

TARTU ÜLIKOOL
BIOLOOGIA-GEOGRAAFIATEADUSKOND
ZOOLOOGIA JA HÜDROBIOLOOGIA INSTITUUT
ÜLDZOOLOOGIA ÕPPETOOL

Merly Malva

Hematopoeetiliste tüvirakkude analüüs *Gata3*^{-/-} hiirtes

Magistritöö arengubioloogias

Prof. Jüri Kärner, Ph.D, D.Sc

TARTU 2006

Sisukord

Sisukord	2
Lühendid	4
Sissejuhatus.....	6
Kirjanduse ülevaade	8
1. Neerude arenemine.....	8
2. Nefrilise juha morfogeneesi kirjeldus selgroogsete erinevates klassides	11
3. Gata transkriptsioonifaktorid	13
4. Transkriptsioonifaktor Gata3	13
5. Transkriptsioonifaktor Gata3 seos hematopoesisiga.....	15
6. Hematopoeetiliste tüvirakkude kujunemine.....	16
7. Hematopoeetiliste tüvirakkude embrüonaalsed kogumikud	17
8. Hematopoeetiliste tüvirakkude diferentseerumine mittehematopoeetilisteks rakkudeks täiskasvanud organismis.....	19
9. Embrüonaalsete hematopoeetiliste tüvirakkude diferentseerumine mittehematopoeetilisteks rakkudeks	22
Eksperimentaalne töö	23
1. Materjal ja meetodika	23
1.1 Kasutatud hiireliin ja genotüüpiseerimine	23
1.2. Embrüote dissekteerimine.....	24
1.3. β -galaktosidaasi värvusreaktsioon hiireembrüotel.....	24
1.4 Embrüote sisestamine araldiiti ja lõikamine mikrotoomiga	24
1.5 Parafiinlõikude valmistamine embrüotest.....	25
1.6. Immunohistokeemia parafiinlõikudele	25
1.7. <i>Whole-mount</i> embrüote ja koelõikude pildistamine.....	26
Tulemused.....	27
1. Wolffi juha elongatsioon Gata3 homosügootses mutandis.....	27
2. Gata3 ekspressioon dorsaalaordi ventraalsel küljel	31
3. CD34 positiivsete rakkude levik aordi piirkonnas	34

Arutelu	37
Kokkuvõte	41
Summary	42
Kasutatud kirjandus.....	43

Lühendid

AGM – aort-gonaad-mesonefros

DAB – 3, 3-diaminobensidiin

E8.0 – 8. embrüonaalne arengupäev

E – endoteel

Ep – esijäsemepung

HDR (*hypoparathyroidism, deafness, renal dysplasia*) – hüoparatüroidismi, kurtuse ja neerupuudulikkuse sündroom

HIAC – (*hematopoietic intraortic clusters*) hematopoeetiliste tüvirakkude aordisisesed kogumikud

in situ – kohapeal

in vitro – katseklaasis

K – kloaak

knock-out – homosügootne mutant

lacZ – *Escherichia coli* β-galaktosidaasi kodeeriv geen

LTR – (*long-term repopulating*) pikaajaline taastootmisvõime

M – mesonefros

nls – (*nuclear localization signal sequence*) tuuma lokalisatsiooni signaaljärjestus

Ot – ototsüst

PBS – fosfaatpuhvri soolalahus (*phosphate buffered saline*)

PFA – paraformaldehüüd

pWj – parempoolne Wolffi juha

SAP – (*subaortic patches*) subaortiliste hematopoeetiliste tüvirakkude kogumikud

St – sümpaatiline närvitüvi

TAE – Tris-atsetaat

Tp - tagajäsemepung

Tris – trishüdrosümetüülaminmetaan

vWj – vasakpoolne Wolffi juha

whole-mount – tervet embrüot hõlmav

wild-type – metsiktüüpi

Wj – Wolffi juha

X-Gal – 5-bromo-4-kloro-3-indolüül- β -D-galaktopüraanosiid

Märkus. Geenide tähised on tekstis esitatud kaldkirjas, valkude puhul püstkirjas.

Sissejuhatus

Organogeneesi üheks osaks on urogenitaalsüsteemi väljakujunemine. Embrüonaalse urogenitaalsüsteemi arengu uurimine ja seda mõjutavate faktorite väljaselgitamine on oluline mõistmaks kaasasündinud ja postnataalsete urogenitaalhäirete põhjusi. Nende täpne mõistmine aitab kaasa haiguste ennetamisele ja ravile.

