embryonic Stem Cells and beyond: A History of Embryonic Stem Cell Research.” *Nature Reviews. Genetics* 7(4):319–27. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16534514>).
- Son, Myung Jin, Kevin Woolard, Do Hyun Nam, Jeongwu Lee, and Howard A. Fine. 2009. “SSEA-1 Is an Enrichment Marker for Tumor-Initiating Cells in Human Glioblastoma.” *Cell Stem Cell* 4(5):440–52.
- Stevens, Leroy C. 1967a. “Origin of Testicular Teratomas from Primordial Germ Cells in Mice.” *Journal of the National Cancer Institute* 38(4):549–52.
- Stevens, Leroy C. 1967b. “The Biology of Teratomas.” *Adv. Morphog.* 6:1–31.
- Stewart, B. W. and C. P. Wild. 2014. “World Cancer Report 2014.” *World Health Organization* 1–2. Retrieved (<http://www.videnza.org/wp-content/uploads/World-Cancer-Report-2014.pdf>).
- Suzuki, Yozo et al. 2013. “SSEA-3 as a Novel Amplifying Cancer Cell Surface Marker in Colorectal Cancers.” *International Journal of Oncology* 42(1):161–67.
- Tai, Mei-Hui et al. 2005. “Oct4 Expression in Adult Human Stem Cells: Evidence in Support of the Stem Cell Theory of Carcinogenesis.” *Carcinogenesis* 26(2):495–502.
- Takahashi, Kazutoshi et al. 2007. “Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors.” *Cell* 131(5):861–72.
- Takahashi, Kazutoshi and Shinya Yamanaka. 2006. “Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors.” *Cell* 126(4):663–76.
- Takeda, Jun, Susumu Seino, and Graeme I. Bell. 1992. “Human Oct3 Gene Family: CDNA Sequences, Alternative Splicing, Gene Organization, Chromosomal Location, and Expression at Low Levels in Adult Tissues.” *Nucleic Acids Research* 20(17):4613–20.
- Talebi, Ardeshir, Kianoosh Kianersi, and Mozhdeh Beiraghdar. 2015. “Comparison of Gene Expression of SOX2 and OCT4 in Normal Tissue, Polyps, and Colon Adenocarcinoma Using Immunohistochemical Staining.” *Advanced Biomedical Research* 4:234. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26645019%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.go>

v/articlerender.fcgi?artid=PMC4647122).

Taniguchi, Hiroaki et al. 2016. "Cancer Stem Cells in Human Gastrointestinal Cancer." *Cancer Science* 107(11):1556–62.

Taylor, Michael D. et al. 2005. "Radial Glia Cells Are Candidate Stem Cells of Ependymoma." *Cancer Cell* 8(4):323–35.

Tesar, P. J. et al. 2007. "New Cell Lines from Mouse Epiblast Share Defining Features with Human Embryonic Stem Cells." *Nature* 448(7150):196–99.

Thomson, J. A. 1998. "Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts." *Science* 282(5391):1145–47. Retrieved (<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.282.5391.1145>).

Tompkins, David H. et al. 2009. "Sox2 Is Required for Maintenance and Differentiation of Bronchiolar Clara, Ciliated, and Goblet Cells." *PLoS ONE* 4(12).

Tsai, L. C. et al. 2000. "Expression and Regulation of Alkaline Phosphatases in Human Breast Cancer MCF-7 Cells." *Eur J Biochem* 267(5):1330–39.

Usoro, N. I., M. C. Omabbe, C. A. Usoro, and A. Nsonwu. 2010. "Calcium, Inorganic Phosphates, Alkaline and Acid Phosphatase Activities in Breast Cancer Patients in Calabar, Nigeria." *African Health Sciences* 10:9–13. Retrieved (<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=med5&AN=20811518>
<http://sfx.scholarsportal.info/uhn?sid=OVID:medline&id=pmid:20811518&id=doi:&issn=1680-6905&isbn=&volume=10&issue=1&spage=9&pages=9-13&date=2010&title=African+Health+Sci>).

Vergote, I. B. et al. 1992. "CA125 and Placental Alkaline-phosphatase as Serum Tumor-marker in Epithelial Ovarian-carcinoma." *Tumor Biology* 13(3):168–74.

Vermeulen, Louis, Felipe de Sousa e Melo, Dick J. Richel, and Jan Paul Medema. 2012. "The Developing Cancer Stem-Cell Model: Clinical Challenges and Opportunities." *The Lancet Oncology* 13(2).

Vinogradov, Serguei and Xin Wei. 2012. "Cancer Stem Cells and Drug Resistance: The Potential of Nanomedicine." *Nanomedicine* 7(4):597–615. Retrieved (<http://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/nnm.12.22>).

