

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

**LGR5+ tüvirakkude identiteet ja nišš akuutse kahjustusega  
maksas**

Magistritöö

40 EAP

Mikk Tooming

Juhendajad: PhD Janeli Viil,

PhD, MD Viljar Jaks

TARTU 2017

# INFOLEHT

## **LGR5+ tüvirakkude identiteet ja nišš akuutse kahjustusega maksas**

Maks on inimese elutähtis organ, millel on tohutu regeneratsioonivõime. Maksataastumisprotsesse on uuritud juba pikka aega, kuid töö maksa tüvirakkudega on intensiivistunud alles viimastel aastatel. Maks tüvirakkude uurimise on keeruliseks teinud spetsiifiliste markerite puudumine, mille abil neid rakke detekteerida. Üheks potentsiaalseks tüvirakumarkeriks, mis märgib mitmete teiste kudede tüvi- ja eellasrakke, on LGR5. Antud töö eesmärgiks oli uurida maksa LGR5-positiivsete tüvirakkude identiteeti nende pinnamarkerite repertuaari iseloomustamise kaudu ning kirjeldada nende tüvirakunišši. Tulemustest selgus, et LGR5 positiivsed rakud ekspresseerivad makrofaagidele iseloomulikke markereid ning asetsevad müofibroblastide ja tüüp IV kollageeni poolt ümbritsetud niššis. Järgnevalt peaks uurima LGR5 positiivsete tüvirakkude ning neid ümbritsevate rakkude täpsemaid interaktsioone.

Märksõnad: LGR5, maks, tüvirakud, tüvirakunišš

CERCs kood: B210; histoloogia, tsütokeemia B350; rakuteraapia, kunstlikud koed, transplantoloogia

## **LGR5+ stem cells identity and stem cell niche in acute liver injury**

Liver is a vitally important organ in the human body and it has a vast regenerative capability. The regenerative processes in liver have been studied for decades. A vast progress had been made during recent years in studying liver stem cells but much is yet to be discovered. Studies on liver stem/progenitor cells is complicated due to the lack of specific markers. One potential liver stem cell marker is LGR5 that labels stem/progenitor cells in a number of tissues. The aim of this work was to study the precise identity of LGR5-positive stem cells in liver injury by identifying their cell surface marker repertoire and to describe their stem cell niche. The results revealed that in acute liver injury, LGR5+ stem cells express macrophage markers which reside in stem cell niches composed of myofibroblasts and type IV collagen. The results provide basis for further studies aimed at elucidating the interactions of LGR5+ stem cells with their surroundings.

Key words: LGR5, liver, stem cells, stem cell niche

CERCs code: B210; histology, cytochemistry, histochemistry, tissue culture B350; cell therapy, artificial tissues, transplantology

# SISUKORD

INFOLEHT.....	2
KASUTATUD LÜHENDID .....	5
SISSEJUHATUS.....	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1 Maks ja tema ehitus .....	7
1.1.1 Maksa funktsioonid .....	8
1.1.2 Maksa vereringe ja rakuline koosseis.....	9
1.1.3 Maksa regeneratsioon.....	10
1.1.4 Maksa tüvirakud .....	12
1.2 LGR5 iseloomustus.....	13
1.2.1 LGR5 tüvirakumarkerina.....	14
1.3 Tüvirakunišš ja tema olemus .....	15
1.4 Makrofaagid ja nende roll maksa regeneratsioonis .....	16
2. EKSPERIMENTAALOSA .....	19
2.1 Töö eesmärgid.....	19
2.2 Materjal ja meetodika .....	20
2.2.1 Kasutatud hiireliinid .....	20
2.2.2 Hiirte genotüüpiseerimine .....	20
2.2.3 CCl <sub>4</sub> kahjustuse tekitamine ja maksakoe külmutamine.....	21
2.2.4 X-gal töötlus .....	22
2.2.5 Immunofluorestsentsanalüüs .....	23
2.2.6 FACS analüüs .....	26
2.2.6.1 Hiirte anesteerimine .....	26
2.2.6.2 Maksarakkude eraldamine .....	26
2.2.6.3 LGR5+ rakkude FACS analüüs .....	27
2.3 TULEMUSED .....	28
2.3.1 LGR5+ tüvirakud ei ekspresseeri ALB ja MUP1 hepatotsüüdimarkereid .....	28

2.3.2	LGR5+ tüvirakud ei ekspresseeri sapijuharakkude ja maksa progenitorrakkude markerit OPN.....	30
2.3.3	LGR5+ tüvirakud on CD34 <sup>-</sup> , Sox9 <sup>-</sup> , CD133 <sup>-</sup> , CD45 <sup>+</sup> .....	31
2.3.4	LGR5+ tüvirakkude analüüs FACS meetodiga.....	34
2.3.5	LGR5+ tüvirakud on F4/80 <sup>+</sup> , CD68 <sup>+</sup> , CD11b <sup>-</sup> , CD169 <sup>-</sup> .....	35
2.3.6	LGR5+ tüvirakud asetsevad tsentraalveeni vahetus läheduses müofibroblastide ja tüüp IV kollageeni poolt hallatud potentsiaalses tüvirakuniššis.....	39
2.4	ARUTELU.....	40
	KOKKUVÕTE.....	43
	SUMMARY.....	44
	TÄNUAVALDUSED.....	45
	KASUTATUD KIRJANDUS.....	46
	KASUTATUD VEEBIAADRESSID.....	52
	LISAD.....	53
	LIHTLITSENTS.....	56

## KASUTATUD LÜHENDID

**αSMA** – alfa silelihase aktiin (*ingl. alpha smooth muscle actin*)

**CCl<sub>4</sub>** – süsiniktetrakloriid (*ingl. carbon tetrachloride*)

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

**EGFR** – epidermaalse kasvufaktori retseptor (*ingl. epidermal growth factor receptor*)

**FACS** – fluorestsents-aktiveeritav rakusortimine (*ingl. fluorescent activated cell sorting*)

**FDG** – fluorestsiiin Di-β-D-galaktopüranosiid (*ingl. Fluorescein Di-D-galactopyranoside*)

**FGF** – fibroblasti kasvufaktor (*ingl. fibroblast growth factor*)

**HGF** – hepatotsüüdi kasvufaktor (*ingl. hepatocyte growth factor*)

**IL-6** – interleukiin 6 (*ingl. interleukine 6*)

**IL-12** – interleukiin 12 (*ingl. interleukine 12*)

**IFN-γ** – interferoon gamma (*ingl. interferon gamma*)

**LGR5** – leutsiinirikkaid kordusi sisaldav G-valguga seonduv retseptor 5 (*ingl. leucine-rich repeat-containing G protein binding receptor 5*)

**NPC** – mitteparenhümaalsed rakud (*ingl. nonparenchymal cells*)

**PDGFR** – trombotsüütide kasvufaktor (*ingl. platelet-derived growth factor*)

**SCGFR** – tüviraku kasvufaktori retseptor (*ingl. stem cell growth factor receptor*)

**TGF-β** – transformeeruv faktor beeta (*ingl. transforming growth factor beta*)

**TNF** – tuumori nekroosi faktor (*ingl. tumor necrosis factor*)

**VEGF** – veresoonte endoteeli kasvufaktor (*ingl. vascular endothelial growth factor*)

**X-gal** – 5-bromo-4-kloro-3-indool-β-D-galaktopüranosiid (*ingl. 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside*)

## SISSEJUHATUS

Maks on üks komplekssemaid ja struktureeritumaid elundeid loomorganismis. Maksal on väga palju erinevaid funktsioone ja tohtu regeneratsioonivõime. Tema põhiülesannete hulka kuulub sapi sekreteerimine, glükogeeni ladustamine ning bakterite ja toksiinide eemaldamine verest. Maksas toimuvad protsessid ja maksa regeneratsiooniga seotud probleemid on teadlastele pikka aega huvi pakkunud, kuna maksahaiguste ravi on kallid ja hetkel on väga kaugemale arenenud patoloogia korral ainukeseks ravimisviisiks vaid organi transplantatsioon. Sageli avastatakse maksahaigused alles väga hilises staadiumis ning siiratavate organite puuduse tõttu jäävad paljud patsiendid seetõttu ravita.

Arvatakse, et väga ulatusliku kahjustuse korral, kui maksarakud ei ole enam võimelised iseseisvalt maksakudet taastama, tulevad selle protsessi juures appi tüvirakud. Maksa tüvirakkude kohta on viimastel aastatel avaldatud üha enam uusi andmeid, kuigi antud teadmised on siiski veel mittetäielikud ning sageli üksteisele vasturääkivad. Kuna praeguseks hetkeks ei ole spetsiifilist maksa tüvirakumarkerit veel identifitseeritud, kasutatakse rakkude iseloomustamiseks mitmeid erinevaid tüvirakumarkereid. Üheks selliseks markeriks on LGR5. On näidatud, et LGR5+ tüvirakud on võimelised prolifereeruma ning diferentseeruma kaheks maksakoe peamiseks rakutüübiks - hepatotsüütideks ja sapijuharakkudeks. Samuti on neist võimalik kasvatada maksa organoide (Huch and Dollé, 2016).

Käesoleva töö eesmärkideks on uurida LGR5 positiivsete tüvirakkude pinnamarkerite repertuaari akuutse kahjustusega maksas, iseloomustada täpsemalt nende identiteeti ning kirjeldada nende tüvirakunišši. Saadud tulemused annaksid panuse edasiste uuringute jaoks, mis aitavad leida uusi võimalusi maksahaiguste efektiivsemaks raviks.

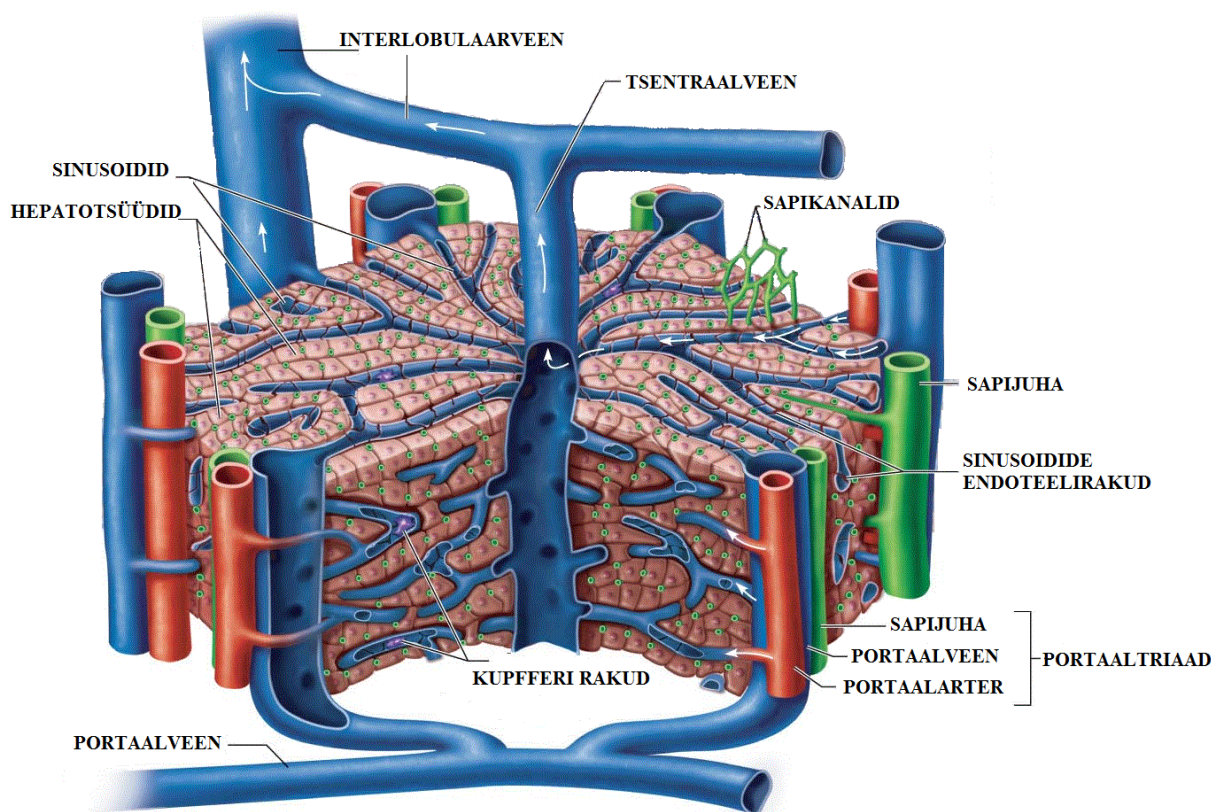
Maks, regeneratsioon, LGR5, tüvirakunišš

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1 Maks ja tema ehitus

Maks on loomorganismi suurim siseorgan. Maksas toimuvad keerukad biosünteesi ja metabolismi protsessid nagu glükogeenes, glükoneogeenes, aminohapete trans- ja deamineerimine, samuti lipiidide, sapphapete, kolesterooli, hormoonide, albumiini ja vereseerumvalkude süntees ning töötlemine, jääkainete ja vere puhastamine ning hoiustamine (Nienstedt *et al.*, 2001). Maks asub diafragma all paremal pool kõhuõõnes. Enamik maksast on ümbritsetud roietega ning teda iseloomustab punakaspruun värvus, pehme ja õrn tekstuur ning vasakult poolt kitsenev kiiluga sarnanev kuju. Kogu maksa katab õhuke sidekoeline kapsel ehk kihn, mis on kõhukelme osa. Maks koosneb suuruse järjekorras neljast sagarast: parem-, vasak-, saba- ja ruutsagar. Paremat ja vasakut sagarat eraldab üksteisest ümarside. Saba- ja ruutsagar paiknevad parema sagara tagumises osas ning ruutsagar ümbritseb sapipõit.

Maksa põhiliseks funktsionaalseks üksuseks on kuusnurkse kujuga maksasagarik (Joonis 1). Sagarikke on maksas ligikaudu 100 000 ning nad koosnevad hepatotsüütidest moodustunud maksaplaatidest (Guyton and Hall, 2006; Gosling *et al.*, 2016). Hepatotsüüdid ehk maksarakud moodustavad põhilise osa maksa massist. Maksaplaatide vahele jäävad radiaalselt kulgevad maksaveresooned ehk sinusoidid, mis koonduvad sagariku keskel paiknevasse tsentraalveeni. Sinusoidide seina vooderdavad endoteelirakud. Endoteelirakkude ja hepatotsüütide vahele jääb Disse ruum, mis on ühenduses lümfisoontega (Eipel *et al.*, 2010). Lisaks endoteelirakkudele asuvad sinusoidide seintes ka maksa makrofaagid ehk Kupfferi rakud, mis kujutavad endast maksa residentseid makrofaage. Sagarikevahelisse sidekoesse väljuvad hepatotsüütide vahel kulgevad sapikapillaarid, mis ühinevad sapijuhadeks. Sapijuha koos maksaarterist pärineva interlobulaararteri ning interlobulaarveeniga moodustab maksa portaaltiaadi, mis paikneb sagariku iga nurga tipus. Maksasagariku keskel paiknevast tsentraalveenist suundub veri sublobulaarveeni, mis omakorda suubub maksaveeni (Gosling *et al.*, 2016; Guyton and Hall, 2006).

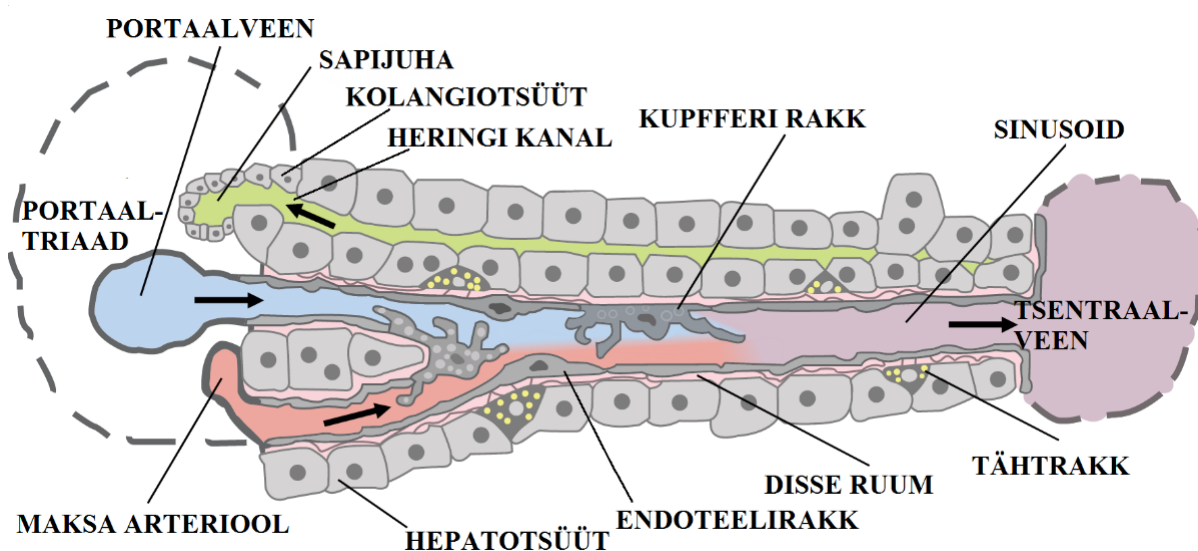


**Joonis 1. Maksa saarik.** Maks koosneb kuusnurkse kujuga saarikest. Portaaltriad koosneb portaalveenist, sapijuhast ning maksa arterioolist. Veri voolab mööda sinusoidide portaalalast tsentraalveeni ja sealt edasi interlobulaarveeni. Sinusoidides paiknevad maksa makrofaagid ehk Kupfferi rakud. Nooltega on märgitud vere liikumise suund sinusoidides ning veresoontes. Modifitseeritud (<https://goo.gl/iS9GWE>, 2017).

### 1.1.1 Maks funktsioonid

Maks on väga plastiline organ ja seetõttu on ta võimeline hoiustama oma veresoontes suurt hulka verd. Kuna maksas olevate sinusoidide seinad on väga poorsed, võimaldab see vedelike ja valkude vaba liikumist Disse ruumi ja tagasi (Eipel *et al.*, 2010). See omakorda soodustab suure mahus lümfli valmimist sinusoidide endoteelis. Puhkeolekus valmib pool kehas vajaminevast lümfist maksas. Samuti toimuvad maksas mitmed süsivesinike metabolismiprotsessid. Näiteks on maks vere glükoosi puhverdaja, tagades stabiilse glükoositaseme veres. See on võimalik tänu maksas toimuvale glükogeneesile ja glükoneogeneesi protsessile. Glükogeneesil muudab maks üleliigse glükoosi kehas glükogeeniks, hoiustades seda endas. Kui veres hakkab glükoositaseme langema, käivitub glükoneogenees, mille tagajärjel toodetakse glükogeenist, aminohapetest ja triglütseriididest glükoosi, et tõsta veresuhkru taset. Ka osa rasvade metabolismi etappidest toimub maksas, nagu näiteks rasvhapete oksüdatsioon ning kolesterooli, fosfolipiidide ja lipoproteiinide süntees.

Lisaks rasvade metabolismile toimuvad maksas mitmed muud komplekssed protsessid: aminohapete hoiustamine, lagundamine, süntees ja trans- ja deamineerimine. Samuti toimub seal urea ja plasmavalkude süntees ning mürkide, hormoonide ja teiste jääkainete lagundamine. Urea süntees võimaldab meie kehas välja viia ammooniumiioone, mille kuhjumine veres on toksiline eelkõige kesknärvisüsteemile. Maksarakud toodavad ka valdava osa kehas olevatest plasmavalkudest, nagu albumiin -  $\alpha$  ja  $\beta$  - globuliin, fibrinogeen ning prototrombiinid. Maksa kahjustumise tagajärjel häiruvad kõik eeltoodud protsessid ning kuhjuvad kahjulikud ained (Guyton and Hall, 2006). Kõiki neid protsesse on maks võimeline läbi viima tänu oma keerukale vereringesüsteemile.



**Joonis 2. Maksa sagarik koos Heringi kanaliga.** Iga nurga tipus asub portaalala, mis koosneb portaalveenist, sapijuhast ning maksa arterioolist. Veri voolab mööda sinusoide portaalalast tsentraalveeni. Maksa sinusoidides asuvad endoteelirakud ning maksa makrofaagid ehk Kupfferi rakud. Disse ruumis asuvad tähtrakud. Hepatotsüütide poolt toodetud sapp koguneb sapijuhade abil sapipõide. Sapp liigub verele vastupidises suunas. Heringi kanalis liituvad sapijuharakud ehk kolangiotsüüdid hepatotsüütidega. Modifitseeritud (Frevert *et al.*, 2005).