Urogenitaalsüsteemi arengu keskseks organiks on nefriline juha (Wolffi juha), mis indutseerib üksteisele järgnevate neerupõlvkondade teket embrüogeneesis. Nefrilise juha morfogeneesi on uuritud üle saja aasta (Saxén, 1987), kusjuures on kirjeldatud tema elongatsiooni erineva süstemaatilise kuuluvusega selgroogsete juures ja oletatud võimalikke rakulisi arengumehhanisme. Selle ajaga on kogunenud väga suures mahus materjali, mis on enamuses kirjeldav ja sageli täis vasturääkivusi oletustes nefrilise juha liikumise mehhanismide kohta kloaaki.

Enamus vaidlusi tulemuste tõlgendamisel on seotud sellega, kas nefrilise juha pikenemine toimub rakkude proliferatsiooni tulemusel juha posterioorses otsas või rakkude migratsiooni teel. Samas võivad eelnimetatud mehhanismid osaleda nefrilise juha pikenemises kombineeritult (Drawbridge *et al.*, 2003).

Nende hüpoteeside tõestuseks on hulgaliselt andmeid ja sõltuvalt uurimisobjektist peavad need paika enamal või vähemal määral. Kõige problemaatilisemaks on seni jäänud küsimus, kas nefrilise juha elongatsiooni tagab rakkude värbamine juha koosseisu ümbritsevast mesodermist või tuleb Wolffi juha toime oma rakkudega. Siin ei ole selget vastust ning vasturääkivused uurimistulemuste tõlgendamisel on vägagi suured.

Asusime seda probleemi uurima kahel põhjusel. Esiteks on meie labori käsutuses transkriptsioonifaktor *Gata3* transgeensed hiired (*Mus musculus*), kus homosügootsetel (*Gata3*^{-/-}) loomadel esineb organogeneesis mitmeid kõrvalekaldeid, sealhulgas neerude arengus. *Gata3* homosügootse mutandi embrüonaalne neer läbib pronefroose staadiumi. Mesonefroose staadiumis nefrilise juha pikenemine peatub ning metanefroose arengut ei indutseerita. Seega on tegemist igati sobiva mudelorganismiga nefrilise juha morfogeneesi uurimiseks.

Teiseks, histogeneeside uurimine on teinud pöörde tänu kiiresti kogunevale andmestikule hematopoeetiliste tüvirakkude osast histo- ja organogeneesides.

Käesoleva töö kirjanduslik osa annab ülevaate neerude arengu, transkriptsioonifaktorite Gata perekonna ja hematopoeetiliste tüvirakkude kohta. Praktilise töö eesmärkideks on:

- *Gata3* mutantsete hiirte Wolffi juha elongatsiooni kirjeldamine,
- *Gata3* ekspressiooni kirjeldamine dorsaalaordi ventraalsel küljel,
- hematopoeetiliste tüvirakkude markeri CD34 ekspressiooni kirjeldamine *Gata3* homosügootse mutandi ja *wild-type* hiireloote aort-gonaad-mesonefros regioonis.

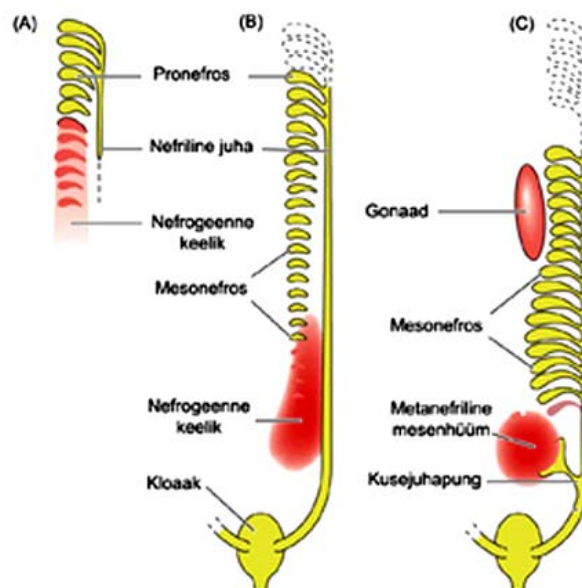
Kirjanduse ülevaade

1. Neerude arenemine

Imetajate urogenitaalsüsteemi arenemine on üks keerulisemaid protsesse embrüogeneesis, hõlmates rakkude proliferatsiooni, migratsiooni, adhesiooni, transformatsiooni ja apoptoosi. Neerude arenemisega on tihedalt seotud vaskularisatsioon ja neurogenees, mis tagavad urogenitaalsüsteemi varustatuse veresoonte ning närvidega (Kuure *et al.*, 2000).