Wahab, S. M. Riajul, Farhadul Islam, Vinod Gopalan, and Alfred King-yin Lam. 2017. "The

- Identifications and Clinical Implications of Cancer Stem Cells in Colorectal Cancer.” *Clinical Colorectal Cancer* 1–10. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.clcc.2017.01.011>).
- Wang, Jianlong et al. 2006. “A Protein Interaction Network for Pluripotency of Embryonic Stem Cells.” *Nature* 444(7117):364–68.
- Wang, Xia and Jianwu Dai. 2010. “Concise Review: Isoforms of OCT4 Contribute to the Confusing Diversity in Stem Cell Biology.” *Stem Cells* 28(5):885–93.
- Weisenberger, Daniel J. et al. 2006. “CpG Island Methylator Phenotype Underlies Sporadic Microsatellite Instability and Is Tightly Associated with BRAF Mutation in Colorectal Cancer.” *Nature Genetics* 38(7):787–93.
- Weiss, M. J. et al. 1986. “Isolation and Characterization of a CDNA Encoding a Human Liver/Bone/Kidney-Type Alkaline Phosphatase.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83(19):7182–86.
- Weissman, I. L. 2000. “Stem Cells: Units of Development, Units of Regeneration, and Units in Evolution.” *Cell* 100(1):157–68.
- Wilbertz, Theresia et al. 2011. “SOX2 Gene Amplification and Protein Overexpression Are Associated with Better Outcome in Squamous Cell Lung Cancer.” *Modern Pathology : An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 24(7):944–53. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1038/modpathol.2011.49>).
- Williams, R. L. et al. 1988. “Myeloid Leukaemia Inhibitory Factor Maintains the Developmental Potential of Embryonic Stem Cells.” *Nature* 336(6200):684–87.
- Wright, NA and MR Alison. 1984. *The Biology of Epithelial Cell Populations*. Oxford: Clarendon Press.
- Wu, Yaojiong and Philip Yuguang Wu. 2009. “CD133 as a Marker for Cancer Stem Cells: Progresses and Concerns.” *Stem Cells and Development* 18(8):1127–34. Retrieved (<http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/scd.2008.0338>).
- Wuebben, Erin L. and Angie Rizzino. 2017. “The Dark Side of SOX2: Cancer - a Comprehensive Overview.” *Oncotarget* 8(27). Retrieved (<http://www.oncotarget.com/fulltext/16570>).
- Yan, H., W. Yuan, V. E. Velculescu, B. Vogelstein, and K. W. Kinzler. 2002. “Allelic Variation in Human Gene Expression.” *Science* 297(5584):1143.

- Yang, Bo, Lin Cao, Bin Liu, Colin D. McCaig, and Jin Pu. 2013. "The Transition from Proliferation to Differentiation in Colorectal Cancer Is Regulated by the Calcium Activated Chloride Channel A1." *PLoS ONE* 8(4).
- Ye, Feng et al. 2010. "Stage-Specific Embryonic Antigen 4 Expression in Epithelial Ovarian Carcinoma." *International Journal of Gynecological Cancer : Official Journal of the International Gynecological Cancer Society* 20(6):958–64.
- Yoruker, Ebru E., Stefan Holdenrieder, and Ugur Gezer. 2016. "Blood-Based Biomarkers for Diagnosis, Prognosis and Treatment of Colorectal Cancer." *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* 455:26–32.
- Yu, X., Y. Lin, X. Yan, and Et Al. 2011. "CD133, Stem Cells, and Cancer Stem Cells: Myth or Reality?" *Current Colorectal Cancer Reports* 7(4):253–59.
- Yuan, Huabing, Nicoletta Corbi, Claudio Basilico, and Lisa Dailey. 1995. "Developmental-Specific Activity of the FGF-4 Enhancer Requires the Synergistic Action of Sox2 and Oct-3." *Genes and Development* 9(21):2635–45.
- Zaehres, Holm et al. 2005. "High-Efficiency RNA Interference in Human Embryonic Stem Cells." *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 23(3):299–305. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15749924>).
- Zhang, J. et al. 2013. "NANOG Modulates Stemness in Human Colorectal Cancer." *Oncogene*.
- Zhang, Jingyu et al. 2006. "NANOGP8 Is a Retrogene Expressed in Cancers." *FEBS Journal* 273(8):1723–30.
- Zhang, Xin et al. 2010. "SOX2 in Gastric Carcinoma, but Not Hath1, Is Related to Patients' Clinicopathological Features and Prognosis." *Journal of Gastrointestinal Surgery* 14(8):1220–26.
- Zheng, Shuhua, Longzuo Xin, Aihua Liang, and Yuejun Fu. 2013. "Cancer Stem Cell Hypothesis: A Brief Summary and Two Proposals." *Cytotechnology* 65(4):505–12.
- Kasutatud raamatud:
- Arend, Andres and Marina Aunapuu. 2012. "Histoloogia Materjalid." 116.
- Cooper, GM. 2000. "The Development and Causes of Cancer." in *The Cell: A Molecular Approach*.