### 1.1.2 Maksa vereringe ja rakuline koosseis

Keha massist moodustab maks ligi 2,5% ning ta saab südame vere väljalaskemahust kuni 27%. Kokku voolab maksast läbi umbes 1350 milliliitrit verd minutis. Põhiline osa verest (~80%), mis maksa portaalveeni kaudu voolab, on hapnikuvaene venoosne veri. Portaalveeni koguneb veri maost, pankreasest, põrnast, soolestikust ning nende lähedal asuvatest veresoontest. Portaalveen hargneb väiksemateks harudeks ning nende läheduses olevad maksarakud koguvad soolest imendunud toitaineid. Ülejäänud osa (~20%) moodustab hapnikurikas arteriaalne veri, mis siseneb maksa maksaarteri kaudu. Erinevalt teistest parenhümaalsetest organitest on maksal kaheosaline vereringe. Portaalveen ning maksaarter jagunevad enne maksa sisenemist kaheks

ning neid saadavad sapijuhad. Elundisiseselt hargnevad veresoonte harud väiksemateks sinusoidideks, mis varustavad verega sagarikes paiknevaid parenhüümirakke, kus toimub vere filtreerimine. Maksa sinusoidid on organismi teistest kapillaaridest märgatavalt laiemad ja õhemate seintega (Eipel *et al.*, 2010). Sinusoidide seintes asub makrofaagisüsteem, kuhu kuuluvad tappurrakud ja õgirakud ehk Kupfferi rakud. Kupfferi rakud eemaldavad maksa suundunud verest baktereid ja teisi jääkaineid. Tappurrakud hävitavad pahaloomuliseks muutunud ja viirusi sisalduvaid rakke (Ju and Tacke, 2016). Järgnevalt liigub veri mööda sinusoidide sagariku keskel asuvasse tsentraalveeni ning sealt väljub läbi alumise õõnesveeni. Seega tuleb maksa verd kahest erinevast süsteemist, kuid väljub ühe kaudu (Eipel *et al.*, 2010).

Hepatotsüütide põhiülesanne on mitmesuguste mürgiste ainete detoksifikatsioon, toitainete töötlemine ja säilitamine ning sapi tootmine. Maksarakkude vahel on peened sapikapillaarid, mis moodustavad maksas tiheda võrgustiku. Neisse koguneb maksarakkudest toodetud sapp. Sapikapillaarid moodustavad sapijuhasid, mis saadavad värativeeni ja maksaarteri harusid (Kingisepp, 2006).

Kui maksa parenhümaalne kude saab kahjustada, siis asendub see fibroosse koega, mis võib välja areneda maksatsirroosiks. Fibroosne kude avaldab suurt mõju veresoontele, vähendades maksast läbivoolava vere mahtu ning seetõttu võib maksa normaalne talitus olla häiritud. Maksatsirroosi põhjustab tavaliselt alkoholism, hepatiidi viirus, sapijuhade takistused, põletik ning mürkained nagu näiteks süsiniktetrakloriid (Eipel *et al.*, 2010).

### **1.1.3 Maksa regeneratsioon**

Maksa regeneratsiooni jagatakse kaheks tüübiks, kus erinevad rakud vastutavad selle eest, et taastuks esialgne organi mass ning tema funktsioon. Oletatakse, et need kaks regeneratsioonitüüpi võivad mingil määral kattuda (Yanger and Stanger, 2011).

Üks regeneratsiooniprotsess, mis saab alguse pärast maksa leebemat kahjustust nagu osaline hepatektoomia, kus kirurgiliselt eemaldatakse osa maksast, käivitab massilise hepatotsüütide paljunemise. Antud metoodikat kasutatakse ka tänapäeval inimese puhul, opereerides välja maksa metastaase (Michalopoulos, 2007; Duncan *et al.*, 2009). On näidatud, et pärast hepatektoomiat taastub maksa esialgne mass hiirtel seitsme päeva jooksul ning inimestel 15 päeva jooksul. Samaaegselt rakkude paljunemisega suunatakse osa rakkudest ka apoptoosi. Arvatakse, et apoptoosiga hoitakse ära üleliigne regeneratsioon. Hepatotsüütide vohamine toimub lainetena - suurem osa rakke jaguneb kõigepealt portaalalade juures ning tsentraalveenide juures olevad hepatotsüüdid prolifereeruvad viimastena. Sapiteede

epiteelirakkude vohamine toimub pärast hepatotsüütide prolifereerumist. Tähtrakkude taastumist pärast maksa osalist hepatektoomiat pole veel uuritud. Regeneratsiooni lõppedes on allesjäänud maksasagarike mass suurenenud, kaasa arvatud hepatotsüütide osakaal. Nädalate jooksul toimuvad aeglased sagarikevahelised reorganiseerumised ning lõplik maksa histoloogia kujunemine. On näidatud, et taoline protsess toimub ka pärast süsiniktetrakloriidi kahjustust (Drosos and Kolios, 2013; Duncan *et al.*, 2009).

Kui maks on saavutanud oma esialgse suuruse, peatub hepatotsüütide jagunemine. Täpseid faktoreid, mis selle eest vastutavad, ei ole teada, kuid arvatakse, et antud protsessides osaleb transformeeriv kasvufaktor faktor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). TGF- $\beta$  on tsütokiin, mida toodavad muude rakkude hulgas ka hepatotsüüdid ning antud tsütokiinil on pidurdav toime rakkude vohamisele (Guyton and Hall, 2006). Lisaks TGF- $\beta$ -le ekspresseerivad hepatotsüüdid kahjustuseta maksas selliseid kasvufaktoreid ja retseptoreid nagu trombotsüütidest pärinev kasvufaktor (PDGF), veresoonte endoteeli kasvufaktor (VEGF), fibroblasti kasvufaktor (FGF) ja tüviraku kasvufaktori retseptor (SCGFR). Maksa regeneratsioonil aga indutseeritakse hepatotsüütide kasvufaktorit (HGF), epidermaalse kasvufaktori retseptoreid (EGFR), tuumori nekroosi faktorit (TNF), interleukiin - 6 (IL-6) ja noradrenaliini ekspressioon. HGF-i toodavad tähtrakud, mesenhümaalsed rakud ja maksa endoteelirakud. Need endoteelirakud reageerivad VEGF-ile, mis omakorda stimuleerivad positiivse tagasiside kaudu HGF-i tootmist. HGF-i tagajärjel hakkavad hepatotsüüdid jagunema ning kasvama mõõtmel. On näidatud, et HGF-i manustamisel hiirtesse toimub maksa massi suurenemine (Guyton and Hall, 2006; Costa *et al.*, 2003). EGF-i toodavad Brunneri näärmed kaksteistsõrmiksooles ning on näidatud, et ka EGF-il on hepatotsüütide vohamist soodustav toime. EGF-i ja HGF-i taset tõstab ka noradrenaliin, mõjutades sellega hepatotsüütide paljunemist. Noradrenaliin on neurotransmitter, mida toodetakse autonoomse närvisüsteemi närvilõpmete poolt. TNF-i toodavad peamiselt makrofaagid. Selle puudumisel on maksa regeneratsioon aeglustunud. TNF mõjutab HGF-i tootmist, mis omakorda soodustab hepatotsüütide vohamist. IL-6 toodavad maksa makrofaagid ning IL-6 tase tõuseb vahetult pärast maksa akuutset kahjustust. Kui IL-6 olemasolul on hiirtel puudulik maksa regeneratsioon, siis IL-6 üleekspresseerumisel toimub vastupidiselt maksa hüperplaasia (Michalopoulos, 2007; Kamiya and Inagaki, 2015).

Maksa teist tüüpi regeneratsiooniprotsess saab alguse pärast ulatuslikku või kroonilist kahjustust, mille tagajärjel ei suuda kahjustusest alles jäänud täiskasvanud hepatotsüüdid maksa taastamisega toime tulla. Sel juhul arvatakse, et regeneratsiooni vahendavad hüpoteetilised maksa tüvirakud (vt allpool). Tavatingimustes ei ole veel maksa tüvirakke üheselt identifitseeritud, kuid teatud maksakahjustuste korral need arvatavasti aktiveeruvad ja panevad

aluse kiiresti jagunevatele eellasrakkudele. On näidatud, et maksakahjustuse korral tekkinud eellasrakud võivad diferentseeruda nii hepatotsüütideks kui ka sapijuharakkudeks (Drosos and Kolios, 2013). Maksahaiguste nagu fibroosi, hepatiidi ja põletiku puhul on maksa regeneratsiooniprotsessid puudulikud ja maksa normaalne funktsioon häiritud (Guyton and Hall, 2006). Lisaks maksa regeneratsioonimudelitele on maksas ka mitmed potentsiaalsed tüvirakud, mis diferentseerudes maksarakkudeks panustavad maksa regeneratsiooni (Yanger and Stanger, 2011).

#### 1.1.4 Maksa tüvirakud

Tüvirakud on mittediferentseerunud rakud, mis on võimelised lõputult paljunema ja uuenema ning teatud tingimustel diferentseeruma erinevateks rakutüüpideks. Nad paiknevad enamasti hulganisti koos ning diferentseerudes on nad võimelised moodustama kudesid. Tüvirakud vastutavad kudede ja organite regeneratsiooni ja üldise uuenemise eest ning neid on leitud peaaegu kõikidest kudedest. Tüvirakkude diferentseerumist mõjutavad nende asukoht, rakuvaheaine, ümbritsevad rakud, glükoproteiinid, rakkude- ja molekulidevahelised kontaktid ning erinevad interaktsioonid (Scadden, 2006; Drosos and Kolios, 2013).

Multipotentsed maksa eellasrakud on rakud, mis arvatakse asuvat Heringi kanalis sapijuhas, kus sapiteederakud ehk kolangiotsüüdid liituvad hepatotsüütidega (Joonis 2). Multipotentsetest maksa tüvirakkudest arenevad eellasrakud, mis on võimelised diferentseeruma hepatotsüütideks ja kolangiotsüütideks (Yanger and Stanger, 2011). Kahjustusejärgselt on eellasrakke võimalik leida sagara portaalalade lähedalt ning pärast prolifererumist on neid võimalik leida üle kogu sagara. Evarts *et al.* leidsid, et hiire ja roti ovaalrakud, mis on inimese maksa eellasrakkudele vastavad rakud, on hepatotsüütide ja sapiteede rakkude eellased (Evarts *et al.*, 1989). Lisaks sellele on teada, et kui hepatotsüüdid on kahjustunud võivad ovaalrakud olla seerumivalkude tootjateks (Forbes *et al.*, 2002; Drosos and Kolios, 2013; Duncan *et al.*, 2009).

Kahjustusejärgselt tekkivaid maksa eellasrakke on peetud ka fakultatiivseteks tüvirakkudeks (Yanger and Stanger, 2011). Maksa fakultatiivseteks tüvirakkudeks on nimetatud Trop2 (Okabe *et al.*, 2009), Foxl1 (Shin *et al.*, 2011) või LGR5 (Huch *et al.*, 2013) markereid ekspresseerivaid rakke. Nad ei esine normaalselt funktsioneerivates maksades ning on näidatud, et neid markereid kandvate rakkude osakaal tõuseb drastiliselt pärast maksa kahjustumist. On teada, et *in vitro* ja *in vivo* tingimustes on Foxl1 ja LGR5+ võimelised diferentseeruma nii hepatotsüütideks kui ka sapijuharakkudeks. Osad sapijuharakud ekspresseerivad Foxl1 ja Trop2, kuid vaid vähesed neist LGR5+. Ka osa Heringi kanalis olevatest kolangiotsüütidest

muutuvad arvatavasti fakultatiivseteks tüvirakkudeks pärast maksa kahjustumist (Tanimizu and Mitaka, 2014). Ometi on teadmised maksa tüvirakkude kohta hetkel puudulikud. Tehakse liiga rutakalt ennatlike järeldusi teatud rakutüüpide kohta, et leida kõige autentsemat maksatüvirakku, mis panustab kõige enam maksa regeneratsiooni. Üheks lubavamaks markeriks antud juhul on peetud LGR5, mis on varasemalt hästi kirjeldatud nii nahas, soolestikus kui ka neerudes (Huch *et al.*, 2013; Huch and Dollé, 2016; Jaks *et al.*, 2008).

## 1.2 LGR5 iseloomustus

G-valk-seoselised retseptorid on ühed mitmekülgsemad membraaniseoselised valgud. Nende ülesanneteks on eksokriinsete ja endokriinsete näärmete, hormoonide, immuunvastuse, silelihaste kontraktsiooni ning vererõhu signaaliülekanne reguleerimine. Ligandideks võivad olla ioonid, valgud, valgusfootonid ja väikesed orgaanilised molekulid. Leutsiinirikad G-valk-seoselised retseptorid on üks alamhulk G-valk-seoselistest retseptoritest ja neile on iseloomulik leutsiinirikaste korduste rohke ekstratsellulaarne domeen (Kumar *et al.*, 2014). Leutsiinirikaste G-valk-seoseliste retseptorite uurimine on aktuaalne tänu sellele, et neid on leitud karvade epiteelirakkudest, nahast, rinnakoest ja soolestikust, kus nad panustavad antud kudede regeneratsiooni (de Visser *et al.*, 2012; Barker and Clevers, 2010; Haegebarth and Clevers, 2009; Jaks *et al.*, 2008).

Leutsiinirikas G-valguga seonduv retseptor 5 (LGR5) koosneb signaalpeptiidsest osast, millele järgneb 17 leutsiinirikast kordusdomeeni, linkeri osast ning seitsmest transmembraansest domeenist. LGR5 ligandideks on R-spondiini perekonna valgud. Nad mõjutavad soolestiku krüptide arengut *in vivo* ja *in vitro* tingimustes ning neil on tugev mitogeenne toime LGR5 positiivsetele rakkudele (Kumar *et al.*, 2014). Samuti on LGR5 Wnt signaaliraja sihtmärkgeeniks. Wnt signaalirada algab Wnt-i seondumisega frizzled ja lipoproteiini sarnase valgu 5/6 ühendmolekulile. Antud kompleks inhibeerib beeta kateniini ( $\beta$ -kateniin) degradatsiooni ning seetõttu on  $\beta$ -kateniin võimeline mõjutama transkriptsioonifaktoreid rakutuumas. LGR5 üleekspresseerumisel on pidurdav mõju Wnt signaalile (Kumar *et al.*, 2014; Barker and Clevers, 2010). Maksas on Wnt signaalirada aktiivne veresoonte vahetuses läheduses olevates hepatotsüütides ning signaaliraja aktivatsioon suureneb maksakahjustuse korral (Behari, 2010).

### 1.2.1 LGR5 tüvirakumarkerina

LGR5 roll tüvirakumarkerina avastati sooleepiteeli regeneratsiooni uurimisel (Barker *et al.*, 2007). Varasemalt teati, et sooleepiteel uueneb pidevalt ning uuenemise eest vastutavad soolekrüptides asetsevad tüvirakud. Antud tüvirakkude identiteet oli lahtine, kuna ei olnud piisavalt spetsiifilisi markereid, et neid iseloomustada. Kuna Wnt signaalirada omab suurt mõju sooleseina füsioloogiale, vastutades sooleepiteelirakkude prolifereerumise eest, viitas see võimalusele, et tema sihtmärkgeenid võivad olla potentsiaalseteks tüvirakumarkeriteks (Kumar *et al.*, 2014). Soolerakkude geeniekspressiooni uuringutega leiti, et LGR5 võib olla potentsiaalne tüvirakumarkeri kandidaat sooleseinakrüpti rakkudes. Seejärel viidi läbi *in vivo* raku päritoluuuring hiire krüptirakkudega, mis kinnitaski, et LGR5 märgib tõepoolest täiskasvanud soole epiteeli tüvirakke. (Barker *et al.*, 2007; Barker and Clevers, 2010).

Pärilikkusuuringud on näidanud, et LGR5+ rakud on kiiresti jagunevad pikaajalised täiskasvanu tüvirakud karvafolliikulites, soolestikus, kõhus, rinnanäärmetes, arenevas neerus, munasarjade epiteelis ning sisekõrvas (Barker *et al.*, 2010, 2012; Liu *et al.*, 2014; Ng *et al.*, 2014; Barker *et al.*, 2007; Jaks *et al.*, 2008; Yee *et al.*, 2013). Alles hiljuti näidati, et LGR5+ tüvirakkudest on võimalik kasvatada rinnanäärmeid, mis demonstreerib LGR5+ tüvirakkude regeneratiivset võimekust. (de Visser *et al.*, 2012)

Kahjustuseta maksas on Wnt signaalirada aktiivne veresoontelähedastes hepatotsüütides. On näidatud, et maksa akuutsel kahjustusel aktiveerub Wnt signaalirada ning koos sellega aktiveeruvad ka LGR5+ tüvirakud, mis panustavad koe regeneratsiooni. Terves, normaalselt funktsioneerivas maksas LGR5 positiivseid rakke ei ole, kuid kahjustusejärgselt ilmuvad maksakoosse LGR5 ekspresseerivad rakud. *In vitro* tingimustes on antud kahjustusejärgselt saadud LGR5+ rakud tüvirakuliste omadustega. Neid on võimalik kasvatada maksa organoidideks, olles samaaegselt võimelised diferentseeruma kolangiotsüütideks või hepatotsüütideks *in vitro* ja *in vivo* FAH<sup>-/-</sup> hiirtes (Huch *et al.*, 2013; Huch and Dollé, 2016; Behari, 2010). Pole uuritud, mis juhtub siis, kui viia antud rakud teise kahjustunud maksa ning milline on LGR5+ tüvirakkude tüvirakunišš.

### 1.3 Tüvirakunišš ja tema olemus

Tüvirakke defineeritakse nende paiknemise järgi ja nende kogumikke käsitletakse tervikuna, mida nimetatakse tüvirakuniššiks. Tüvirakuniššid on koespetsiifilised kohad, mis tagavad tüvirakkude säilimise ja nende edasise saatuse, mõjutades kudede arengut, toimetulekut ning regeneratsiooni. Tüvirakkude diferentseerumine ja prolifereerumine on kindlalt ära määratletud tüvirakunišši poolt. Tüvirakunišš sõltub nii asukohast kui ka ümbritsevatest rakkudest. Tüvirakud ei oma ilma kindla anatoomilise asukohata funktsiooni ning ilma niššita tüvirakkude arv organismis väheneks või toimuks hoopiski nende ebanormaalne vohamine. Tüvirakkude ja nende nišši vastastikune toime moodustab dünaamilise süsteemi, mis on kudede püsimise aluseks. Tüvirakunišši moodustavateks faktoriteks on lahustunud ja lahustumata molekulid, rakuvaheaine ning teiste rakkude poolt avaldatavad mõjutused (Scadden, 2006; Putnam, 2014).

Enamasti paiknevad tüvirakuniššid veresoonte vahetus läheduses - see võimaldab tüvirakkudel olla kergesti kättesaadav erinevatele signaalidele, mis tulevad üle kogu organismi (Putnam, 2014). Tüvirakunišši ümberkorraldamine ja organiseerimine on oluline ning pidev protsess. Kui vastavate signaalide ekspresseerumises toimuksid häired, võib see viia rakkude ebaloomulikule paigutumisele. Häire korral võivad tekkida erinevad patoloogiad nii tüvirakkudel kui ka teistel sihtmärkidel ning alguse võib saada kasvaja areng (Scadden, 2006; Putnam, 2014).

On pakutud, et maksas asuvad Heringi kanalid võivad olla kohad, mis käituvad tüvirakuniššina, kust saavad alguse maksa eellasrakud (Joonis 2). Lisaks on maksas tüvirakuniššiks pakutud ka Disse ruumi (Joonis 2), mis jääb endoteelirakkude ja hepatotsüütide vahele ning seal toimub looteas hematopoees. Arvatakse, et antud koht võib olla maksa eellasrakkudele soodsaks asukohaks, omades otsest kontakti sinusoididega, mille abil liiguvad vajalikud signaalid ja kasvufaktorid (Zajicek *et al.*, 2008; Kordes and Häussinger, 2013; Carpino *et al.*, 2016).

Niššis paiknevatel rakkudel ja rakuvaheainel on suur mõju tüvirakkudele. On näidatud, et müofibroblastid ning makrofaagid soodustavad maksa eellasrakkude prolifereerumist, mis omakorda osalevad organi regeneratsiooniprotsessides. Müofibroblastid toodavad maksas kollageeni ning makrofaagid panustavad koe remodelleerimisse ja mõjutavad fibrotilisi protsesse (Lorenzini *et al.*, 2010; Carpino *et al.*, 2016). Uuringud veel käivad leidmaks rakutüüpi, mis oleks ainuõige maksa tüvirakk ning missugune on teda ümbritsev tüvirakunišš.