Embrüogeneesi neurula staadiumis jaguneb mesoderm viieks regiooniks, mille üheks osaks on vaheline ehk intermediaarne mesoderm. Viimane paneb aluse neerude üksikute põlvkondade arenemisele. Imetajatele on iseloomulik neerude arenemine kolmes staadiumis. Anterio-posterioorses suunas vahelduvad üksteise järel pronefrose, mesonefrose ja metanefrose staadiumid (Kuure *et al.*, 2000) (joonis 1). Amniotide pronefros ja mesonefros on ajutised neerud, mis embrüonaalse arengu käigus regresseeruvad. Lootelises arengus viimasena diferentseeruv metanefros kujuneb imetajatel püsivaks neeruks ning muutub sünnijärgselt funktsionaalseks sekretoororganiks (Gilbert, 2000). Erinevalt imetajatest ja lindudest esineb kahepaiksetel ja kaladel ainult kaks neerude põlvkonda. Nende vabaltjuuvatele vastsetele on iseloomulik funktsionaalse ekskretsiooniorganina toimiv pronefros, millest areneb täiskasvanud isenditele iseloomulik mesonefriline neer (Saxén, 1987).

Hiire urogenitaalsüsteemi arenemine algab E8.0 arengupäeval, kui anteriorsete somiitide ventraalsel poolel kujuneb vahelisest mesodermist nefriiline juha (Gilbert, 2000). Viimane on esimest korda täheldatav 5. somiidipaari lähedases piirkonnas (Lechner, Dressler, 1997). Kujunemisjärgselt pikeneb nefriiline juha rostro-kaudaalses suunas, indutseerides oma teel epiteliaalsete medioventraalselt pikenevate tuubulite moodustumist (Rossant, Tam, 2002).



Joonis 1. Imetajate neerude arengu üldine skeem. Pronefroose ja nefrilise juha moodustumine (A). Nefrilise juha elongatsioon kloaagi suunas ja mesonefroose induksioon (B). Kusejuha punga väljasopistumine nefrilisest juhast ning metanefrilise mesenhüümi indutseerimine metanefroose arenguks (C). (Gilbert, 2000 järgi).

Nefrilise juha anterioorne piirkond indutseerib ümbritsevat mesenhüümi moodustama umbseid pronefrilise neeru tuubuleid (Gilbert, 2000). Erinevalt kahepaiksete ja kalade vastsete pronefrilistest tuubulitest, puudub amniotide tuubulitel glomeerul, mistõttu pronefros ei funktsioneeriks ekskretsiooniorganina (Gilbert, 2000; Kuure *et al.*, 2000). Hiire pronefrilised tuubulid on rudimentaarsed ning eksisteerivad vaid lühikese perioodi vältel (Lechner, Dressler, 1997). Arengu käigus imetajate pronefroose tuubulid kaovad ning nefrilise juha anterioorne osa degenereerub (Kuure *et al.*, 2000). Pronefroose taandarenenud hiire E10.0 arengupäevaks (Kaufman, Bard, 1999). Pronefroose regresseerumisega paralleelselt toimub mesonefroose kujunemine. Kloaagi suunas pikenev nefriline juha indutseerib ümbritsevat mesenhüümi formeerima epiteliaalseid mesonefroose tuubuleid (Gilbert, 2000). Mesenhüümaste rakkude kondenseerumise tulemusel