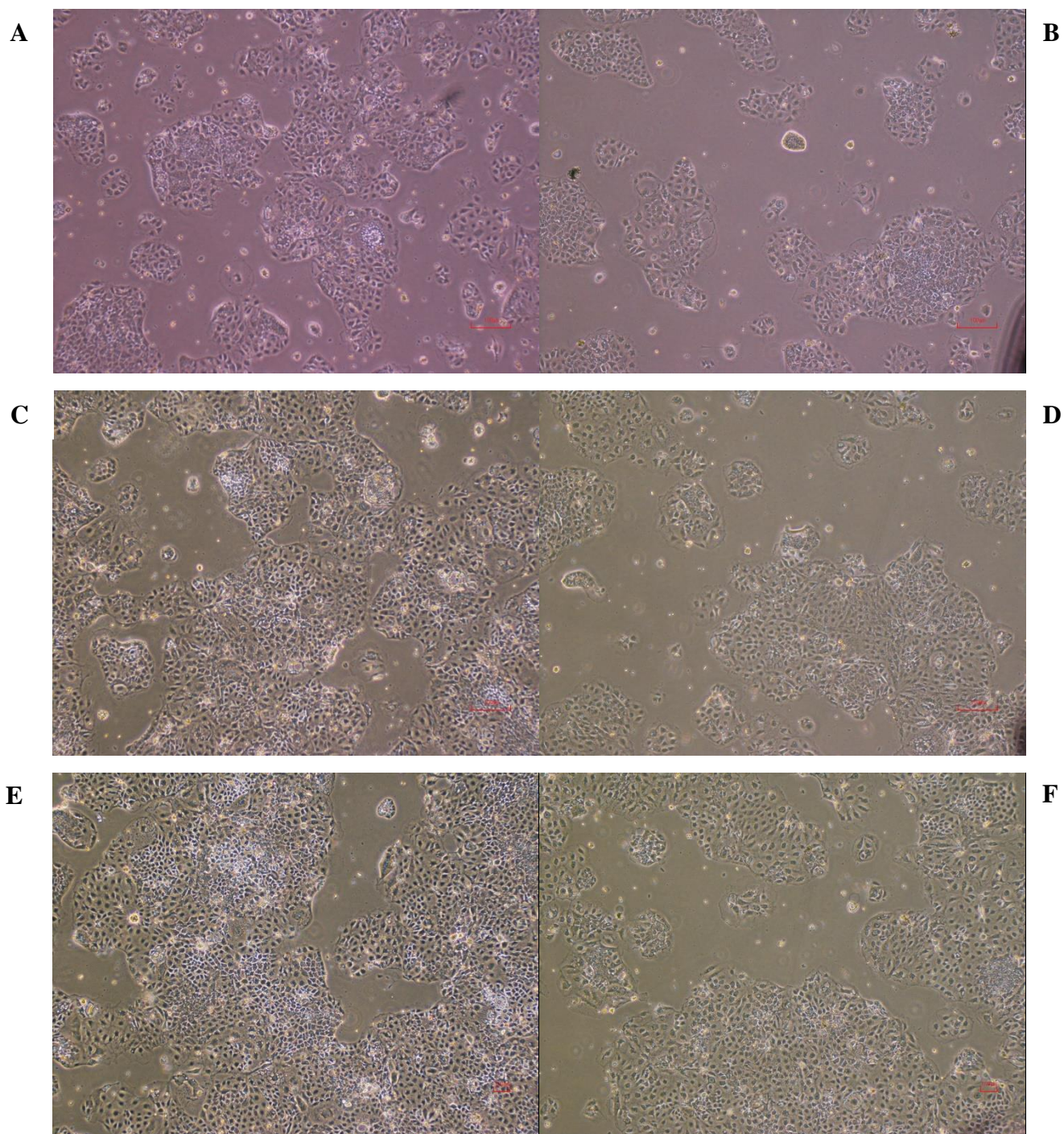
Kasutatud veebilehed:

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome

<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01589900>, 27.05.2018

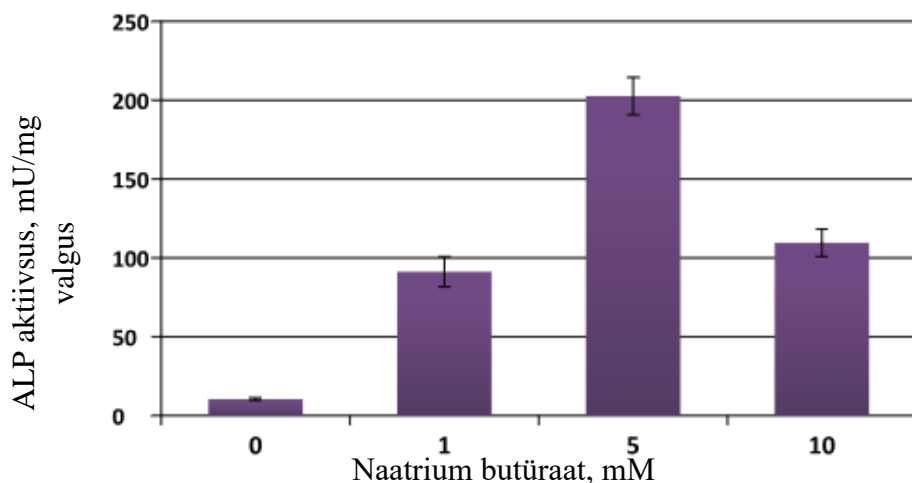
Lisa

Lisa 1



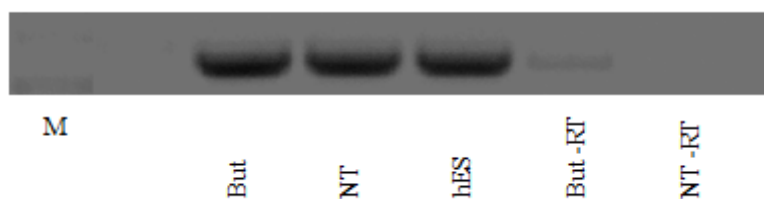
Joonis 1. Butüraadiga töötlemise mõju Caco2 rakkudele. *A (töötlemata rakud) ja B (butüraadiga töödeldud rakud) piltidel on näha rakke vahetult enne töötlust (0 h). C ja D piltidel on näha samu rakke 24 h möödudes. E ja F piltidel on näha rakke 48 h järel, butüraadiga mõjutamise algusest.*

Lisa 2



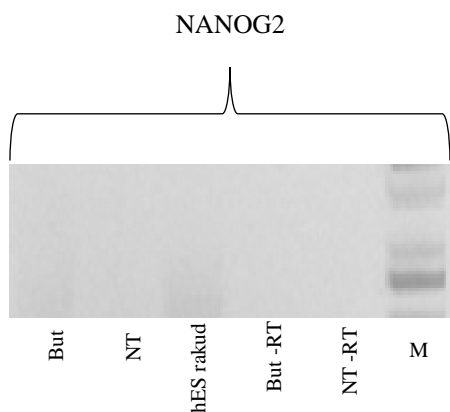
Joonis 2. Aluselise fosfataasi (ALP) aktiivsus Caco2 rakkudes butüraadiga indutseeritud diferentseerumise käigus. ALP aktiivsuse analüüs teostati koostöö laboris Keemilise ja Bioloogilise Füüsika Instituudis bioenergeetika laboris, kus kasutati paralleelselt sama diferentseerimise protokolliga Caco2 rakkude bioenergeetilise profiili uurimisel rakkude diferentseerumisel.

Lisa 3



Joonis 3. GAPDH transkriпти tuvastamine. „But“ on tähistatud Caco2 rakud, mis on butüraadiga indutseeritud diferentseeruma. „NT“ tähistab Caco2 rakke, mis on butüraadiga mõjutamata. Tähis „hES“ viitab hES rakkudele ja „-RT“ tähistab vastavalt butüraadiga mõjutatud ja mõjutamata Caco2, kus pole tehtud revertaasi töötlust.

Lisa 4



Joonis 3. NANOG2 alternatiivne splaiising. NANOG2 transkriпти on geeniduplikaat, mida tehakse NANOGP1 pealt.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Kaisa Kuus

(sünnikuupäev: 26.09.1994)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Pluripotentsusega seotud markervalkude ekspressioon inimese kolorektaalse adenokartsinoomi Caco2 rakkudes“,

mille juhendajad on Martin Pook, Aleksandr Klepinin ja Ljudmila Õunpuu,

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 **28.05.2019** 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, 28.05.2018