## 1.4 Makrofaagid ja nende roll maksa regeneratsioonis

Hematopoeetilistest eellasrakkudest arenenud makrofaage leidub erinevates kudedes üle kogu keha. Makrofaagid on pikaealised, suure sünteesivõimega, sekretoorsed, endo- ja fagotsütootilised rakud. Nad on võimelised kahjustuse järgselt aktiveeruma ning prolifereeruma (Rantakari *et al.*, 2016). Neil on võime ära tunda erinevaid stiimuleid, omades mitmeid pinna ja rakusiseseid retseptoreid ning erinevaid transduktsiooniradasid. Makrofaagid omavad mitmeid opsoniseerimise jaoks vajalikke retseptoreid nagu Fc $\gamma$ R, komplement R, lektiinid, TOLLi- laadsed- ja püüdüretseptorid (Taylor *et al.*, 2005). Vastusena põletikule diferentseeruvad luuüdi monotsüütidest makrofaagid, mis sisenevad kudedesse, kus nad tunnevad ära, õgivad ja lagundavad rakulisi jääkaineid, võõrkehi ja patogeene. Samal ajal on nad võimelised osalema koe remodelleerimises, muutes rakuvaheainet. Tsütokiinide tootes on nad võimelised ka põletikku esile kutsuma, mis on immuunsuse algatamise üks esimesi etappe. See kõik on võimalik tänu makrofaagide poolt toodetud mikrovesiikulitele, lüsoosoomidele, proteinaasidele, tsütokiinidele, eksosoomidele, nanotuubulitele, kasvufaktoritele, hapnikuradikaalidele, lämmastikuderivaatidele ning rakkude fuseerimisele. Enamasti peetakse koes olevaid makrofaage paigalisteks rakkudeks. Residentsed makrofaagid on rakuvaheaines olevad rakud, mis ekspresseerivad kollageeni, elastiini, proteoglykaani ning fibrillaarseid retseptoreid. Mitmete stiimulite abil, nagu kemokiinid ja tsütokiinid, on nad võimelised ka migreeruma. Makrofaagid on metaboolselt aktiivsed rakud, olles mõjutatud hormoonidest, vitamiinidest ja ionide muutustest nende vahetus läheduses (Gordon *et al.*, 2014).

Maksa residentsed makrofaagid on pärit rebukotist ning luuüdi rakkudest diferentseerunud monotsüütidest. Valdav osa nimetab maksa paigalisi makrofaage Kupfferi rakkudeks, et eristada paigalisi ja vereringest pärinevatest monotsüütidest diferentseerunud makrofaage (Ju and Tacke, 2016). Maksas on ligi 80% kogu keha makrofaagidest ning lisaks ka osa verest pärinevatest monotsüütidest. Maksa makrofaagid on portaalalade vahetus läheduses olevad rakud ning nad on otseses kontaktis hepatotsüütidega. Maksas omavad nad raua varuja ja rasvade taseme hoidja kaitsvat rolli. Makrofaagid aitavad maksas ära hoida alkoholi, fibroosi, patogeenide tsirroosi ning teiste jääkainete kahjustusi. Lisaks eelnevale omavad maksa makrofaagid olulist rolli maksa regeneratsioonis (Ju and Tacke, 2016; Gordon *et al.*, 2014). Maksa makrofaagidel on keskne roll maksa homöostaasi tagamises ning kahjustunud maksa patogeneesis, muutes rakuvaheaine paiknemist ning nende komponente. Maksa homöostaasi korral taastuvad paigalised makrofaagid olemasolevatest hematopoeetilistest tüvirakkudest, mis on pärit rebukotist (Gomez Perdiguero *et al.*, 2014).

Lisaks residentsetele Kupfferi rakkudele võib maksas esineda ka värvatud makrofaage. Nimelt tungivad maksakahjustuse korral tsirkuleerivad vere monotsüüdid maksa ja diferentseeruvad värvatud makrofaagideks, aidates kaasa taastumis- ja reorganiseerumisprotsessides. Maksas olevaid makrofaagide eellasi ja makrofaage on võimalik eristada nende päritolu, diferentseerumise, markerite ekspresioonimustri ja funktsionaalsuse alusel (Epelman *et al.*, 2014). Värvatud makrofaagide eellasrakud jaotatakse mitmeteks alatüüpideks vastavalt nende markerite ekspresioonimustrile. Ly-6C/CD11b kõrgelt ekspresseerivad monotsüüdid omavad mitmeid CCR2 kemokiini retseptoreid ja nad on võimelised kahjustunud koesse kiirelt sisenema. Monotsüüdid, mis vähesel määral ekspresseerivad Ly-6C markerit, omavad mitmeid CX3CR1 retseptoreid ning on *in vivo* tingimustes patrulliva iseloomuga (Tacke and Randolph, 2006; Rantakari *et al.*, 2016).

CCl<sub>4</sub> poolt indutseeritud hiire fibrotilises maksas suureneb sissetulevate Ly-6C/CD11b kõrgelt ekspresseerivate monotsüütide arv 5 korda võrreldes maksa paigaliste Kupfferi makrofaagidega. Maksa sissetulevad Ly-6C/CD11b monotsüüdid diferentseeruvad Ly-6C+/CD11b makrofaagideks, mis eritavad põletikku ja fibroosi soodustavaid aineid. Küpsed Kupfferi rakud ekspresseerivad CD68 ja CD169 markereid (Gordon *et al.*, 2014; Ju and Tacke, 2016). Nad on võimelised tapma baktereid, kasutades fagolüsoosoomides asetsevaid reaktiivseid hapnikuradikaale. Täiskasvanud maksa Kupfferi rakud toodavad vähesel määral TNF ja IL-12 tsütokiine. Seevastu värvatud makrofaagid on küll võimelised baktereid fagotsüteerima, kuid nad ei ole võimelised tekitama funktsionaalseid fagolüsoosome. Värvatud makrofaage iseloomustab tsütokiinide TNF ja IL-12 suur tootmisvõime, kuid nad ei suuda efektiivselt baktereid hävitada (Kinoshita *et al.*, 2010). CD32 positiivsed rakud on CD68+ residentsete maksa makrofaagide eellasrakud. CD68+ täiskasvanud makrofaagid on kaotanud tüvirakkudele omaste markerite ekspresioonimustri. Läbivoolutsütomeetria ning immunohistokeemiliste analüüside abil on näidatud, et CD32/CD68+ rakud on suured ja spindlilaadse kujuga, seevastu värvatud makrofaagid on väiksed ja ümara või ovaalse kujuga. Oma vähese fagotsütoosivõime poolest on värvatud makrofaagid ka väga kiirgusresistentsed. Nad tunnevad TOLL-i laadsete ja CD1d retseptorite abil ära bakteri- ja kasvajakarakud ning tootes IL-12 ja TNF tsütokiine, käivitavad kasvajakavastase immuunsuse, kutsudes esile põletikku. IL-12 on tsütokiin, mis aktiveerib NK rakud ja NKT rakud, mis omakorda toodavad interferooni gamma (IFN- $\gamma$ ). IFN- $\gamma$  aktiveerib CD68+ maksa residentseid Kupfferi rakke, mis omakorda suurendavad positiivse tagasiside abil NK ja NKT rakkude aktiivsust. Lisaks sellele on TNF vajalik CD68+ rakkudel, et nad oleksid võimelised tootma reaktiivseid hapnikuradikaale fagolüsoosoomides. Patogeenide

vastu aktiveeritakse mõlemat sorti makrofaagid maksas (Seki *et al.*, 2014; Ju and Tacke, 2016; Kinoshita *et al.*, 2010)

Makrofaagid on põhilised kaasasündinud immuunsüsteemi rakud ning nad on uuteks terapeutilise ravi sihtmärkides mitmetes kroonilistes põletikulistes haigustes. On näidatud, et maksa Kupfferi rakud on võimelised aktiveerima hematopoeetilisi tüvirakke tootes TGF- $\beta$  ja PDGF tsütokiine. Lisaks sellele on nad võimelised tootma mitmeid matriksi metalloproteaase, mille tagajärjel toimub rakuvaheaine degradatsioon ja fibroosi soodustamine (Ju and Tacke, 2016). Uurimaks CD11b+ värvatud makrofaagide puudumisega kaasnevaid muutusi maksas, kasutasid Duffield *et al.* CD11b-difteeria toksiini retseptorit sisaldavaid transgeenseid hiiri, kellele oli tekitatud krooniline CCl<sub>4</sub> kahjustus. Leiti, et CD11b+ makrofaagide vähesuse tõttu pidurdub maksa armkoestumine ning väheneb müofibroblastide ja rakuvaheaine komponentide hulk. Maksa taastumisprotsessis on makrofaagide vähesuse tõttu puudulik vajaminev rakuvaheaine degradatsioon (Duffield *et al.*, 2005).

Samuti on Boulter *et al.* näidanud, et maksakahjustuse korral soodustavad makrofaagid ning müofibroblastid maksa eellasrakkude nišši laienemist, mis soodustab regeneratsiooni. Nimelt toodavad makrofaagid ning müofibroblastid rakuvaheaine molekule, mis soodustavad hepaatiliste eellasrakkude migreerumist ja vohamist. Leiti ka, et Wnt signaalirada on vajalik maksa eellasrakkude diferentseerumisel hepatotsüütideks. Lisaks eelnevale näidati, et regenereeruvast maksast pärit makrofaagid, mis toodavad Wnt3a valgumolekule, on vajalikud hepaatiliste eellasrakkude diferentseerumisel hepatotsüütideks (Boulter *et al.*, 2012).

## 2. EKSPERIMENTAALOSA

### 2.1 Töö eesmärgid

Käesolev töö on osa suuremast projektist, mille eesmärgiks on nii maksa rakkudes ekspresseeruvate markerite, histoloogilise ehituse, kui ka rakuvälise maatriksi muutuste kirjeldamise põhjal moodustada terviklik pilt normaalse ning kahjustatud maksa vahel. Antud tulemused annavad uue suuna leidmaks alternatiivseid võimalusi efektiivsemaks maksahaiguste raviks, kasutades mitmeid rakuteraapia meetodeid. Rakuteraapias kasutatavad tüvirakud on mitmetes kudedes näidanud oma võimekust osaledes nii organogeneesi kui ka regeneratsiooniprotsessides. Ometi on tüvirakkude roll maksakahjustustest paranemisel teadmata. Viimasel ajal on üha enam avaldatud artikleid LGR5+ tüvirakkudest, mis on võimelised diferentseeruma maksakoe rakkudeks. Seetõttu ongi antud uurimustöö uurimisobjektideks laialt aktsepteeritud LGR5 tüvirakkude identiteedi ja nišši uuring.

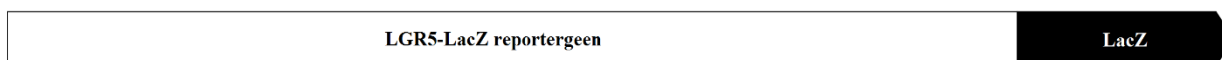
Täpsemalt on käesoleva magistr töö eesmärkideks:

1. Uurida LGR5-positiivsete tüvirakkude markerite repertuaari ja selgitada välja nende identiteet;
2. Kirjeldada LGR5-positiivsete tüvirakkude potentsiaalset tüvirakunišši.

## 2.2 Materjal ja meetodika

### 2.2.1 Kasutatud hiireliinid

Käesolevas töös kasutati LGR5-positiivsete rakkude uurimiseks LGR5-LacZ heterosügootseid hiiri (*Lexicon Pharmaceuticals, USA*). Antud hiireliinis on võimalik detekteerida LGR5 positiivseid rakke LacZ reportergeeni kaudu (Joonis 3 ja 4).



**Joonis 3. LGR5-LacZ heterosügootse hiire reportergeen.** LGR5-LacZ heterosügootsetel hiirtel on LGR5 geeni viimasesse eksonisse sisestatud LacZ järjestus, mis kodeerib  $\beta$  -galaktosidaasi ensüümi.

LGR5-LacZ heterosügootseid hiiri hoiustati ja paaritati Tartu Ülikooli Molekulaar- ja Rakubioloogia Instituudi vivaariumis, kus õhutemperatuur oli 20 $\pm$ 2°C, 12-tunnine valguse/pimeduse tsükkel ning vaba juurdepääs toidule ja joogiveele. Kõik loomkatsed ning operatsioonid viis läbi antud töö üks juhendajatest, Janeli Viil, kes on läbinud katselooma koolituse ning omab loomkatsete tegemiseks ettenähtud tunnistust, mis on kooskõlas Euroopa Parlamendi ja nõukogu direktiivi 2010/63/EL nõuetega.

### 2.2.2 Hiirte genotüüpiseerimine

Genotüüpiseerimiseks vajalik DNA eraldati sabaühest. Igale koeproovile lisati 75  $\mu$ l lüüsipuhvrit (25 mM NaOH, *AppliChem* ja 0,2 mM EDTA pH 8,0, *Sigma-Aldrich*) ning inkubeeriti 95°C 30 minutit. Pärast kuumutamise etappi lisati proovidele 75  $\mu$ l neutraliseerimispuhvrit (40 mM Tris-HCl pH 5), millele järgnes 1 minut segamist vortexil. Saadud DNA lahuseid hoiustati -20°C juures.

LGR5 genotüübi kindlakstegemiseks kasutati polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR). Tabelis 1 on välja toodud kasutatud praimerite järjestused, reaktsiooni käigus saadavate produktide pikkus ning sihtmärk DNA.

**Tabel 1.** Kasutatud PCR-i praimerid. F- pärisuunaline; R- vastassuunaline; wt- metsiktüüp ehk positiivne kontroll; bp- aluspaar

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

PCR reaktsiooni jaoks valmistati 20 µl lõppmahuga reaktsioonisegu, mis sisaldas *FIREPol® Master Mix* puhvrit (*Solis BioDyne*), 50 pg eeltoodud praimereid ning 2 µl DNA-d, mis viidi lõppruumalani lisades Milli-Q vett. PCR reaktsioon viidi läbi *Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler* (*Life Technologies*) masinas, kasutades alltoodud parameetreid:

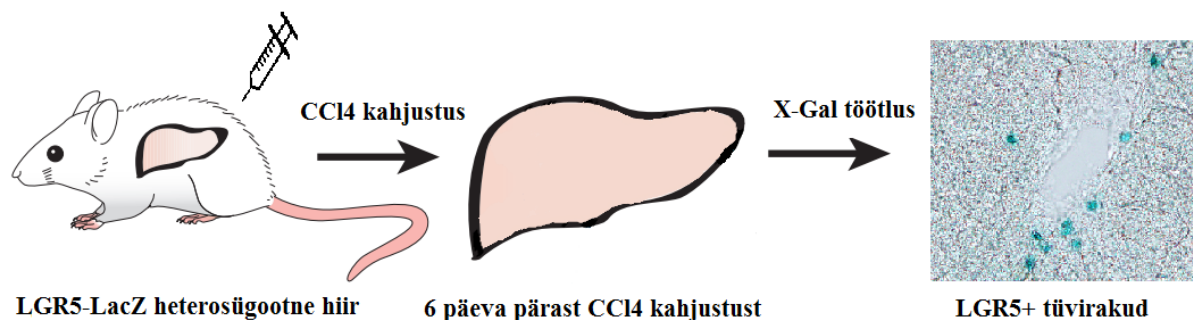
Etapid	Temperatuur	Aeg	
Algne denaturatsioon	94 °C	5 minutit	
Denaturatsioon	94 °C	30 sekundit	<b>30 tsüklit</b>
Praimerite seondumine	64 °C	30 sekundit	
Elongatsioon	72 °C	30 sekundit	
Lõplik ekstensioon	72 °C	5 minutit	

Pärast PCR reaktsiooni hinnati PCR produkte agaros-geelelektroforeesi abil. Selle jaoks valmistati 1,5%-line agarosgeel (*Lonza*), kuhu lisati UV-valgusel fluorestseeruvat etiidiumbromiidi lõppkontsentratsiooniga 0,01 µg/µl. PCR produktide pikkused tehti kindlaks, kasutades 50 aluspaari suurust DNA markerit (*50 bp DNA ladder, Thermo Scientific*).

### 2.2.3 CCl<sub>4</sub> kahjustuse tekitamine ja maksakoe külmutamine

LGR5+ tüvirakkude esilekutsumiseks kasutati maksa süsiniktetrakloriid (CCl<sub>4</sub>) kahjustust (Joonis 4). CCl<sub>4</sub> kahjustus kujutab endas nii inimese maksafibroosi kui ka maksatsirroosi tekkemehhanismi sobivaid mudeleid (Cameron and Karunaratne, 1936). Kahjustused tekitati vähemalt 49 päeva vanustel täiskasvanutel hiirtel. CCl<sub>4</sub> kahjustuse korral süstiti hiirtele intraperitonaalselt vastavalt kehamassile 1µl/g 20%-list kemikaali (*Acros Organics*) lahustatuna rapsiõlis. Nii meie töörühmas kui ka Huch *et al.* poolt on varasemalt näidatud, et kuuendal päeval pärast kahjustust tekib maksakoesse kõige enam LGR5+ tüvirakke (Huch *et al.*, 2013; Lõhmussaar, 2015), seetõttu eutaniseeriti hiired antud ajapunktis. Maksakude fikseeriti 4% PFA lahusega perfuseerides maksa portaalveeni sisestatud süstla abil. Seejärel inkubeeriti koetükke 30%-lises sahharosiilahuses 4°C juures seni kuni maksatükk lahuse põhja

vajub. Töödeldud maksaproovid asetati külmutamiseks mõeldud krüovormidesse (*Sakura Finetek*) ning kaeti *Tissue-Tek O.C.T. Compound* (*Sakura Finetek*) külmutusseguga. Proovid külmutati vedelas lämmastikus jahutatud isopentaani (*AppliChem*) lahuses ning hoiustati  $-80^{\circ}\text{C}$  juures.



**Joonis 4. LGR5+ tüvirakkude tuvastamine.** Kui lisada substraadina X-gal-i siis  $\beta$  -galaktosidaas katalüüsib X-gal-i, mille järel tekib LGR5+ tüvirakkudes sinakas värvireaktsioon. Modifitseeritud (Huch *et al.*, 2013).

#### 2.2.4 X-gal töötlus

Külmutatud proovidest lõigati krüostaatmikrotoomiga (*Slee Technik MEV*)  $5\ \mu\text{m}$  paksused koelõigud ja asetati spetsiaalsele *StarFrost adhesive* (*Waldermar Knittelglass*) alusklaasile. Klaasidele lõigatud koelõike hoiti üleliigse vee aurustamiseks tund aega toatemperatuuril ning hoiustati  $-20^{\circ}\text{C}$  juures. X-gal töötluste jaoks inkubeeriti lõike 5 minutit lahjenduspuhvril, mis sisaldas  $2\text{mM MgCl}_2$  (*AppliChem*) ja  $0,01\%$  Nonidet P-40 (*AppliChem*) 1X PBS-is. Töölause tegemiseks lisati lahjenduspuhvrile  $5\text{mM}$  lõppmolaarsusega  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  (*Sigma-Aldrich*) ja  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$  (*Sigma-Aldrich*) ning 5-bromo-4-klooro-3-indool-b-D-galaktopüranosiid (X-gal,  $20\ \text{mg/ml}$ , *Sigma-Aldrich*) lahust N,N-dimetüülformamiidis (DMF, *Acros organics*) suhtes 1:40-le. Inkubatsioon X-gal töölausega toimus üleöö  $37^{\circ}\text{C}$  pimedas kapis niisutatud kinnises kambris. Järgmisel päeval eemaldati klaasidelt X-gal töölause, pesti lõike 2 korda 5 minutit X-gal lahjenduspuhvril ning jätkati immunofluorestsentsanalüüsiga.

### 2.2.5 Immunofluorestsentsanalüüs

Pärast X-gal reaktsiooni lisati igale koelõigule 100 µl antikehade mittespetsiifilist seondumist blokeerivat 1% lõssilahust (*AppliChem*) 1X PBS-is, mis sisaldas lisaks rakke permeabiliseerivat 0,3% TritonX-100 (*AppliChem*) ja inkubeerimine toimus 30 minutit toatemperatuuril, millele järgnes pesu 2 korda 1X PBSis 5 minutit. Seejärel blokeeriti koelõike täiendavalt 4% eesli seerumiga 1X PBS lahuses 30 min toatemperatuuril. Pärast blokeerimist inkubeeriti koelõike primaarsete antikehadega (Tabel 2) üleöö 4°C juures niisutatud kambris.

Järgneval päeval pesti koelõike 1X PBS-iga 3 korda 5 minutit, millele järgnes inkubeerimine sekundaarsete antikehadega (Tabel 3) toatemperatuuril, pimedas niisutatud kambris 1 tund. Inkubatsiooni järel pesti alusklaase 3 korda 5 minutit 1X PBS-iga. Rakutuomad tehti nähtavaks DAPI lahusega (lõppkontsentratsioon 1 µg/ml, *Sigma*) 1X PBS-is, millele järgnes pesu 2 minutit 1X PBS lahusega. Proovid sulundati *Fluorescent Mounting Medium* lahusega (*Dako*). Immunofluorestsentsanalüüsi katseid teostati vähemalt kolm korda. Prepraate vaadeldi ja pildistati Olympus BX51 fluorestsentsmikroskoobiga ning töödeldi *Hokawo* (*Hamamatsu Photonics*) ning *ImageJ* (*National Institutes of Health*) pilditötluse programmidega.