formeeruvad mesonefrilised tubulid ning nendest omakorda nefronid (Saxén, 1987). Hiire mesonefroose diferentseerumine algab E9.5 arengupäeval (Müller, Brändli, 1999). Samal perioodil toimub ka luumeni moodustumine urogenitaalsiinuse poole pikenevas nefrilises juhas, mis mesonefroose ja metanefroose staadiumis kannab ka Wolffii juha nimetust (Rossant, Tam, 2002). Nefriline juha ühineb kloaagi seinaga urogenitaalsiinuse piirkonnas hiire E13.5 arengupäeval, kui suurem osa mesonefroosist on regresseerunud (Kaufman, Bard, 1999). Imetajate mesonefrilised nefronid koosnevad glomeerulitest, proksimaalsetest ja distaalsetest juhadest (Kuure *et al.*, 2000). Hiire mesonefriline nefron ei ole hästi arenenud ning mesonefros ei funktsioneeriks sekretoororganina (Kaufman, Bard, 1999). Mõnedel imetajaliikidel on mesonefros siiski ajutiselt funktsionaalne (Gilbert, 2000). Wolffii juha kraniaalsetel ja kaudaalsetel tuubulitel esineb erinev diferentseerumine. Vaid 4–6 paari kõige kraniaalsemaid tuubuleid on ühenduses nefrilise juhaga ning need on Wolffii juha tekkelised (Sainio *et al.*, 1997). Ühtlasi on neli rostraalsemat mesonefrilist tuubulit vajalikud munandimanuse juha väljakujunemisel (Kaufman, Bard, 1999). Kaudaalsemad tuubulid asuvad küll nefrilise juha vahetus läheduses, kuid ei ühine Wolffii juhaga. Kuigi kaudaalsed tuubulid nefrilisse juhasse ei avane, diferentseeruvad neil siiski primitiivsed nefronid (Sainio *et al.*, 1997). Mesonefros on mõõtnemelt suurim hiire E11.0–11.5 arengupäeval, kuigi samal ajal toimub rostraalsemate osade regressioon apoptoosi läbi (Kaufman, Bard, 1999). Emastel organismidel kaovad mesonefros ja nefriline juha peaaegu täielikult. Isasloomadel säiluvad osad mesonefroose tuubulid ning nefrilise juha kaudaalne osa osaleb suguelundkonna kujunemises (Kuure *et al.*, 2000). Mesonefroose tuubulid moodustavad munandi somaatilise karkassi ning munandimanuse. Nefrilisest juhast kujuneb seemnejuha. Mesonefroose regressioon on lõppenud hiire E15.0 arengupäevaks (Rossant, Tam, 2002).

Metanefrilise neeru areng saab alguse kusejuha punga väljasopistumisega nefrilisest juhast hiire E10.5 arengupäeval (Rossant, Tam, 2002). Metanefriline neer kujuneb välja kusejuha punga ja teda ümbritseva metanefrilise mesenhüümi retsiprookse signalisatsiooni tulemusel (Vainio, Müller, 1997). Kusejuha punga väljasopistumiseks nefrilisest juhast on vajalikud signaalid ümbritsevast mesenhüümist. Samas indutseerib kusejuha pung metanefrilist mesenhüümi kondenseeruma epiteliaalseteks agregaatideks, millest kujunevad

edasise arengu käigus sekretoorsed nefronid (Rossant, Tam, 2002). Diferentseeruv mesenhüüm indutseerib omakorda kusejuha punga harunemist ja pikenemist (Gilbert, 2000). Vastastikune induktsioon toimub mitmeid kordi, mille tulemusel kujuneb rohkesti harunenud „ureeter-puu“. Indutseeritud mesenhüümi rakkude kogumikest kujunevad nefronid, mis koosnevad glomeerulitest ja tuubulitest, ülejäänud mesenhümaalsed rakud panevad aluse säsi stroomale (Kaufman, Bard, 1999). Kusejuha punga tippude ümber kondenseerunud pretubulaarsed agregaadid läbivad invaginatsiooni ja elongatsiooni, mille tulemusel moodustuvad koma- ja S-kujulised tuubulid. Samal perioodil algab arenevate nefronite vaskularisatsioon (Lechner, Dressler, 1997). Epiteliaalsetest neerutuubulitest kujunevad kapillaaridega varustatud glomeerulid ehk päsmaksesed, mis ühinedes kogumistorukestega moodustavad neeru funktsionaalse üksuse ehk nefroni (Kaufman, Bard, 1999). Harunenud kusejuha pungast arenevad neerude kogumistorukesed, neeruvaagen ja ureeter, mis on vajalikud uriini eemaldamiseks neerust (Gilbert, 2000).

2. Nefrilise juha morfogeneesi kirjeldus selgroogsete erinevates klassides

Sebrakala (*Danio rerio*) vastsestaadiumi urogenitaalsüsteem on lihtsa ehitusega, koosnedes glomeerulite paarist, lateraalselt paiknevatest pronefrilistest tuubulitest ning kloaaki avanevatest nefrilistest juhadest (Drummond *et al.*, 1998). Pronefros ja nefriline juha arenevad vahelmisest mesodermist üksteisest sõltumatute struktuuridena (Kuure *et al.*, 2000). Sebrakala nefrilise juha elongatsiooni mehhanismiks on rakkude värbamine intermediaarsest mesodermist (Serluca, Fishman, 2001). 24 tundi peale viljastamist on kala nefriline juha täielikult formeerunud ning avaneb kloaaki. Samal perioodil formeerub kolmandast somiidist ventraalselt pronefroose alge, millest arenevad glomeerulid ja pronefrilised tuubulid. Embrüo E3.5 arengupäevaks on pronefros täielikult väljakujunenud ning toimib sekretoororganina (Drummond *et al.*, 1998).