**Tabel 2.** Antikehad ja nende lahjendused

<b>Antikeha</b>	<b>Peremeesloom,kloon/kataloogi nr</b>	<b>Allikas</b>	<b>Lahjendus</b>
$\alpha$ SMA	Küülik, 5264-1	Epitomics	1:500
ALB	Kits, SC-46291	Santa Cruz Biotechnology	1:50
CD11b	Rott, M1/70, 557397	BD Pharmigen	1:100
CD133	Rott,13A4, 12-1331-82	eBioscience	1:100
CD169	Rott, kingitus P. R. Crockerilt, SER-4 , 3D6-1	P. R. Crocker	1:500
CD45	Rott, 30-F11, 12-0451-82	eBioscience	1:100
CD68	Rott, FA-11, 12-0681-82	eBioscience	1:100
F4/80	Rott, MCA497A647	BIORAD	1:50
MUP1	Kits, GAM/MUP, 6751	Nordic Immunology	1:200
OPN	Kits, AF808	R&D Systems	1:200
Sox9	Küülik, AB5535	Millipore	1:100
Col IV	Küülik, AB6586	Santa Cruz Biotechnology	1:200

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

<b>Sekundaarsed antikehad</b>	<b>Peremeesloom, kataloogi nr</b>	<b>Allikas</b>	<b>Lahjendus</b>
Eeslis toodetud rotivastane Alexa 488 konjugeeritud antikeha	Eesel, A21208	Thermo Fisher Scientific	1:1000
Eeslis toodetud kitsevastane Alexa 488 konjugeeritud antikeha	Eesel, A11055	Thermo Fisher Scientific	1:1000
Eeslis toodetud küülikuvastane Alexa 488 konjugeeritud antikeha	Eesel, A21206	Thermo Fisher Scientific	1:1000
Eeslis toodetud kitsevastane Alexa 594 konjugeeritud antikeha	Eesel, A11058	Thermo Fisher Scientific	1:1000
Eeslis toodetud rotivastane Alexa 594 konjugeeritud antikeha	Eesel, A21209	Thermo Fisher Scientific	1:1000
Eeslis toodetud küülikuvastane Alexa 594 konjugeeritud antikeha	Eesel, A21207	Thermo Fisher Scientific	1:1000
Eeslis toodetud rotivastane Alexa 647 konjugeeritud antikeha	Eesel, 712-605-153	Jackson Immuno Research	1:1000
Eeslis toodetud küülikuvastane Alexa 647 konjugeeritud antikeha	Eesel, A31573	Thermo Fisher Scientific	1:1000

## 2.2.6 FACS analüüs

### 2.2.6.1 Hiirte anesteerimine

Operatsiooni tarvis anesteseeriti hiired *Hypnorm* (fentanüülstritraat 0,315 mg/ml; fluanision 10 mg/ml) ja *Dormicum* (midasolaam 5 mg/ml) 1:1 seguga, kumbki anesteetikum lahjendati enne kasutamist 1:5 ddH<sub>2</sub>O-s, ning annustati intraperitoneaalselt süstla abil 10 µl/g kehakaalu kohta. Hiirte anesteesia teostas vastavat luba omav Tartu Ülikooli Molekulaar- ja Rakubioloogia Instituudi vivaariumi juhataja Sulev Kuuse.

### 2.2.6.2 Maksarakkude eraldamine

Anesteesias hiirel avati kääridega kõhuõõs ning sisestati kanüül portaalveeni. Maksa perfuseeriti 37°C juures eelsoojendatud etüleen-glükool-tetra-atseethappe (EGTA) lahusega, mis sisaldas 125mM EGTA-d (*AppliChem*) Krebs-Ringeri puhvrts (175mM NaOH, 24mM NaHCO<sub>3</sub>, 20mM glükoos, 5mM HEPES pH 7.45, 4.8mM KCl, 1,2mM MgSO<sub>4</sub>XH<sub>2</sub>O, 1,2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Milli-Q; lõplik lahuse pH 7,4). Pärast lahuse jõudmist maksa lõigati läbi maksa alumine õõnesveen, millega tagati vere väljapääs maksast. Perfusioon EGTA lahusega kestis 5 minutit kiirusel 3-4 ml/min. Seejärel perfuseeriti maksa 15 minutit 37°C juures eelsoojendatud kollagenaasi lahusega Krebs-Ringeri puhvrts, mis sisaldas 1M CaCl<sub>2</sub> (*Sigma-aldrich*) ja 0,45 mg/ml kollagenaas II-te (*Gibco*). Kollagenaasi toimel vabanevad maksarakud rakuvaheainest. CD32+/CD68+ rakke on võimalik maksast eraldada vaid pärast maksa kollagenaasi töötlust. CD11b+ rakke on võimalik maksast eraldada ka ilma kollagenaasi töötluseta (Seki *et al.*, 2014). Perfusiooni jaoks kasutati tilguti ja voolikuga ühendanud vedelikupumpa (*Pharmacia LKP*).

Pärast perfusiooni eemaldati maks ettevaatlikult hiire kõhuõõnest ning asetati koekultuuri tassile, kuhu oli eelnevalt lisatud väikses koguses külma 1X PBS lahust, mis sisaldas kuumutamiseks inaktiveeritud 5% FBS-i (*Pan Biotech*). Seejärel eemaldati maksa õhuke Glisson'i kapsel ning raputati maksakudet pinsettide vahel üherakulise suspensiooni saamiseks ning tõsteti 50 milliliitri tuubi kohale asetatud 70 µm nailonfiltrile (*BD Falcon*) ning lasti suspensioonil läbi filtri tuubi liikuda. Tuubi kogunenud rakesuspensioon asetati jääle ning jätkati fraktsioneeriva tsentrifuugimisega hepatotsüütide ning maksa mitteparenhümaalsete rakkude (NPC) eraldamisega. Kõik tuubid olid kaetud 5% veise seerum albumiini (BSA, *Applichem*) lahusega.

Eeltoodud maksa perfuseerimise ja maksarakkude isoleerimise meetod töötati välja roti näitel juba 1970ndatel aastatel (Seglen, 1976).

### 2.2.6.3 LGR5+ rakkude FACS analüüs

Järgnevalt jätkati hiire maksast kättesaadud rakususpensiooni tsentrifuugimisega raskuskiirendusega 50xg 2 minutit 4°C juures. Tsentrifugimisejärgselt jäid sademesse hepatotsüüdid ning supernatanti NPC-d. Supernatant koos NPC-dega tõsteti uude tuubi ning allesjäänud sademele lisati 10 ml külma 1X PBSi. Eeltoodud etappi korrati kahel korral, et saada kätte kõik NPC-d. Seejärel tsentrifuugiti supernatandiga tuube täiendavalt 10 minutit 300xg 4°C juures, mille tulemusel sadenesid NPC-d. Sademelt eemaldati liigne vedelik ning NPC-d suspendeeriti 1 ml *BD Pharm Lyse TM* puhvris (*BD biosciences*) ning inkubeeriti erütrotsüütide lüüsimise eesmärgil 15 minutit 4°C juures. Pärast erütrotsüütide lüüsimise etappi lisati rakkudega lahusele 5 ml külma 1X PBSi ning tsentrifuugiti rakke 5 minutit 300xg 4°C juures. Rakud suspendeeriti 100 µl Staining meediumis (4% FBS (*Pan Biotech*), 10mM HEPES (*AppliChem*) 1X PBS-is), kuhu lisati 1mM klorokviini lahust (*Thermo Fischer Scientific*) ning soojendati 37°C juures 30 minutit vesivannil. Samal ajal valmistati FDG lahus, mis sisaldas 20mM fluorestsüüdiin Di-β-D-galaktopüranosiid (FDG, *Thermo Fischer Scientific*) Milli-Q-s ning soojendati lahust 37°C juures 10 minutit. Seejärel lisati rakkudega lahusele 100 µl FDG lahust ning inkubeeriti 37°C juures 1 minut. FDG reaktsioon peatati, lisades rakkudega lahusele 1.8 ml Staining meediumit ning inkubeerides jääl 15 minutit. Pärast FDG töötamise etappi lisati rakkudele täiendavalt 2 ml Staining meediumit ning rakke tsentrifuugiti 300xg 5 minutit 4°C juures. Seejärel supernatant aspireeriti ja rakud suspendeeriti 100 µl-s 1%-lises külmas BSA (*AppliChem*) lahuses, mis sisaldas Fc blokeerimislahust (1:50) (Tabel 4) ning blokeerimine toimus pimedas jääl 30 minutit. Seejärel lisati rakkudele tabelis 4 välja toodud erinevate fluorokroomidega konjugeeritud antikehade lahused ja inkubeeriti pimedas jääl 45 minutit aegajalt suspendeerides. Inkubatsiooniaja lõppedes lisati igasse tuubi 5 ml külma 1% BSA (*AppliChem*) lahust ning tsentrifuugiti suspensioone 300xg 4°C 5 minutit. Pärast tsentrifuugimist aspireeriti supernatant ning sademele lisati 200 µl surnud rakke märgistavat külma DAPI (*Sigma*) lahust 1X PBSis (1:2000), misjärel jätkati rakkude analüüsi *BD FACSAria* rakusorteri abil. Kõiki tuube hoiti igal võimalikul hetkel jääl. FACS analüüsi teostati kolm korda. Tulemusi analüüsiti *BD FacsDIVA* programmi abil.

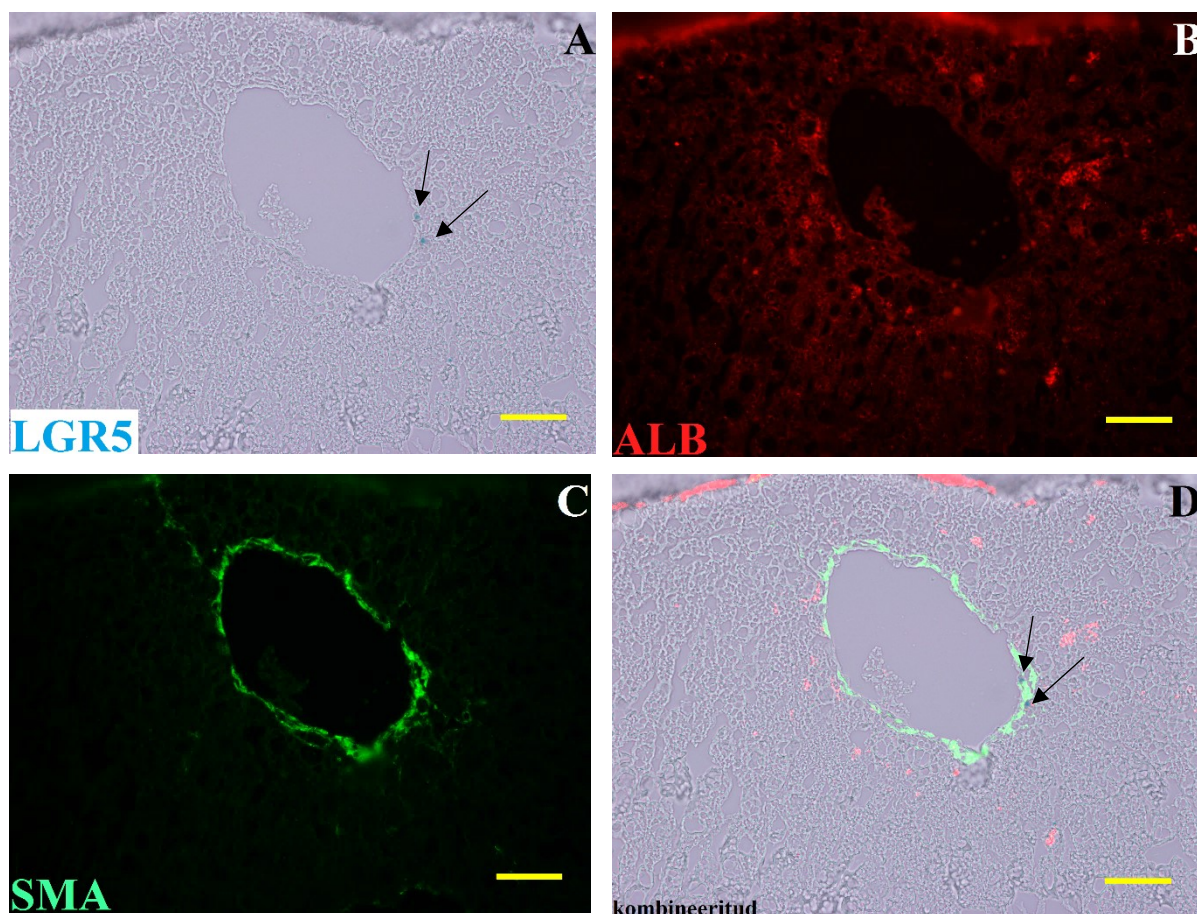
**Tabel 4.** FACS antikehad

Antikeha	Peremeesloom,kloon/kataloogi nr	Allikas	Lahjendus
CD11b-PE	Rott, M1/70, 557397	BD Pharmigen	1:100
F4/80-647	Rott, MCA497A647	BIORAD	1:50
Fc block	Rott, 2.4G2, 553141	BD Pharmigen	1:50

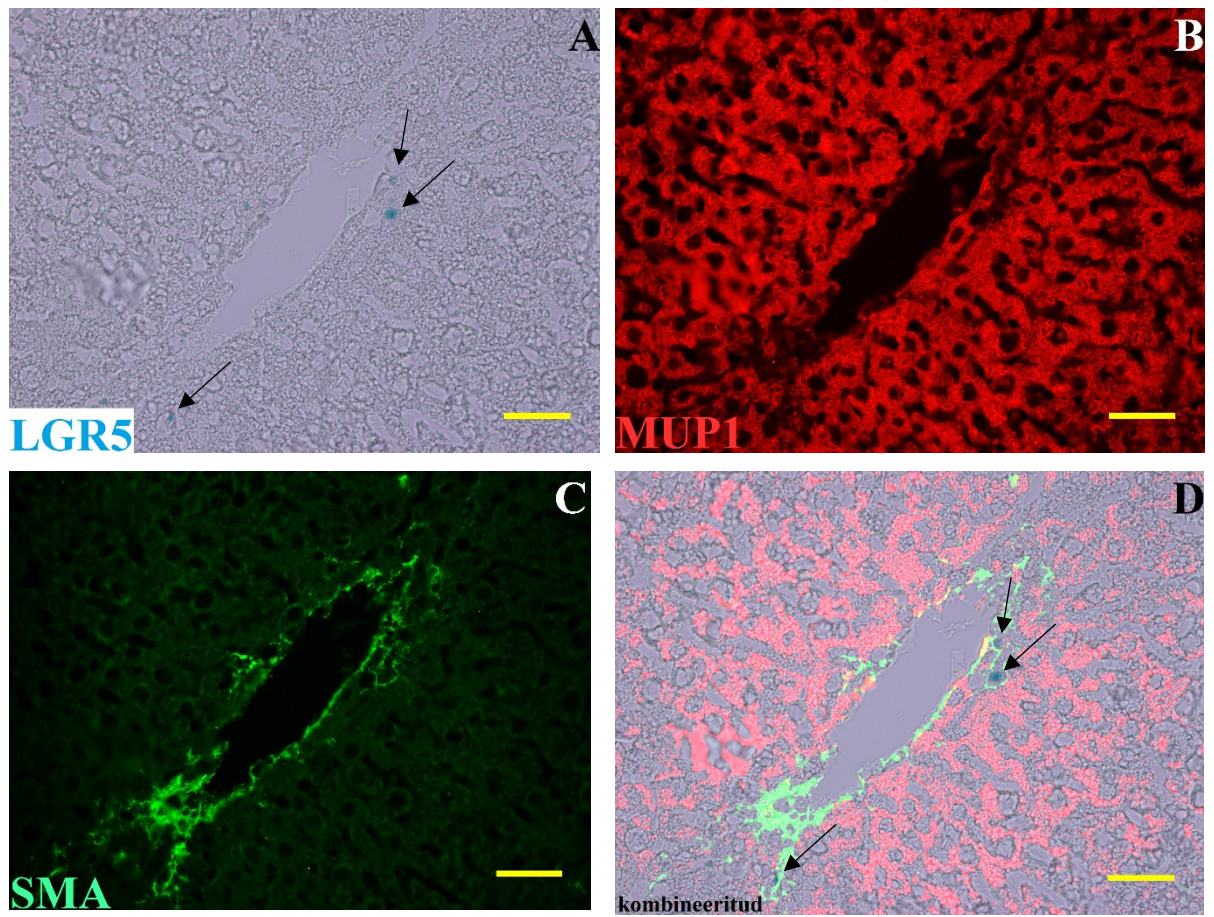
## 2.3 TULEMUSED

### 2.3.1 LGR5+ tüvirakud ei ekspresseeri ALB ja MUP1 hepatotsüüdimarkereid

Hepatotsüüdid ekspresseerivad ALB, MUP1 ning HNF4- $\alpha$  (Zhou *et al.*, 2009; Germain *et al.*, 1988; Costa *et al.*, 2003). Meie töögrupis on varasemalt leitud, et LGR5+ tüvirakud ei ekspresseeri HNF4- $\alpha$  (Lõhmussaar, 2015). Et kindlaks teha, kas LGR5 positiivsed tüvirakud ekspresseerivad ALB ja MUP1, värvisime kahjustatud maksa (kuus päeva pärast CCl<sub>4</sub> manustamist) ALB ja MUP1 vastaste antikehadega. Immunofluorestsentsanalüüsi tulemusena selgus, et LGR5+ tüvirakud ei ekspresseeri ALB (Joonis 5, D) ega MUP1 hepatotsüüdimarkereid (Joonis 6, D).



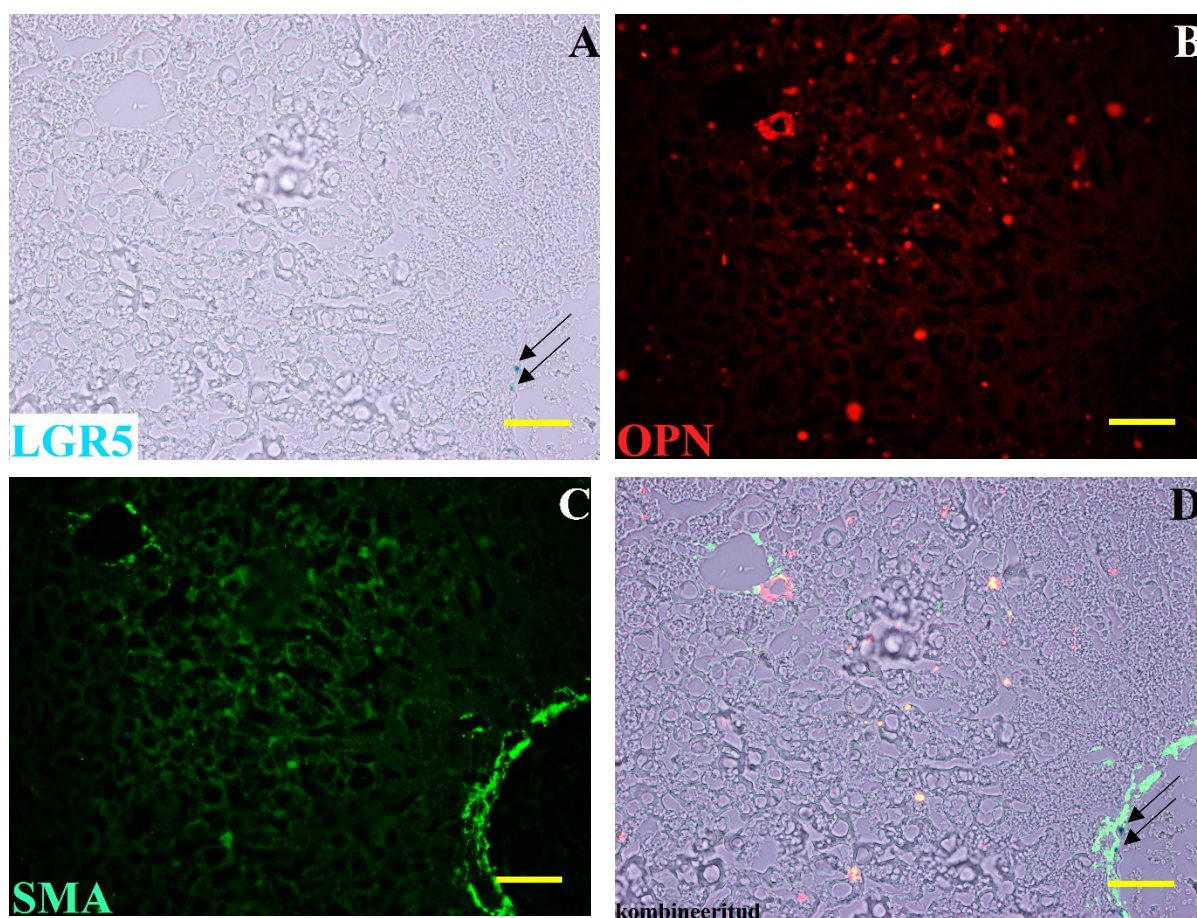
**Joonis 5. LGR5+ tüvirakud ei ekspresseeri ALB markerit.** CCl<sub>4</sub> akuutse kahjustusega hiire maksa, mis läbis X-gal töötamise (A), värviti ALB (B) ja  $\alpha$ SMA (C) vastaste antikehadega. Katse tulemusena selgus, et LGR5+ rakud ei ekspresseeri hepatotsüüdimarkerit ALB (B). Immunofluorestsentsanalüüsi tulemusena leiti, et SMA positiivsed müofibroblastid ümbritsevad LGR5+ rakke. Nooled osutavad tsentraalveeni juures paiknevale LGR5+ tüvirakkudele. Piltide mõõtkava 50  $\mu$ m.



**Joonis 6. LGR5<sup>+</sup> tüvirakud ei ekspresseeri MUP1 markerit.** CCl<sub>4</sub> akuutse kahjustusega hiire maksa, mis läbis X-gal töötluste (A), värviti MUP1 (B) ja  $\alpha$ SMA (C) vastaste antikehadega. Katse tulemusena selgus, et LGR5<sup>+</sup> rakud ei ekspresseeri hepatotsüüdimarkerit MUP1 (B). Lisaks selgus, et SMA positiivsed müofibroblastid ümbritsevad LGR5<sup>+</sup> rakke. Nooled osutavad tsentraalveeni juures paiknevatele LGR5<sup>+</sup> tüvirakkudele. Piltide mõõtkava 50  $\mu$ m.

### 2.3.2 LGR5+ tüvirakud ei ekspresseeri sapijuharakkude ja maksa progenitorrakkude markerit OPN

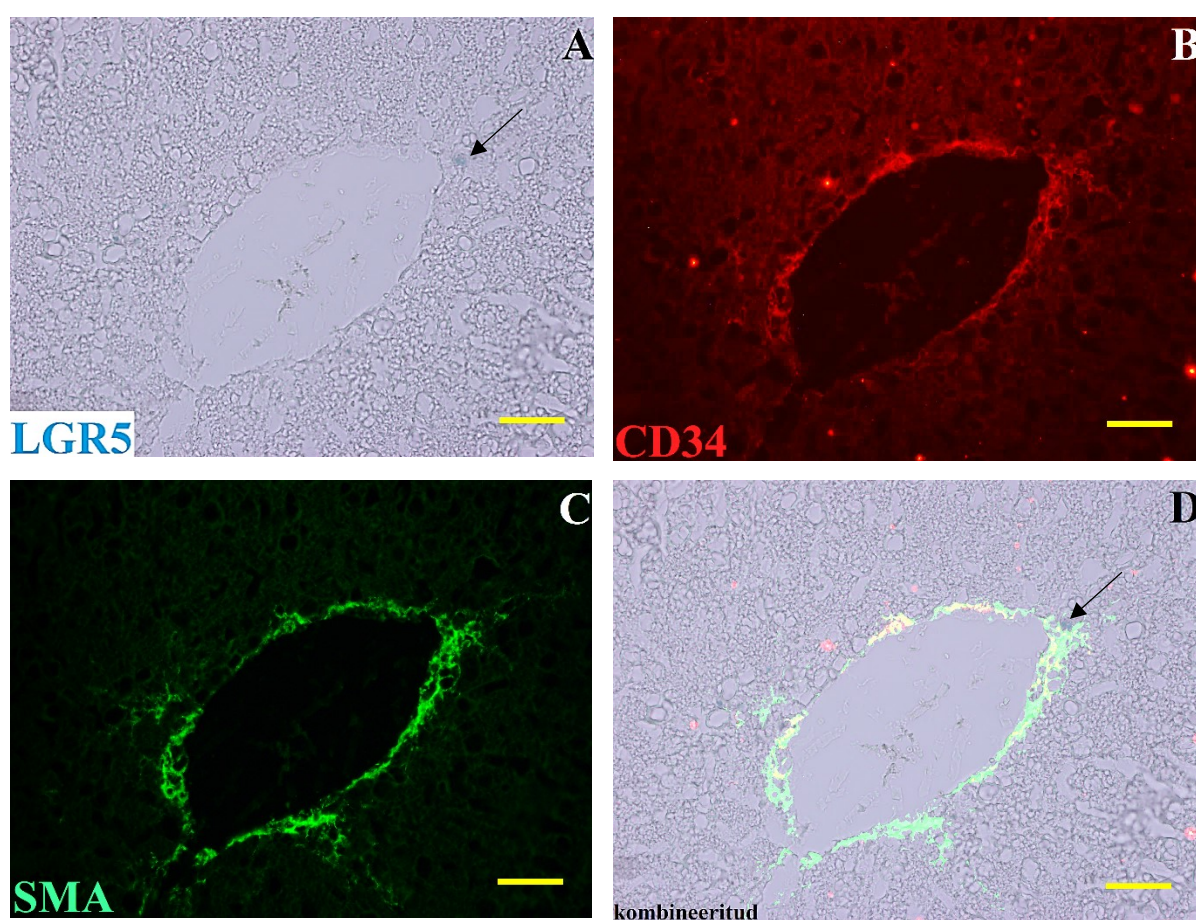
Järgnevalt tekkis meil küsimus, kas LGR5 positiivsed tüvirakud võivad olla positiivsed sapijuharakkude ja maksa progenitorrakkude markerite suhtes. Sapijuharakud ekspresseerivad CK19 ja OPN. On näidatud, et ka maksa progenitorrakud ekspresseerivad OPN (Jain *et al.*, 2010; Nagoshi, 2014). Varasemalt on meie töögrupp kindlaks teinud, et LGR5+ rakud ei ekspresseeri CK19 markerit (Lõhmussaar, 2015). Immunofluorestsentsanalüüsi tulemuse põhjal selgus, et LGR5+ tüvirakud ei ekspresseeri ka OPN sapijuhamarkerit (Joonis 7, D).



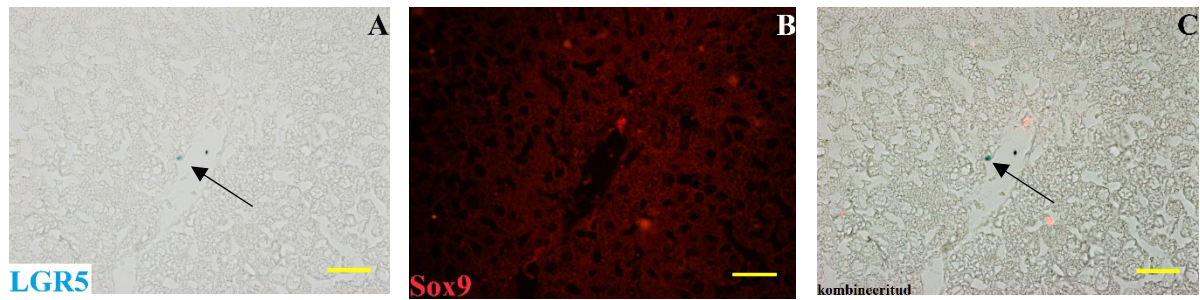
**Joonis 7. LGR5+ tüvirakud ei ekspresseeri OPN markerit.** CCl<sub>4</sub> akuutse kahjustusega hiire maksa, mis läbis X-gal töötluste (A), värviti OPN (B) ja  $\alpha$ SMA (C) vastaste antikehadega. Katse tulemusena selgus, et tsentraalveeni juures paiknevad LGR5+ rakud ei ekspresseeri sapijuhamarkerit OPN (B). Immunofluorestsentsanalüüsi tulemusena leiti, et SMA positiivsed müofibroblastid ümbritsevad LGR5+ rakke. Nooled osutavad tsentraalveeni juures paiknevatele LGR5+ tüvirakkudele. Piltide mõõtkava 50  $\mu$ m.

### 2.3.3 LGR5+ tüvirakud on CD34<sup>-</sup>, Sox9<sup>-</sup>, CD133<sup>-</sup>, CD45<sup>+</sup>

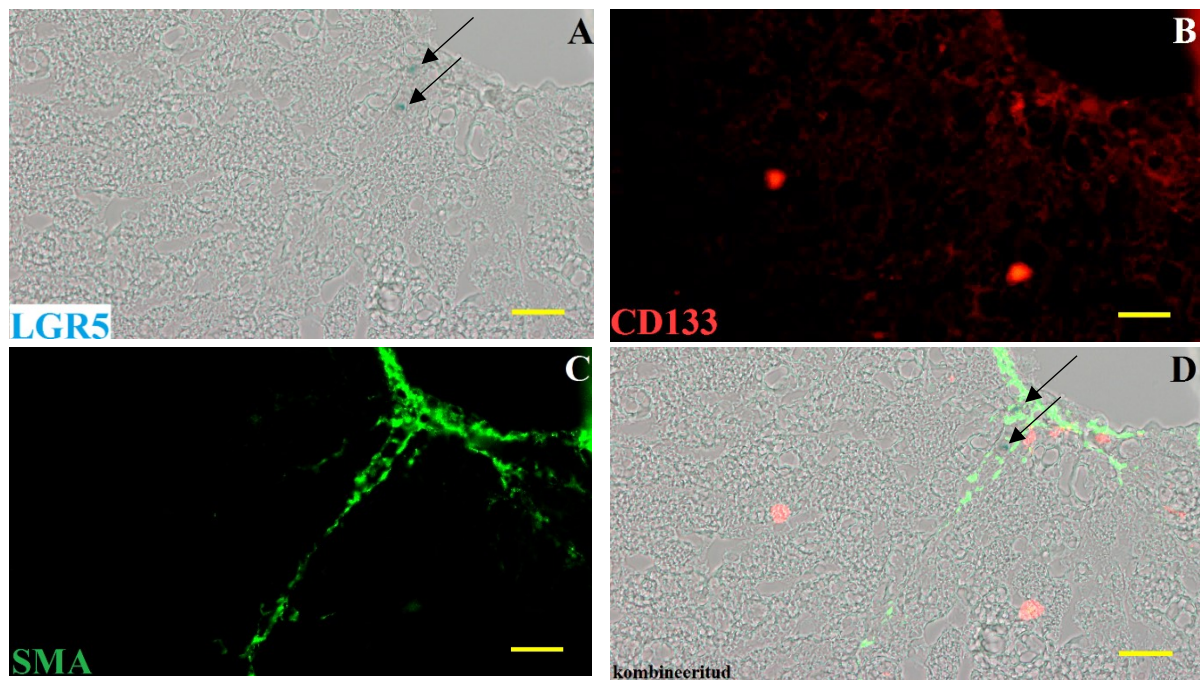
Lisaks OPN markerile on varasemalt näidatud, et maksa progenitorrakkudes ekspresseeruvad CD34, Sox9, CD133 ja CD45 valgumolekulid (Petersen, 2003; Furuyama *et al.*, 2011; Yovchev *et al.*, 2007). Uurimaks, kas LGR5 positiivsed tüvirakud ekspresseerivad antud markereid, värvisime kahjustatud maksa CD34, Sox9, CD133 ja CD45 vastaste antikehadega. Immuno-fluorestsentsanalüüs näitas, et LGR5+ rakupopulatsioon on negatiivne nii hematopoeetilise tüvirakumarkeri CD34 (Joonis 8, D), maksa eellasrakkude markeri Sox9 (Joonis 9, C) kui ka kasvaja tüvirakumarkeri CD133 (Joonis 10, D) suhtes. Samas aga leiti, et LGR5+ tüvirakud ekspresseerivad vereloomekoest pärinevate rakkude markerit CD45 (Joonis 11, D).



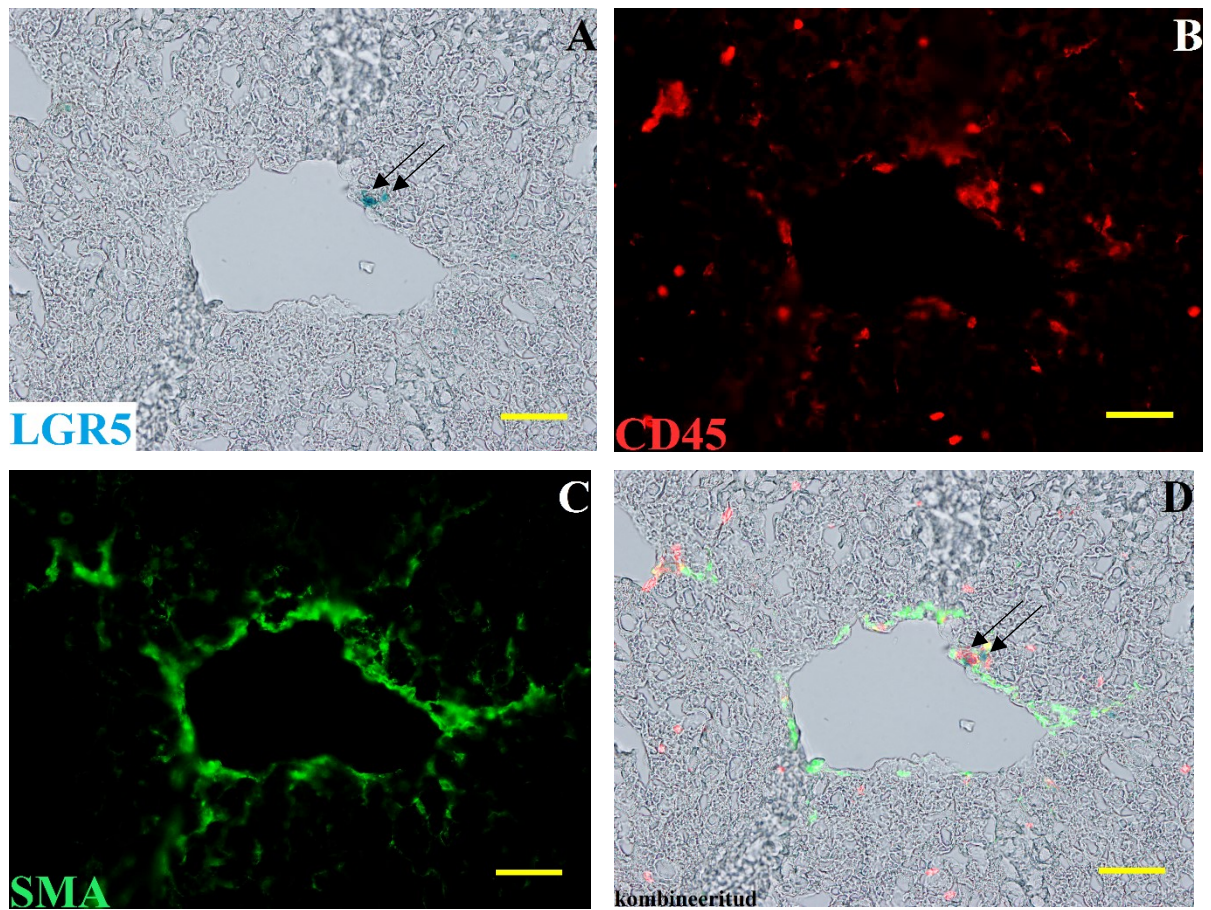
**Joonis 8. LGR5+ tüvirakud ei ekspresseeri CD34 markerit.** CCl<sub>4</sub> akuutse kahjustusega hiire maksa, mis läbis X-gal töötluste (A), värviti CD34 (B) ja  $\alpha$ SMA (C) vastaste antikehadega. Katse tulemusena selgus, et LGR5+ rakud ei ekspresseeri hematopoeetilist tüvirakumarkerit CD34 (B). Lisaks selgus, et SMA positiivsed müofibroblastid ümbritsevad LGR5+ rakke. Nooled osutavad tsentraalveeni juures paiknevatele LGR5+ tüvirakkudele. Piltide mõõtkava 50  $\mu$ m.



**Joonis 9. LGR5+ tüvirakud ei ekspresseeri Sox9 markerit.** Värviti Sox9 vastase antikehaga (B) CCl<sub>4</sub> akuutse kahjustusega hiire maksa, mis läbis X-gal töötluste (A). Katse tulemusena selgus, et LGR5+ rakud ei ekspresseeri Sox9 tüvirakumarkerit (C). Nooled osutavad tsentraalveeni juures olevatele LGR5+ tüvirakkudele. Piltide mõõtkava 50 µm.



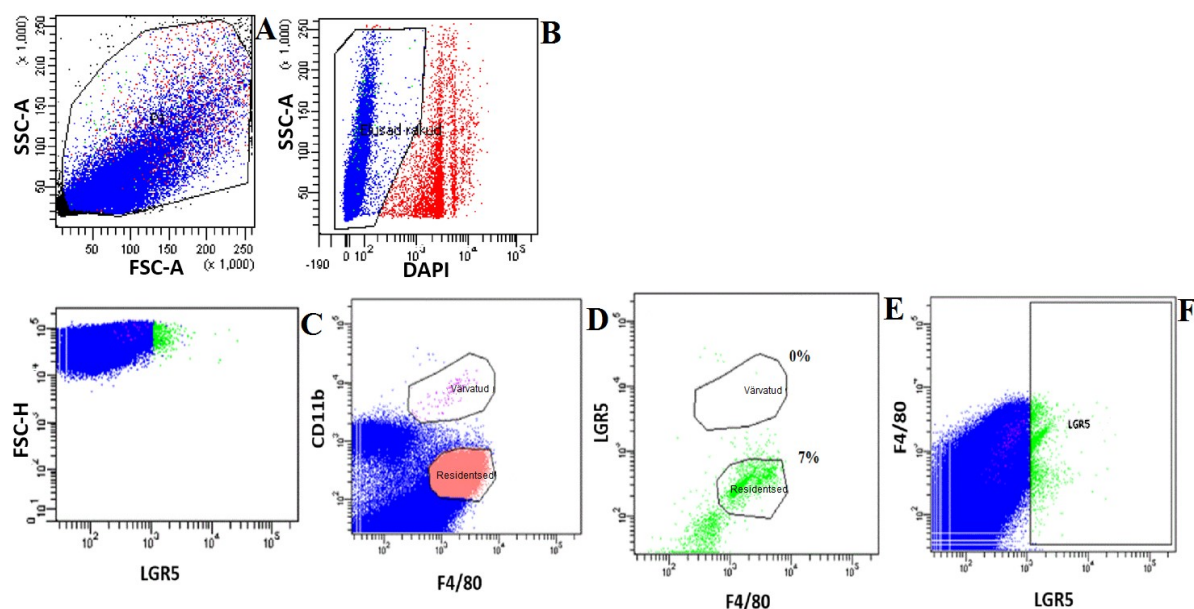
**Joonis 10. LGR5+ tüvirakud ei ekspresseeri CD133 markerit.** CCl<sub>4</sub> akuutse kahjustusega hiire maksa, mis läbis X-gal töötluste (A), värviti CD133 (B) ja  $\alpha$ SMA (C) vastaste antikehade. Katse tulemusena selgus, et LGR5+ rakud ei ekspresseeri CD133 kasvaja tüvirakumarkerit (D). Lisaks selgus, et SMA positiivsed müofibroblastid ümbritsevad LGR5+ rakke. Nooled osutavad tsentraalveeni juures paiknevatele LGR5+ tüvirakkudele. Piltide mõõtkava 25 µm.



**Joonis 11. LGR5+ tüvirakud ekspresseerivad CD45 markerit.** CCl<sub>4</sub> akuutse kahjustusega hiire maksa, mis läbis X-gal töötluste (A), värviti CD45 (B) ja  $\alpha$ SMA (C) vastaste antikehadega. Katse tulemusena selgus, et LGR5+ rakud ekspresseerivad vereloomerakumarkerit CD45 (D). Lisaks leiti, et SMA positiivsed müofibroblastid ümbritsevad LGR5+ rakke. Nooled osutavad tsentraalveeni läheduses olevatele LGR5+ tüvirakkudele. Piltide mõõtkava 50  $\mu$ m.

### 2.3.4 LGR5+ tüvirakkude analüüs FACS meetodiga

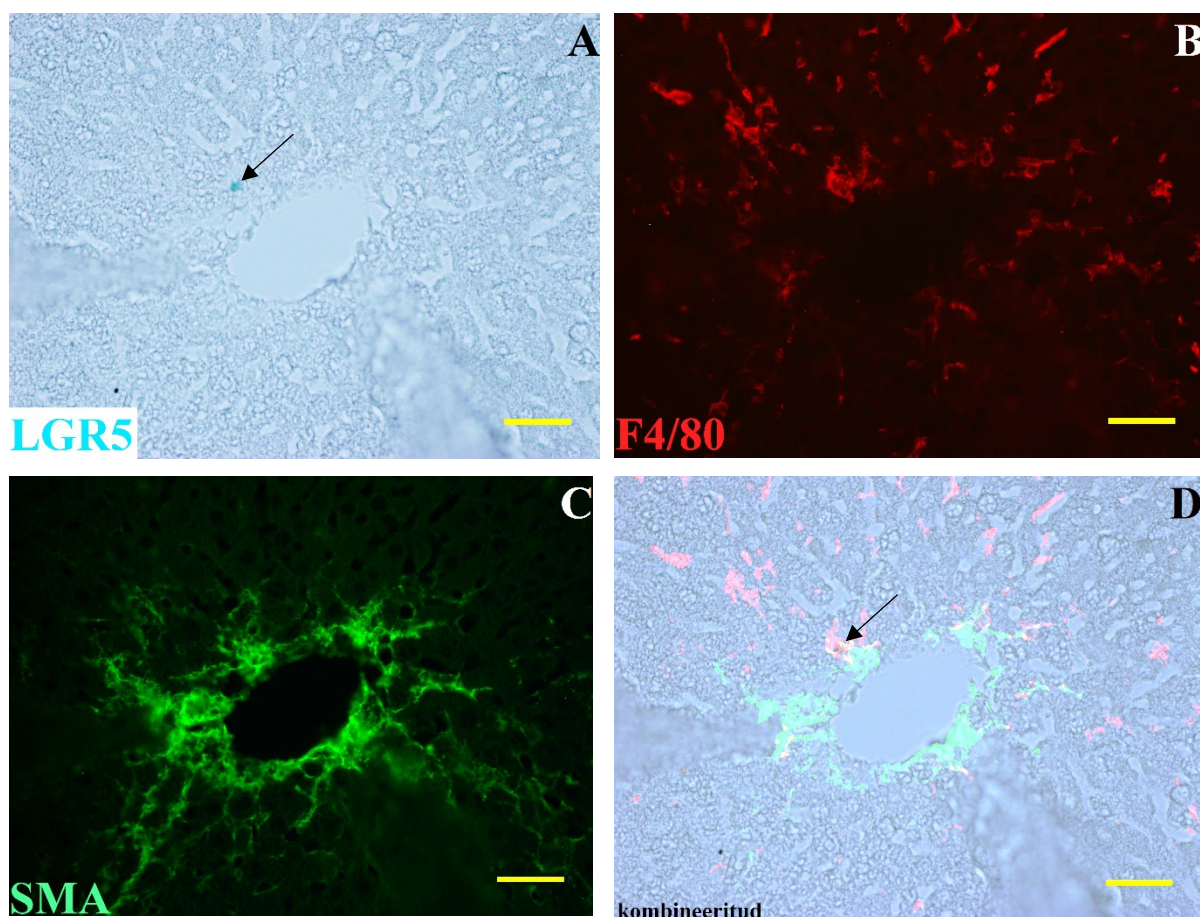
On teada, et LGR5 positiivsed tüvirakud kuuluvad maksa mitteparenhümaalsesse fraktsiooni (Lõhmussaar, 2015). Arvestades varasemalt meie töögrupis saadud tulemusi, mis vihjasid LGR5+ tüvirakkude hematopoetilisele päritolule, küsisime, kas tegemist ei võiks olla makrofaagi-taoliste rakkudega. Selleks analüüsisime maksakoest eraldatud rakulist materjali läbivoolutsütomeetria (FACS) abil. FACS võimaldab kvantitatiivselt hinnata erinevaid markereid ekspresseerivate rakkude osahulka maksa tervikpopulatsioonis. Kuna nii vereloomekoest pärinevad rakud kui ka LGR5+ rakud asuvad maksa mitteparenhümaalsete rakkude fraktsioonis, siis uuriti vaid antud populatsiooni. Mitteparenhümaalsetest maksarakkudest uuriti vaid elusaid rakke, mis olid DAPI värvingu suhtes negatiivsed (Joonis 12, B). LGR5+ rakud märgistati beeta-galaktosidaasi aktiivsuse abil, nagu kirjeldatud „Materjali ja meetodika“ osas, ning värviti F4/80 ja CD11b vastaste antikehadega, et identifitseerida maksa residentsed ning värvatud makrofaagid. Värvate valikul toetuti Rantakari *et al.* artiklile (Rantakari *et al.*, 2016) (LISA 2, Joonis 1). Mitteparenhümaalsete elusrakkude FACS analüüsil leiti, et LGR5+ tüvirakud ekspresseerivad maksa residentsetele makrofaagidele sarnaselt markerit F4/80 ja madalal tasemel või üldse mitte värvatud makrofaagide markerit CD11b (Joonis 12, D-E).



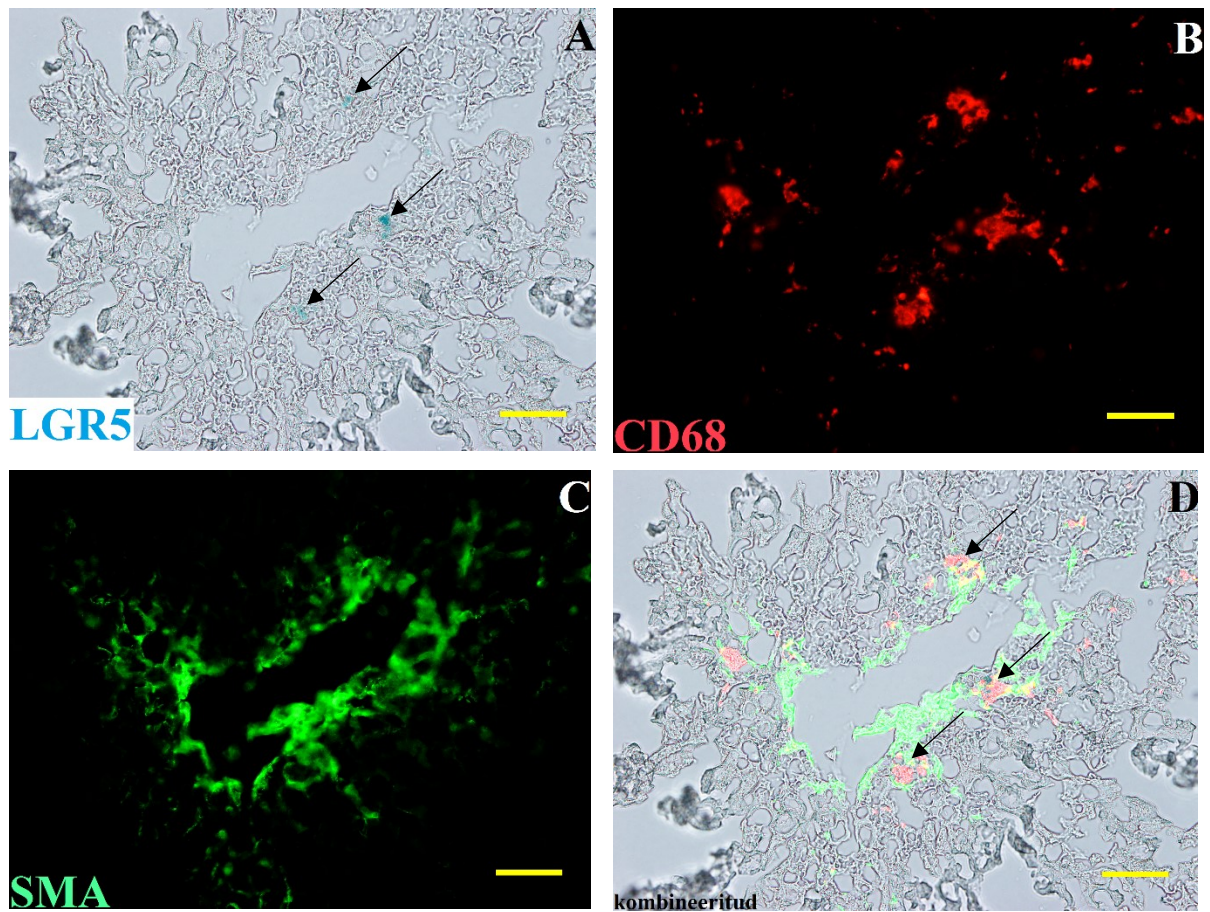
**Joonis 12. LGR5+ rakkude iseloomustamine FACS analüüsil.** Maksakoest eraldatud NPC-de fraktsioonist valiti otse- ja külghajuvuse parameetrite alusel uuritav populatsioon (A), millest omakorda valiti edaspidiseks analüüsiks välja elusad rakud, mis olid DAPI negatiivsed (B). Elusate rakkude populatsioon jagati seejärel  $\beta$ -galaktosidaasi aktiivsuse alusel eristamaks LGR5+ rakud (C). Lisati värvad eristamaks värvatud ja residentsed makrofaagid ning analüüsiti LGR5+ tüvirakkude ja makrofaagimarkerite koekspressiooni (D-F).

### 2.3.5 LGR5+ tüvirakud on F4/80<sup>+</sup>, CD68<sup>+</sup>, CD11b<sup>-</sup>, CD169<sup>-</sup>

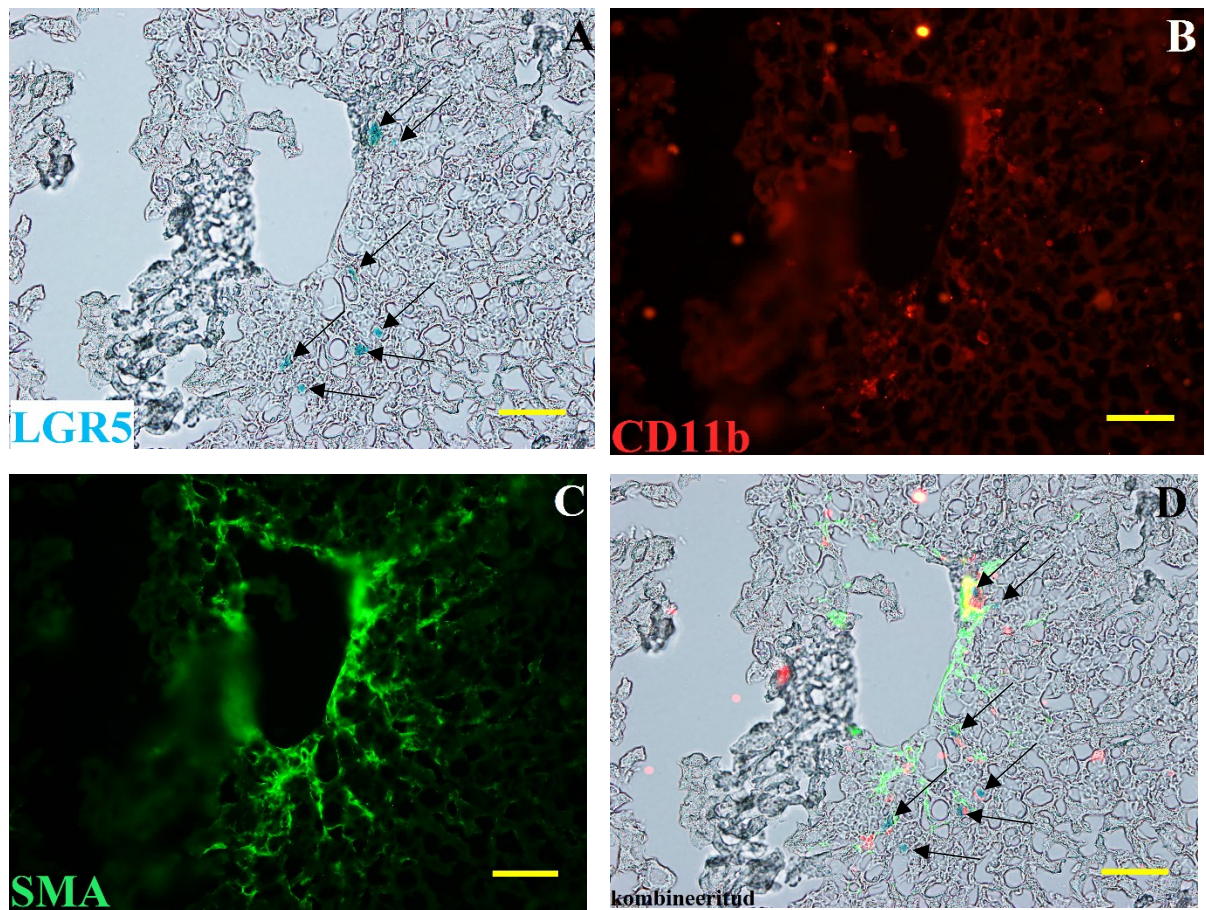
FACS analüüsist selgus, et LGR5<sup>+</sup> tüvirakud on positiivsed F4/80 markeri suhtes ja negatiivsed CD11b markeri suhtes, mis näitas, et LGR5<sup>+</sup> rakkude puhul on tegemist rakkudega, mis on oma rakupinna markerite muustrilt sarnased residentsete maksa makrofaagidega. Et kontrollida FACS analüüsil saadud andmeid ja täpsemalt kindlaks teha, kas LGR5<sup>+</sup> tüvirakud ekspresseerivad ka teisi makrofaagidele omaseid markereid, viidi läbi immuno-fluorestsentsanalüüs. Kahjustatud maksa koelõike värviti spetsiifiliste antikehadega, mis tunnevad ära residentsete maksa makrofaagide markereid CD68, CD169 ja F4/80 ning värvatud makrofaagide markerit CD11b. See kinnitas tulemust, et maksakahjustusejärgselt tekkivad LGR5<sup>+</sup> tüvirakud ekspresseerivad F4/80 (Joonis 13, D) kui ka CD68 (Joonis 14, D), kuid mitte CD11b (Joonis 15, D) ja CD169 (Joonis 16, D) makrofaagide markereid. Saadud tulemused viitavad võimalusele, et LGR5<sup>+</sup> maksa tüvirakud on maksa residentsete makrofaagide sarnased rakud, mis omavad maksakoe taastamise võimet kahjustuse korral.



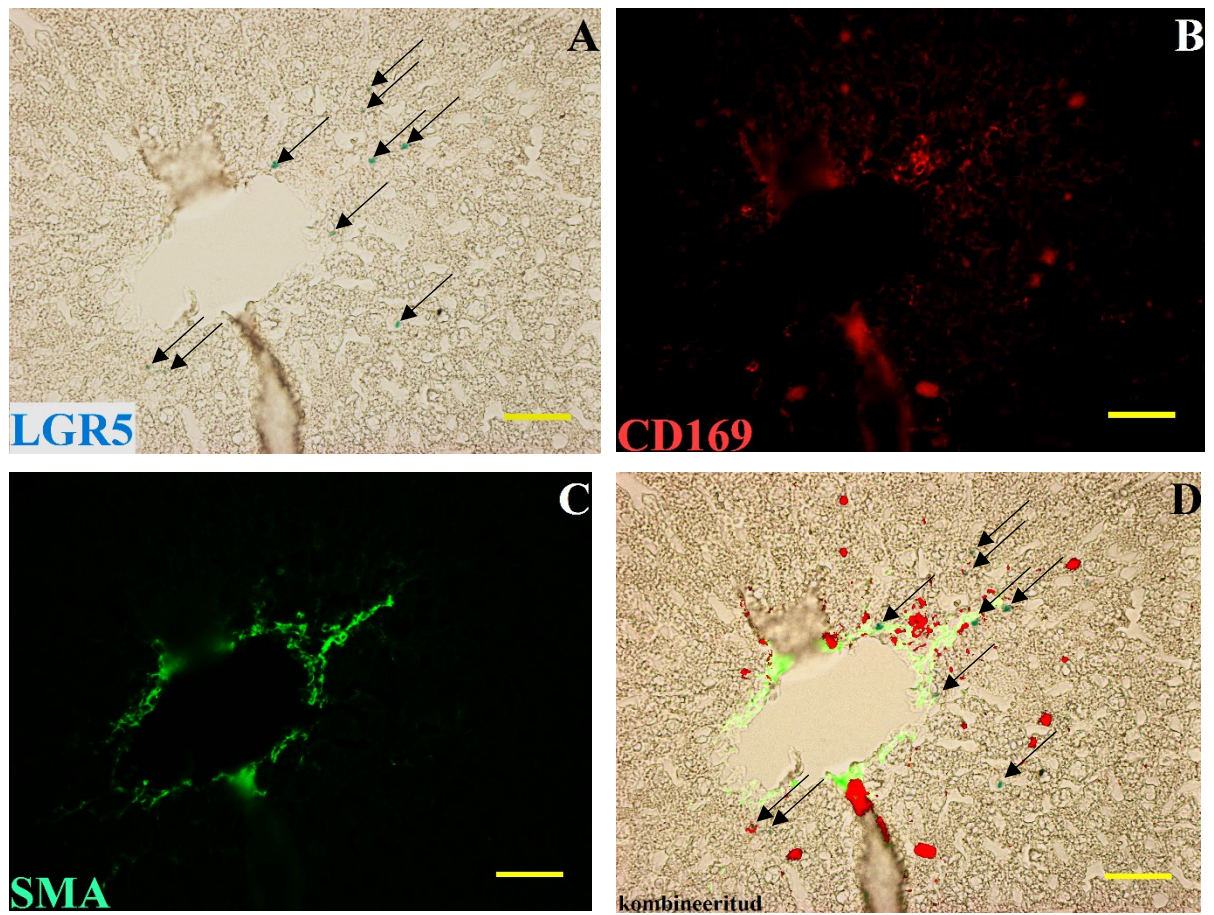
**Joonis 13. LGR5<sup>+</sup> tüvirakud ekspresseerivad F4/80 markerit.** CCl<sub>4</sub> akuutse kahjustusega hiire maksa, mis läbis X-gal töötluste (A), värviti F4/80 (B) ja  $\alpha$ SMA (C) vastaste antikehadega. Katse tulemusena selgus, et LGR5<sup>+</sup> rakud ekspresseerivad maksa makrofaagide markerit F4/80 (D). Lisaks leiti, et SMA positiivsed müofibroblastid ümbritsevad LGR5<sup>+</sup> rakke. Nooled osutavad tsentraalveeni juures paiknevatele LGR5<sup>+</sup> tüvirakkudele. Piltide mõõtkava 50  $\mu$ m.



**Joonis 14. LGR5+ tüvirakud ekspresseerivad CD68 markerit.** CCl<sub>4</sub> akuutse kahjustusega hiire maksa, mis läbis X-gal töötluste (A), värviti CD68 (B) ja SMA (C) vastaste antikehadega. Katse tulemusena selgus, et LGR5+ rakud ekspresseerivad residentsete maksa makrofaagide markerit CD68 (D). Lisaks selgus, et SMA positiivsed müofibroblastid ümbritsevad LGR5+ rakke. Nooled osutavad tsentraalveeni juures paiknevatele LGR5+ tüvirakkudele. Piltide mõõtkava 50 μm.



**Joonis 15. LGR5+ tüvirakud ei ekspresseeri CD11b markerit.** CCl<sub>4</sub> akuutse kahjustusega hiire maksa, mis läbis X-gal töötluste (A), värviti CD11b (B) ja SMA (C) vastaste antikehadega. Katse tulemusena selgus, et LGR5+ rakud ei ekspresseeri värvatud maksa makrofaagide markerit CD11b (D). Immunofluorestsentsanalüüsil leiti lisaks, et SMA positiivsed müofibroblastid ümbritsevad LGR5+ rakke. Nooled osutavad LGR5+ tüvirakkudele tsentraalveeni juures. Piltide mõõtkava 50 μm.

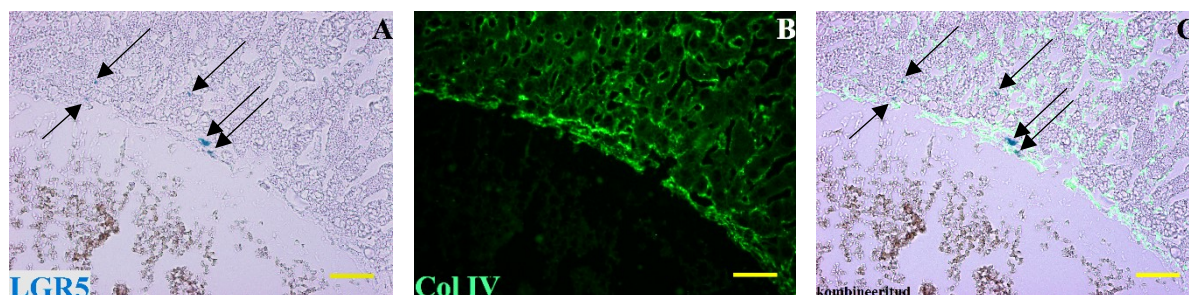


**Joonis 16. LGR5+ tüvirakud ei ekspresseeri CD169 markerit.** CCl<sub>4</sub> akuutse kahjustusega hiire maksa, mis läbis X-gal töötluste (A), värviti CD169 (B) ja SMA (C) vastaste antikehadega. Katse tulemusena selgus, et LGR5+ rakud ei ekspresseeri residentsete maksa makrofaagide markerit CD169 (D). Lisaks leiti, et SMA positiivsed müofibroblastid ümbritsevad LGR5+ rakke. Nooled osutavad tsentraalveeni vahetus läheduses paiknevatele LGR5+ tüvirakkudele. Piltide mõõtkava 50 μm.

### 2.3.6 LGR5+ tüvirakud asetsevad tsentraalveeni vahetus läheduses müofibroblastide ja tüüp IV kollageeni poolt hallatud potentsiaalses tüvirakuniššis

On näidatud, et silelihase aktiin (SMA) ekspresseerub müofibroblastides (Hinz *et al.*, 2012). Müofibroblastid osalevad maksa regeneratsiooniprotsessides, soodustavad maksa eellasrakkude prolifererumist ja mõjutavad nende nišši, tootes erinevaid rakuvaheaine molekule ja kollageeni (Boulter *et al.*, 2012). Uurimaks, kus täpsemalt müofibroblastid paiknevad LGR5+ tüvirakkude suhtes, teostati immunofluorestsentsanalüüs, kasutades  $\alpha$ SMA spetsiifilist antikeha, mis seondub müofibroblastidele. Leiti, et  $\alpha$ SMA positiivsed müofibroblastid ümbritsevad LGR5 positiivseid tüvirakke, moodustades nende ümber potentsiaalse tüvirakunišši (Joonised 5, D; 6, D; 7, D; 8, D; 10, D; 11, D; 13, D; 14, D; 15, D; 16, D).

Lisaks müofibroblastidele uuriti ka kollageen IV paiknemist LGR5+ tüvirakkude suhtes. On näidatud, et tüüp IV kollageen on osa maksa tüvirakuniššist, mis soodustab hepatotsüütide jagunemist (Klaas *et al.*, 2016). Immunofluorestsentsanalüüsi tulemusena selgus, et LGR5+ tüvirakud asusid kollageen IV vahetus läheduses (Joonis 17, C).



**Joonis 17. LGR5+ tüvirakke ümbritseb tüüp IV kollageen.** CCl<sub>4</sub> akuutse kahjustusega hiire maksa, mis läbis X-gal töötluste (A), värviti kollageen IV vastase antikehaga (B). Katse tulemusena selgus, et LGR5+ rakud asuvad kollageen IV vahetus läheduses (C). Nooled osutavad tsentraalveeni juures paiknevatele LGR5+ tüvirakkudele. Piltide mõõtkava 50  $\mu$ m.

Kokkuvõtvalt selgus, et kahjustatud maksas olevad LGR5+ tüvirakud on positiivsed hematopoeetilisele vereloomemarkeri CD45 suhtes ning samuti ekspresseerivad erinevaid spetsiifilisi makrofaagidele iseloomulikke markereid CD68 ja F4/80, mis omakorda viitab võimalikule LGR5+ rakkude hematopoeetilisele identiteedile. Lisaks selgus, et  $\alpha$ SMA positiivsed müofibroblastid ja tüüp IV kollageen ümbritsevad LGR5 positiivseid tüvirakke, mis võib viidata olemasolevale müofibroblastide poolt tekitatud tüvirakuniššile CCl<sub>4</sub> kahjustusega maksas.

## 2.4 ARUTELU

Maks pakub teadlastele suurt huvi, kuna ta on inimese jaoks eluliselt tähtis organ ning uuringud tema regeneratsiooniprotsessis osalevate rakkude ja signaaliradade kohta alles käivad. Antud hetkel on maksahaiguste raviks vaid piiratud võimalused, mis paraku jäävad paljudele patsientidele kättesaamatuks.

Maksahaiguste uurimiseks katseloomadel kasutatakse mitmeid kemikaale ja kirurgilisi meetodeid, mis imiteerivad erinevaid inimese maksahaiguste kahjustustüüpe. Ühekordse suure koguse CCl<sub>4</sub> manustamisega põhjustatud maksakahjustus on kõige tuntum akuutse toksilise kahjustuse mudel. CCl<sub>4</sub> kahjustus kujutab endast sobivat mudelit, uurimaks inimese maksafibroosi kui ka maksatsirroosi tekkemehhanisme. CCl<sub>4</sub> manustamise tagajärjel hukuvad nekrootiliselt tsentraalveeni vahetus läheduses olevad hepatotsüüdid, mis omakorda põhjustab põletikku ning vereloomerakkude infiltrerumist (Cameron and Karunaratne, 1936). Teadlased on spekulerinud, et täiskasvanud maksarakud võivad kahjustuse järgselt dediferentseeruda tagasi tüvirakkudeks ning seeläbi panustada organi regeneratsiooni (Aloia *et al.*, 2016). Lisaks eelnevale on kirjeldatud ka mitmeid fakultatiivseid tüvirakke, mis tekivad ainult pärast maksakahjustust (Yanger and Stanger, 2011). Ometi on need teadmised siiski veel pinnapealsed ning konsensuseni maksa tüvirakkude osas pole veel jõutud.

Maksakahjustuse järgselt ilmuvad maksakoosse LGR5+ tüvirakud (Huch and Dollé, 2016). LGR5 on Wnt/ $\beta$ -kateniin signaaliraja sihtmärkgeen ning ta on tüvirakumarkeriks soolestikus, karvanäärpsus, maos, rinnanäärmetes, arenevas neerus, munasarjade epiteelis ning sisekõrvas (Barker *et al.*, 2010, 2012; Liu *et al.*, 2014; Ng *et al.*, 2014; Barker *et al.*, 2007; Jaks *et al.*, 2008; Yee *et al.*, 2013). CCl<sub>4</sub> kahjustuse järgselt tekkinud LGR5+ rakud on *in vivo* ja *in vitro* tingimustes tüvirakuliste omadustega, olles võimelised prolifereruma ja diferentseeruma nii hepatotsüütideks kui ka sapijuharakkudeks ning neid on võimalik kasvatada maksa organoidideks (Huch *et al.*, 2013). Hetkel veel ei teata, mis rakkudest maksa LGR5+ tüvirakud pärinevad, kuid üheks võimaluseks on maksa progenitorrakud. Kahjustuse puhul on üheks maksa progenitorrakkude markeriks pakutud OPN-i (Español-Suñer *et al.*, 2012). Lisaks on spekulieritud, et LGR5+ rakud võivad pärineda nii hepatotsüütidest kui ka sapijuharakkudest. Antud töös leiti, et LGR5+ rakud ei oma hepatotsüütidele omaseid MUP1 ja ALB ega ka sapijuha- ja progenitorrakkudele omaseid OPN markereid, mis kinnitavad ka varasemalt meie laboris saadud katsetulemusi, et LGR5+ tüvirakud ei pärine hepatotsüütidest ega sapijuharakkudest (Lõhmussaar, 2015).

Juhindudes eeltoodud tulemustele, tekkis küsimus, kas LGR5 positiivsed tüvirakud võivad ekspresseerida teisi maksa progenitorrakkudele omaseid markereid. Lisaks OPN markerile on näidatud, et maksa progenitorrakud ekspresseerivad ka CD34, CD133 ja Sox9 pinnavalke (Petersen, 2003; Furuyama *et al.*, 2011; Yovchev *et al.*, 2007). Arvatakse, et lisaks maksa progenitorrakkudele märgistavad eeltoodud markerid koos EpCAM markeriga maksarakulise kartsinoomitüvirakke ja oletatakse, et maksarakulise kartsinoomi rakkudel on samad tunnused nagu LGR5+ rakkudel (Nikolaou *et al.*, 2015). Varasemalt on meie töögrupis näidatud, et LGR5 positiivsed rakud ei ekspresseeri EpCAM markerit (Lõhmussaar, 2015). Antud töös leidsime, et LGR5+ rakud on negatiivsed ka markeritele Sox9, CD133 ja CD34, mis näitab nende mittekuuluvust progenitorrakkude hulka. Ometi on Huch *et al.* varasemalt näidanud, et LGR5+ rakud ekspresseerivad Sox9 markerit (Huch *et al.*, 2013) ning samuti näidati hiljuti, et LGR5 võib edendada maksarakulise kasvaja puhul metastaseerumist, indutseerides rakkude epiteliaalmesenhümaalset transitsiooni (Liu *et al.*, 2017). Eeltoodud vastuolulised tulemused LGR5+ rakkude kohta vajavad täiendavaid uuringuid, mis aitaksid täpsemalt kirjeldada LGR5+ rakkude rolli nii maksa regeneratsioonis kui ka maksarakulise kartsinoomi tekkes.

Varasemalt on meie töögrupp näidanud, et LGR5 positiivsed tüvirakud ekspresseerivad oma pinnal sinusoidaalsete endoteelirakkude markerit CD44 (Lõhmussaar, 2015). Lisaks leiti antud töös, et LGR5+ rakud on positiivsed ka vereloomerakkude markeri CD45 suhtes. Kuna ka makrofaagid ekspresseerivad oma pinnal CD45 markerit, oli käesoleva magistr töö üheks eesmärgiks uurida, kas CCl<sub>4</sub> akuutse kahjustusega maksas tekkivad LGR5+ tüvirakud võiksid olla makrofaagid. On teada, et maksas olevad makrofaagid ekspresseerivad F4/80, CD11b, CD32, CD68 ja CD169 markereid (Ju and Tacke, 2016). Boulter *et al.* on näidanud, et maksa kroonilisel kahjustusel ekspresseerivad osad maksa makrofaagid võimendavat Wnt signaalirada, mis on vajalik maksa regeneratsiooniprotsesside suunamisel (Boulter *et al.*, 2012). Ei ole uuritud, kas makrofaagid ekspresseerivad Wnt signaaliraja retseptoreid ka akuutse maksa kahjustuse korral. Kuna LGR5 on Wnt signaaliraja sihtmärkgeen, jätkati LGR5 ekspressiooni uuringutega akuutse CCl<sub>4</sub> kahjustusega maksas. Antud töö läbivoolutsütomeetria katse põhjal selgus, et LGR5+ rakud ekspresseerivad makrofaagi markerit F4/80 kõrgel tasemel, kuid mitte värvatud makrofaagide markerit CD11b, ja lokaliseeruvad seetõttu residentsete makrofaagide värvasse. Immunofluorestsentsanalüüs kinnitas FACS analüüsi leidu ning lisaks tuvastati, et LGR5+ rakud on positiivsed ühe residentsete makrofaagide markeri - CD68 - suhtes, kuid negatiivsed teise residentsete makrofaagide markeri - CD169 - suhtes. Käesoleva uurimustöö tulemused näitavad, et LGR5+ rakud omavad väga sarnast, kuid

mitte identset immunofenotüüpi residentsetele maksa makrofaagidega ja on võimalik, et LGR5+ rakud on Kupfferi rakkude laadsed rakud või nende rakkude üks alatüüpidest.

Boulter *et al.* on näidanud, et müofibroblastid osalevad maksa regeneratsiooniprotsessides, soodustades maksa eellasrakkude vohamist ja mõjutades nende tüvirakunišši, tootes erinevaid rakuvaheaine molekule ja kollageeni (Boulter *et al.*, 2012). Liu *et al.* on varasemalt näidanud, et kroonilise maksakahjustuse korral paiknevad CD68+ Kupfferi rakud  $\alpha$ SMA rakkude vahetus läheduses (Liu *et al.*, 2010). Käesoleva töö käigus tehtud katsete tulemustena saame öelda, et ka LGR5+ rakud, mis olid samal ajal samuti CD68 positiivsed, paiknesid tsentraalveeni vahetus läheduses ümbritsetuna  $\alpha$ SMA positiivsete müofibroblastide poolt. Võimalik, et müofibroblastid eritavad erinevaid kasvufaktoreid, aktiveerides nende kaudu maksa eellasrakke.

On näidatud, et maksa rakuvaheaine üheks moodustajaks on tüüp IV kollageen, mis soodustab hepatotsüütide jagunemist *in vitro* ja *in vivo* tingimustes (Klaas *et al.*, 2016). Antud töö raames leiti, et tüüp IV kollageen asub LGR5+ rakkude vahetus läheduses, mis võib soodustada ka nende jagunemist.

Nendest tulemustest on võimalik järeldada, et mitmeid makrofaagidele omaseid markereid ekspresseerivad LGR5+ rakud paiknevad akuutse kahjustusega maksas müofibroblastide ja tüüp IV kollageeni poolt moodustunud potentsiaalsetes tüvirakuniššides, mis soodustavad LGR5+ rakkude prolifereerumist ning diferentseerumist, aidates kaasa maksa regeneratsiooniprotsessidele.

Saadud informatsioon LGR5+ rakkude kohta avab uue suuna, uurimaks nii LGR5+ tüvirakkude diferentseerumismustrit kui ka teda ümbritseva tüvirakunišši täpsemaid rakulisi ja rakuvaheaine interaktsioone. Eeltoodud teadmised aitavad leida uusi võimalusi maksahaiguste raviks ja soodustavad maksarakkude efektiivsemat kasvatamist rakuteraapia jaoks.

## KOKKUVÕTE

Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli uurida akuutse kahjustusega maksas LGR5+ tüvirakkude pinnamarkerite repertuaari, iseloomustamaks täpsemalt nende identiteeti ning kirjeldada nende tüvirakunišši.

Uurimise käigus tehti kindlaks, et akuutse CCl<sub>4</sub> kahjustusega maksas esinevad LGR5+ rakud ekspresseerivad mitmeid makrofaagidele omaseid markereid. Lävivoolutsütomeetria analüüsi tulemusena leiti, et LGR5+ rakud on positiivsed F4/80, kuid negatiivsed CD11b maksa makrofaagimarkerite suhtes. Immunofluorestsentsanalüüsiga kinnitati eelnevat leidu ning avastati, et LGR5+ tüvirakud on negatiivsed CD169 ja positiivsed CD68 makrofaagimarkerite suhtes. Samuti selgus katsete käigus, et LGR5+ tüvirakkudes ei ekspresseerita maksa progenitorrakkude iseloomustamiseks kasutatud OPN, CD34, Sox9 ja CD133 pinnavalke. Lisaks sellele leiti, et LGR5+ tüvirakud asetsevad  $\alpha$ SMA positiivsete müofibroblastide ja tüüp IV kollageeni vahetus läheduses. Saadud tulemuste põhjal võib järeldada, et LGR5+ rakud asetsevad akuutse kahjustusega maksas müofibroblastide ja tüüp IV kollageeni poolt hallatavas tüvirakuniššis.

Käesoleva uurimustöö põhjal võib oletada, et LGR5+ tüvirakud ekspresseerivad mitmeid markereid, mis on spetsiifiliselt iseloomulikud makrofaagidele, ning nende vahetu lähedus müofibroblastidele ja tüüp IV kollageenile moodustab maksa sagariku tsentraalveeni ümber potentsiaalse tüvirakunišši, mis panustab akuutse kahjustuse korral maksa regeneratsiooni. Antud teadmine annab uue suuna uurimaks LGR5+ tüvirakkude täpsemaid interaktsioone niššisiselt ning erinevaid diferentseerumismehhanisme.

## **LGR5+ stem cells identity and stem cell niche in acute liver injury**

**Mikk Tooming**

### **SUMMARY**

The aim of this study was to elucidate the precise identity of LGR5+ stem cells and to describe their potential stem cell niche.

In this work we demonstrated that LGR5+ stem cells express macrophage markers. FACS analysis showed that LGR5+ cells are positive for liver resident macrophage marker F4/80. Immunofluorescence analysis confirmed FACS analysis outcome and additionally showed that LGR5+ stem cells express liver resident macrophagic marker CD68. Concomitantly, LGR5+ stem cells did not express CD11b liver recruited macrophage marker but also not the liver resident macrophage marker CD169. It is known that liver progenitor cells express CD34, Sox9 and CD133 markers, however, immunofluorescence analysis showed that LGR5+ cells did not express any of the tested progenitor markers. Furthermore, immunofluorescence analysis revealed that LGR5+ cells reside in the immediate vicinity of myofibroblasts and type IV collagen. These findings suggest that in acute liver injury LGR5+ stem cells reside in stem cell niches composed of myofibroblasts and type IV collagen.

We conclude that LGR5+ cells are resident macrophage-like cells in CCl<sub>4</sub> induced acute liver injury that reside in stem cell niches formed by myofibroblasts and type IV collagen that potentially facilitate liver regeneration. This work provides a solid basis for further studies that would address the importance of the niche-cell interactions in regulation of the proliferation and differentiation potential of LGR5+ stem cells in liver regeneration.

## TÄNUAVALDUSED

Antud magistritöö on valminud tänu mitmete laborikaaslaste, kursusekaaslaste ja sõprade toele, abile ning väärt nõule. Tänan oma kahte põhijuhendajat toetamast mind sellel käänulisel rännakul. Avaldan tänu oma labori eestvedajale Viljar Jaksile huvitava projekti ning innustavate sõnade ja pööraste ideede eest. Tänan, et andsid mulle piisavalt võimalusi ja otsustusõigust antud projektiga tegeleda. Siiras tänu juhendajale Janeli Viilile kannatliku suhtumise, konstruktiivse kriitika ja suure abivalmiduse eest. Tänan, et aitasid säilitada positiivset meelt ka negatiivsete tulemuste kogunemisel, mille käigus suunasid ja õpetasid mind analüüsima nende tekkepõhjuseid ning sellest lähtuvalt tegema vajalikke muudatusi katsete õnnestumiseks.

Tänan kõiki rakubioloogia õppetooli inimesi võimaluse eest töötada meeldivas töökeskkonnas, mis annab kogu eluks meeldejääva kogemuse. Tänan Dmitri Lubenetsi läbivoolutsütomeetria juhtnööride eest, Annika Treid genotüpiseerimise näpunäidete eest ning Kadi Lõhmussaart, kes oli meeletult tublit tööd teinud antud projektiga. Tänan kogu Tartu Ülikooli Molekulaar- ja Rakubioloogia instituudi inimesi ning Bioteaduste Üliõpilaste Seltsi nende toredate ja töökate aastate eest. Tänan ka P.R. Crockerit antikehade eest.

Lisaks väärivad sooja tänusõna ka mu kursusekaaslased, ilma nendeta poleks need kaks aastat nii toredalt möödunud.

Tänan südamest ka oma perekonda, kes on mulle alati toeks olnud ning võimaldanud mul murevabalt õppida. Tänan väga ka Pilleriin Peetsi ja Reet Toomingut igakülgse toe ning abivalmiduse eest.

## KASUTATUD KIRJANDUS

- Aloia L, McKie MA, Huch M. (2016). Cellular plasticity in the adult liver and stomach: Cellular plasticity in the adult liver and stomach. *J Physiol* **594**: 4815–4825.
- Barker N, Clevers H. (2010). Leucine-Rich Repeat-Containing G-Protein-Coupled Receptors as Markers of Adult Stem Cells. *Gastroenterology* **138**: 1681–1696.
- Barker N, van Es JH, Kuipers J, Kujala P, van den Born M, Cozijnsen M, *et al.* (2007). Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature* **449**: 1003–1007.
- Barker N, Huch M, Kujala P, van de Wetering M, Snippert HJ, van Es JH, *et al.* (2010). Lgr5+ve Stem Cells Drive Self-Renewal in the Stomach and Build Long-Lived Gastric Units In Vitro. *Cell Stem Cell* **6**: 25–36.
- Barker N, Rookmaaker MB, Kujala P, Ng A, Leushacke M, Snippert H, *et al.* (2012). Lgr5+ve Stem/Progenitor Cells Contribute to Nephron Formation during Kidney Development. *Cell Rep* **2**: 540–552.
- Behari J. (2010). The Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in liver biology and disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* **4**: 745–756.
- Boulter L, Govaere O, Bird TG, Radulescu S, Ramachandran P, Pellicoro A, *et al.* (2012). Macrophage-derived Wnt opposes Notch signaling to specify hepatic progenitor cell fate in chronic liver disease. *Nat Med* **18**: 572–579.
- Cameron GR, Karunaratne WAE. (1936). Carbon tetrachloride cirrhosis in relation to liver regeneration. *J Pathol Bacteriol* **42**: 1–21.
- Carpino G, Renzi A, Franchitto A, Cardinale V, Onori P, Reid L, *et al.* (2016). Stem/Progenitor Cell Niches Involved in Hepatic and Biliary Regeneration. *Stem Cells Int* **2016**: 1–12.
- Costa RH, Kalinichenko VV, Holterman A-XL, Wang X. (2003). Transcription factors in liver development, differentiation, and regeneration. *Hepatology* **38**: 1331–1347.
- Drosos I, Kolios G. (2013). Stem Cells in Liver Regeneration and Their Potential Clinical Applications. *Stem Cell Rev Rep* **9**: 668–684.

- Duffield JS, Forbes SJ, Constandinou CM, Clay S, Partolina M, Vuthoori S, *et al.* (2005). Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair. *J Clin Invest* **115**: 56–65.
- Duncan AW, Dorrell C, Grompe M. (2009). Stem Cells and Liver Regeneration. *Gastroenterology* **137**: 466–481.
- Eipel C, Abshagen K, Vollmar B. (2010). Regulation of hepatic blood flow: The hepatic arterial buffer response revisited. *World J Gastroenterol WJG* **16**: 6046–6057.
- Epelman S, Lavine KJ, Randolph GJ. (2014). Origin and Functions of Tissue Macrophages. *Immunity* **41**: 21–35.
- Español-Suñer R, Carpentier R, Van Hul N, Legry V, Achouri Y, Cordi S, *et al.* (2012). Liver Progenitor Cells Yield Functional Hepatocytes in Response to Chronic Liver Injury in Mice. *Gastroenterology* **143**: 1564–1575.e7.
- Evarts R, Nagy P, Nakatsukasa H, Marsden E, Thorgeirsson SS. (1989). In vivo differentiation of rat liver oval cells into hepatocytes. *Cancer Res* **49**: 1541–1547.
- Forbes S, Vig P, Poulsom R, Thomas H, Alison M. (2002). Hepatic stem cells. *J Pathol* **197**: 510–518.
- Frevert U, Engelmann S, Zougbedé S, Stange J, Ng B, Matuschewski K, *et al.* (2005). Intravital Observation of Plasmodium berghei Sporozoite Infection of the Liver Egwang T (ed). *PLoS Biol* **3**: e192.
- Furuyama K, Kawaguchi Y, Akiyama H, Horiguchi M, Kodama S, Kuhara T, *et al.* (2011). Continuous cell supply from a Sox9-expressing progenitor zone in adult liver, exocrine pancreas and intestine. *Nat Genet* **43**: 34–41.
- Germain L, Blouin MJ, Marceau N. (1988). Biliary epithelial and hepatocytic cell lineage relationships in embryonic rat liver as determined by the differential expression of cytokeratins, alpha-fetoprotein, albumin, and cell surface-exposed components. *Cancer Res* **48**: 4909–4918.
- Gomez Perdiguero E, Klapproth K, Schulz C, Busch K, Azzoni E, Crozet L, *et al.* (2014). Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature* **518**: 547–551.

- Gordon S, Plüddemann A, Martinez Estrada F. (2014). Macrophage heterogeneity in tissues: phenotypic diversity and functions. *Immunol Rev* **262**: 36–55.
- Gosling JA, Harris PF, Humpherson JR, Whitmore I, Willan PLT, Gosling JA. (2016). Human anatomy: color atlas and textbook.
- Guyton AC, Hall JE. (2006). Textbook of medical physiology: [online access + interactive extras: studentconsult.com]. 11. ed. Elsevier, Saunders: Philadelphia, Pa.
- Haegbarth A, Clevers H. (2009). Wnt Signaling, Lgr5, and Stem Cells in the Intestine and Skin. *Am J Pathol* **174**: 715–721.
- Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Prunotto M, Desmoulière A, Varga J, *et al.* (2012). Recent Developments in Myofibroblast Biology. *Am J Pathol* **180**: 1340–1355.
- Huch M, Dollé L. (2016). The plastic cellular states of liver cells: Are EpCAM and Lgr5 fit for purpose? *Hepatology* **64**: 652–662.
- Huch M, Dorrell C, Boj SF, van Es JH, Li VSW, van de Wetering M, *et al.* (2013). In vitro expansion of single Lgr5<sup>+</sup> liver stem cells induced by Wnt-driven regeneration. *Nature* **494**: 247–250.
- Jain R, Fischer S, Serra S, Chetty R. (2010). The Use of Cytokeratin 19 (CK19) Immunohistochemistry in Lesions of the Pancreas, Gastrointestinal Tract, and Liver: *Appl Immunohistochem Mol Morphol* **18**: 9–15.
- Jaks V, Barker N, Kasper M, van Es JH, Snippert HJ, Clevers H, *et al.* (2008). Lgr5 marks cycling, yet long-lived, hair follicle stem cells. *Nat Genet* **40**: 1291–1299.
- Ju C, Tacke F. (2016). Hepatic macrophages in homeostasis and liver diseases: from pathogenesis to novel therapeutic strategies. *Cell Mol Immunol* **13**: 316–327.
- Kamiya A, Inagaki Y. (2015). Stem and progenitor cell systems in liver development and regeneration: Stem/progenitor cells in liver. *Hepatol Res* **45**: 29–37.
- Kingisepp P-H. (2006). Inimese Füsioloogia. 138-139.
- Kinoshita M, Uchida T, Sato A, Nakashima M, Nakashima H, Shono S, *et al.* (2010). Characterization of two F4/80-positive Kupffer cell subsets by their function and phenotype in mice. *J Hepatol* **53**: 903–910.

- Klaas M, Kangur T, Viil J, Mäemets-Allas K, Minajeva A, Vadi K, *et al.* (2016). The alterations in the extracellular matrix composition guide the repair of damaged liver tissue. *Sci Rep* **6**: 27398.
- Kordes C, Häussinger D. (2013). Hepatic stem cell niches. *J Clin Invest* **123**: 1874–1880.
- Kumar KK, Burgess AW, Gulbis JM. (2014). Structure and function of LGR5: An enigmatic G-protein coupled receptor marking stem cells: A Review of LGR5 Structure and Function. *Protein Sci* **23**: 551–565.
- Liu C, Tao Q, Sun M, Wu JZ, Yang W, Jian P, *et al.* (2010). Kupffer cells are associated with apoptosis, inflammation and fibrotic effects in hepatic fibrosis in rats. *Lab Invest* **90**: 1805–1816.
- Liu D, He XC, Qian P, Barker N, Trainor PA, Clevers H, *et al.* (2014). Leucine-rich Repeat-containing G-protein-coupled Receptor 5 Marks Short-term Hematopoietic Stem and Progenitor Cells during Mouse Embryonic Development. *J Biol Chem* **289**: 23809–23816.
- Liu J, Yu G-Z, Cheng X-K, Li X-D, Zeng X-T, Ren X-Q. (2017). LGR5 promotes hepatocellular carcinoma metastasis through inducing epithelial-mesenchymal transition. *Oncotarget*. e-pub ahead of print, doi: 10.18632/oncotarget.15143.
- Lõhmussaar K. (2015). LGR5-positiivsete rakkude päritolu kirjeldamine kahjustatud maksas.
- Lorenzini S, Bird TG, Boulter L, Bellamy C, Samuel K, Aucott R, *et al.* (2010). Characterisation of a stereotypical cellular and extracellular adult liver progenitor cell niche in rodents and diseased human liver. *Gut* **59**: 645–654.
- Michalopoulos GK. (2007). Liver regeneration. *J Cell Physiol* **213**: 286–300.
- Nagoshi S. (2014). Osteopontin: Versatile modulator of liver diseases: Osteopontin in liver diseases. *Hepatol Res* **44**: 22–30.
- Ng A, Tan S, Singh G, Rizk P, Swathi Y, Tan TZ, *et al.* (2014). Lgr5 marks stem/progenitor cells in ovary and tubal epithelia. *Nat Cell Biol* **16**: 745–757.
- Nienstedt W, Hänninen O, Arstila A, Björkqvist S-E, Osakeytitiö WS. (2001). Inimese füsioloogia ja anatoomia. *Medicina*: 316-323.

- Nikolaou KC, Moulos P, Chalepakis G, Hatzis P, Oda H, Reinberg D, *et al.* (2015). Spontaneous development of hepatocellular carcinoma with cancer stem cell properties in PR-SET7-deficient livers. *EMBO J* **34**: 430–447.
- Okabe M, Tsukahara Y, Tanaka M, Suzuki K, Saito S, Kamiya Y, *et al.* (2009). Potential hepatic stem cells reside in EpCAM<sup>+</sup> cells of normal and injured mouse liver. *Development* **136**: 1951–1960.
- Petersen B. (2003). Mouse A6-positive hepatic oval cells also express several hematopoietic stem cell markers. *Hepatology* **37**: 632–640.
- Putnam AJ. (2014). The instructive role of the vasculature in stem cell niches. *Biomater Sci* **2**: 1562–1573.
- Rantakari P, Jäppinen N, Lokka E, Morkkala E, Gerke H, Peuhu E, *et al.* (2016). Fetal liver endothelium regulates the seeding of tissue-resident macrophages. *Nature* **538**: 392–396.
- Scadden DT. (2006). The stem-cell niche as an entity of action. *Nature* **441**: 1075–1079.
- Seglen PO. (1976). Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol* **13**: 29–83.
- Seki S, Ikarashi M, Kinoshita M, Nakashima M, Nakashima H. (2014). New Findings about Liver Kupffer Cells/Macrophages, B Cells and their Functions. *J Hepat Res* **1**.
- Shin S, Walton G, Aoki R, Brondell K, Schug J, Fox A, *et al.* (2011). Foxl1-Cre-marked adult hepatic progenitors have clonogenic and bilineage differentiation potential. *Genes Dev* **25**: 1185–1192.
- Tacke F, Randolph GJ. (2006). Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets. *Immunobiology* **211**: 609–618.
- Tanimizu N, Mitaka T. (2014). Re-evaluation of liver stem/progenitor cells. *Organogenesis* **10**: 208–215.
- Taylor PR, Martinez-Pomares L, Stacey M, Lin H-H, Brown GD, Gordon S. (2005). MACROPHAGE RECEPTORS AND IMMUNE RECOGNITION. *Annu Rev Immunol* **23**: 901–944.

- de Visser KE, Ciampricotti M, Michalak EM, Tan DW-M, Speksnijder EN, Hau C-S, *et al.* (2012). Developmental stage-specific contribution of LGR5<sup>+</sup> cells to basal and luminal epithelial lineages in the postnatal mammary gland: Contribution of LGR5<sup>+</sup> cells to mammatogenesis. *J Pathol* **228**: 300–309.
- Yanger K, Stanger BZ. (2011). Facultative stem cells in liver and pancreas: Fact and fancy. *Dev Dyn* **240**: 521–529.
- Yee KK, Li Y, Redding KM, Iwatsuki K, Margolskee RF, Jiang P. (2013). Lgr5-EGFP Marks Taste Bud Stem/Progenitor Cells in Posterior Tongue. *STEM CELLS* **31**: 992–1000.
- Yovchev MI, Grozdanov PN, Joseph B, Gupta S, Dabeva MD. (2007). Novel hepatic progenitor cell surface markers in the adult rat liver. *Hepatology* **45**: 139–149.
- Zajicek G, Oren R, Weinreb M. (2008). The streaming liver. *Liver* **5**: 293–300.
- Zhou Y, Jiang L, Rui L. (2009). Identification of MUP1 as a Regulator for Glucose and Lipid Metabolism in Mice. *J Biol Chem* **284**: 11152–11159.

# KASUTATUD VEEBIAADDRESSID

Joonis 1.

[http://session.masteringaandp.com/problemAsset/2082428/2/MariebHAP10\\_ch23-08\\_artquest.jpg](http://session.masteringaandp.com/problemAsset/2082428/2/MariebHAP10_ch23-08_artquest.jpg) seisuga 01.04.2017

<https://goo.gl/iS9GWE> seisuga 01.04.2017

# LISAD

## Lisa 1. Loomkatsete luba

ASUTUSESISESEKS KASUTAMISEKS  
PÕLLUMAJANDUSMINISTEERIUM  
Märge tehtud "17." veebruar 2014. a.  
Juurdepääsupiirang kehtib kuni „17.02.2019“  
või .....  
Alus: Avaliku teabe seadus § 35 lg 1 p17,



## PÕLLUMAJANDUSMINISTEERIUM

### LOOMKATSEPROJEKTI LOAKOMISJON

**OTSUS**  
Tallinnas

17. veebruar 2014 nr 25

Loomkatseprojekti luba

Loomakaitse seaduse § 45 lõike 2 alusel ning loomkatseprojekti loakomisjoni 17. veebruari 2014. a istungi protokoll nr 10 kohaselt otsustati järgmist:

1. Anda luba **Viljar Jaks'ile** (sünd. 05.12.1967, aadress: Riia 23, Tartu, 51010) loomkatseprojekti: „**Maksa tüvirakkude roll ja regulatsioon maksa regeneratsioonis ning maksakasvajate tekkel**“ läbiviimiseks järgmistel tingimustel:

1.1. loomkatseprojekti kavandaja ja loomkatseprojekti eest vastutav isik Viljar Jaks (sünd. 05.12.1967, aadress: Riia 23, Tartu, 51010);

1.2. loomkatseprojekti läbiviimise aeg ja koht: 01.03.2014 - 28.02.2017, Tartu Ülikooli Molekulaar- ja Rakubioloogia Instituudi vivaarium, KL1202, aadress: Riia 23, Tartu, 51010;

1.3. loomkatseprojekti kaasatud isikud: **Kristiina Mäemets-Allas** (sünd. 31.01.1977);

1.4. katseloomade liik ja arv: 204 hiirt

1. Aasta

Kokku 1. aastal 78 Rosa26-rtTA/TRE-hiirt ning 18 Nu/Nu BalbC hiirt.

2. Aasta

Erinevate maksa rakuliste komponentide osa selgitamine regeneratsioonis vajaks 3 CreERT liini puhul 3 katsepunkti iga kahjustuse meetodi kohta. Kontrollina kasutatakse kahjustamata hiiri. Seega kasutatavate hiirte arv selles katses on 54. (3 Cre liini x 3 katsepunkti x (3 maksakahjustusega hiirt + 3 kontrollhiirt))

3. Aasta

Lgr5-ekspressioonivahendite rakkude päritolu kindlakstegemine nõuab 2 CreERT liini kasutamist 3 maksakahjustuse meetodi puhul. Kuna ka siin on oluline kontrollide

lisamine siis vajatakse samuti 54 hiirt (2 Cre liini x 3 katsepunkti x 3 maksakahjustusega hiirt x 3 kontrollhiirt))

#### 1.5. loomkatses rakendatavad menetlused:

1. Loomkatsete käigus tekitatakse hiirte maksas maksakahjustus järgmistel viisidel:

a) CCl<sub>4</sub> (süsiniktetrakloriid 1,25mg/kg) intraperitoneaalne (i.p.) injektsioon lahustatuna taimeõlis tekitab keskmise astmega maksakahjustus, mis paraneb ca 7 päeva jooksul. Tegemist on 24h jooksul mööduva keskmise astme valu/kannatusega. Valu vähendamiseks süstitakse valuvaigistit (Rimadyl 5mg/kg s.c.) 1x päevas. Juhul kui hiirel tekivad tugeva kannatuse sümptomid või peritoneaalärritusnähud hiir hukatakse. Protseduur viiakse läbi 45 hiirel.

b) DDC (3,5-diethoksükarbonüül-1,4-dihüdrokollidiin) diiet (100mg/ toidu kg kohta) 7 päeva põhjustab keskmise kahjustuse, mis paraneb 1 nädalaga. Kuna valu põhjus on maksa pais/turse siis valuvaigistite manustamine ei anna soovitud efekti. Juhul kui hiirel tekivad tugeva kannatuse sümptomid hiir hukatakse. Protseduur viiakse läbi 45 hiirel.

c) osaline maksareseksioon üldanesteesias (hypnorm/dormicumi vesilahuse - fentanüültsitraat 0,079 mg/ml; fluanision 2,5 mg/ml ja midasolaam 1,25 mg/ml intraperitoneaalne süst, 0,05 - 0,1 ml/10g, anesteesia kestus ca 60 min). Kõhuõõs avatakse ning vasak sagar eemaldatakse (30% maksast) ja kõhuõõs suletakse. Kuna tegemist on tugeva valuga manustatakse valuvaigistit (Rimadyl 5mg/kg s.c.) 1x päevas 4 postoperatiivse päeva jooksul. Juhul kui valu sümptomid püsivad jätkatakse valuvaigisti manustamist. Maks regenerereerub 2 nädalaga. Hiired hukatakse 2 nädala möödumisel peale protseduuri. Kui hiir ei taastu 24h jooksul või tekivad kannatuse sümptomid hiir hukatakse. Protseduur viiakse läbi 45 hiirel.

2. CreERT rekombinaasi aktiveerimiseks süstitakse hiiri tamoksifeeni lahusega taimeõlis 1-10mg/hiire kohta 1-2 korda i.p. Tegemist on väga lühiajalist ebamugavustunnet, kergelt valu ja stressi põhjustava protseduuriga. Sel juhul hiir hukatakse. Protseduur viiakse läbi 135 hiirel.

3. Spontaansete maksakasvajate tekitamine ühekordse dietüülnitroosamiini (DEN) õlilahuse süstiga (i.p. 25mg/kg kuni 4x üle päeva, 21 päeva vanustele hiirtele) ning pideva fenobarbitaali manustamisega joogivees (0,05%). Kasvajate arengut jälgitakse 40 nädala jooksul. DEN süstid põhjustavad lühiajalist ebamugavust (vt punkt 2). Fenobarbitaali manustamine ei tekita mingeid vaevusi. Maksakasvajate teke on üldiselt valutut, kuid võivad esineda tõsised tüsistused (pais ja sellest astsiit, valusündroom), mis väljenduvad hiirte apaatsuses, sundasendis, kaalulanguses üle 20%). Nende sümptomite ilmnemisel hiired hukatakse koheselt. Kergema valu sümptomite ilmnemisel manustatakse valuvaigistit (Rimadyl 5mg/kg s.c.) 1x päevas. Protseduur viiakse läbi 39 hiirel.

5. Tetratsükliinõltsuva transkriptsiooni aktiveerimiseks manustatakse hiirtele doksütsükliini (2 g/l) joogivees, millele on lisatud 5% sahharoosi. Ka pikaajaline doksütsükliini manustamine ei oma mingeid negatiivseid mõjusid ei hiirte arengule, elukvaliteedile ega viljakusele. Protseduur viiakse läbi 78 hiirel.

6. Maksarakkude transplantatsiooniks, kõhuõõs avatakse üldanesteesias ja sorditud rakud süstitakse maksa vasakusse sagarasse kasutades insuliinisüstalt (G30). Kõhuõõs suletakse, haav kaetakse ning hiirele manustatakse valuvaigistit subkutaanselt. Hiirt jälgitakse 2x päevas 3 postoperatiivse päeva jooksul. Valuvaigistit manustatakse nagu

punktis 1a 3 postop päeva jooksul 1x päevas. Kui hiir ei taastu 24h jooksul või tekivad kannatuse sümptomid hiir hukatakse. Protseduur viiakse läbi 18 hiirel.

Humaansete lõpp-punktide üldised kriteeriumid: Katsed lõpetatakse enne planeeritud katse lõppu hiirte üldseisundi halvenemisel (esinevad kannatussümptomid: spetsiifiline sundasend, loidus, toidust keeldumine); kaalulangusel üle 20%, kui tekib astsiit või kui operatsioonide korral loom ei ole 2. postoperatiivse päeva lõpuks taastunud (loom on loid, sundasendis).

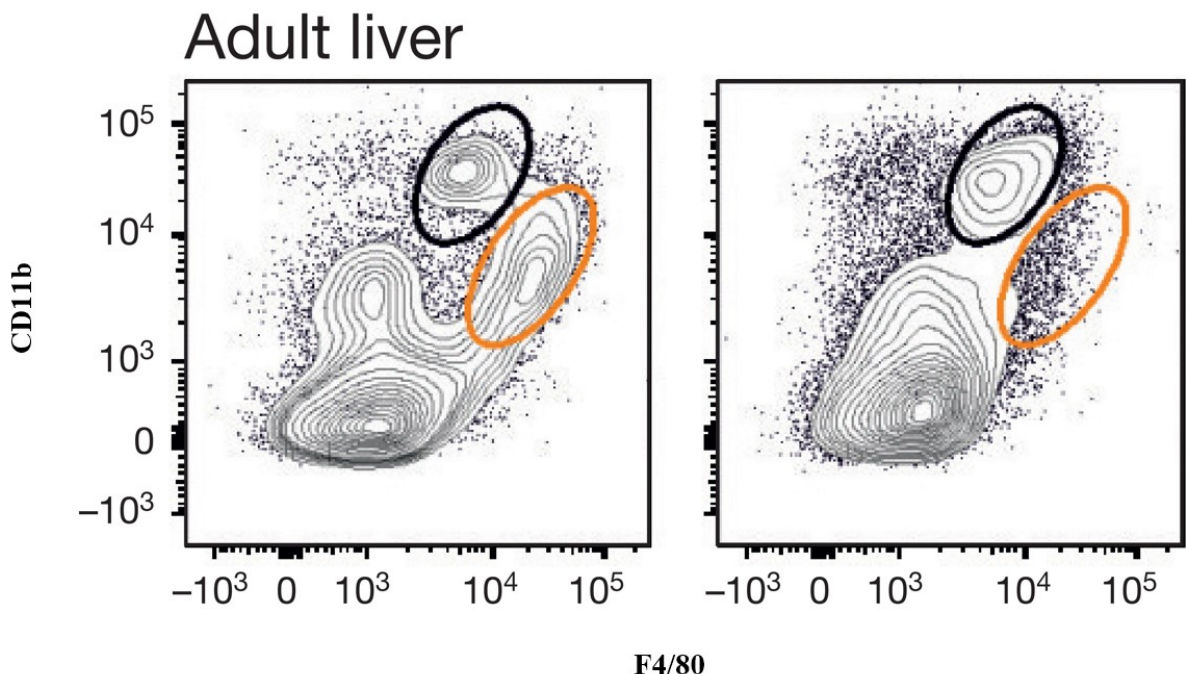
Loomade hukkamise meetodika: Loomad hukatakse tservikaalse dislokatsiooni teel katse lõppemisel või ülalpool defineeritud humaansete lõpp-punktide saabumisel. Ühtegi katselooma ei kasutata katsetes korduvalt. Loomadel läbi viidavate katsete üksikasjaline kirjeldus on toodud punktis 1.

2. Otsust on õigus vaidlustada haldusmenetluse seaduses või halduskohtumenetluse seadustikus ettenähtud korras ja tähtaja jooksul.

Mario Plaas  
/allkirjastatud digitaalselt/

Komisjoni esimees

Lisa 2. Rantakari *et al.* artikli läbivoolutsütomeetria väravad



**Joonis 1.** Rantakari *et al.* Läbivoolutsütomeetria maksa residentsete ja värvatud makrofaagide väravad. Mustaga on ümbritsetud CD11b värvatud makrofaagid ning oranžiga on ümbritsetud F4/80 residentset maksa makrofaagid.

# LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Mikk Tooming (24.02.1993)

Annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

**LGR5+ tüvirakkude identiteet ja nišš akuutse kahjustusega maksas**

Mille juhendajaks on Viljar Jaks ja Janeli Viil,

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

1.2.üldusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates 31.05.2018 kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni

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, 30.05.17