Amfiibide erinevatel seltsidel areneb nefriline juha erinevate mehhanismidega (Drawbridge *et al.*, 2003). Kahepaiksetel vaheline mesoderm diferentseerub varajases neurula staadiumis (Brennan *et al.*, 1998). Pronefros ja nefriline juha arenevad samast

embrüonaalsest piirkonnast, kuid diferentseeruvad üksteisest sõltumatult. Päriskonnaliste (*Anura*) seltsi kuuluva kannuskonna (*Xenopus laevis*) pronefroose alge segregeerub vahelisest mesodermist 21. arengustaadiumis ning on nähtav 2. ja 3. somiidipaari ventraalses piirkonnas (Drawbridge *et al.*, 2003). Nefrilise juha areng vahelisest mesodermist algab aga peale pronefroose tuubulite spetsialiseerumist ja induktsiooni ning pikeneb kuni 14. somiidipaarini, kus juha elongatsioon peatub (Brennan *et al.*, 1998). Ühinemine kloaagiga toimub tänu rostraalselt pikenevale kloaagipungale, mis 14. somiidipaarini jõudes ühineb nefrilise juhaga (Drawbridge *et al.*, 2003). Kannuskonna nefrilise juha pikenemine hõlmab nii rakkude *in situ* segregatsiooni ümbritsevast mesodermist kui ka rakkude migratsiooni nefrilise juha anterioorsest piirkonnast (Lynch, Fraser, 1990). Rakkude migratsioon piirdub vaid üksikute staadiumidega juha pikenemisel (Cornish, Etkin, 1993). Nefrilise juha arengut sabakonnalistel (*Caudata*) on uuritud tõmpsuu (*Ambystoma mexicanum*) vastsetel. Nefriline juha segregeerub tõmpsuudel intermediaarse mesodermi dorsaalsest osast ning pikeneb somiitidega ventro-lateraalselt kaudaalses suunas (Poole, Steinberg, 1981). Erinevalt kannuskonna vastsetest ei pikene kloaagipung ning nefriline juha elongeerub kloaagini välja (Drawbridge *et al.*, 2003). Nefriline juha pikeneb tänu rakkude migratsioonile juha anterioorsest piirkonnast, mille tulemusel tõmpsuude nefriline juha kitseneb kranio-kaudaalses suunas (Poole, Steinberg, 1981). Teel kloaagini indutseerib nefriline juha mesonefrilise mesenhüümi kondenseerumist ning mesonefroose kujunemist (Saxén, 1987).

Lindude neerude embrüonaalne areng on komplitseeritum kui kahepaiksetel ja kaladel, sest arengu käigus läbitakse lisaks pronefroose ja mesonefroose staadiumidele ka kolmas, s.o. metanefroose staadium (Vize *et al.*, 1997). Nefrilise juha ja pronefriliste tuubulite arenemine vahelisest mesodermist on peaaegu samaaegne (Hiruma, Nakamura, 2003). Nefriline juha hakkab arenema 10. somiidipaari lähedusest ning elongeerub kaudaalses suunas (Obara-Ishihara *et al.*, 1999). Epiteliaalne juha pikeneb posterioorses suunas rakkude jagunemise ja liikumise tulemusel, indutseerides mesonefroose ja metanefroose arenemist (Obara-Ishihara *et al.*, 1999; Vize *et al.*, 1997).

Imetajate nefrilise juha elongatsioon ei ole veel päris selge. Ühtsele seisukohale, kas nefriline juha pikeneb juha epiteliaalsete rakkude proliferatsiooni tulemusel või

mesenhümaalsete rakkude värbamise teel nefrilise juha koosseisu, pole veel jõutud (Rossant, Tam, 2002).

3. Gata transkriptsioonifaktorid

Transkriptsioonifaktorite perekonna Gata moodustavad valgud, mis seonduvad DNA konsensusjärjestusega (A/T)GATA(A/G) ning sisaldavad kahte „tsinksõrm“ motiivi (Ko, Engel 1993). On näidatud, et Gata transkriptsioonifaktoritel on väga oluline roll organismi arengus, kus nad osalevad rakkude jagunemises, diferentseerumises ning liikumise kontrollis (Patient, McGhee, 2002). Imetajate organismis on kuus Gata transkriptsioonifaktorit: Gata1-Gata6 (Clarke, Berg 1999). Funktsionaalsuse alusel võib Gata transkriptsioonifaktorid jagada kahte alam perekonda: Gata1, Gata2 ja Gata3 ning Gata4, Gata5 ja Gata6. Transkriptsioonifaktorid Gata1, Gata2 ja Gata3 on peamiselt seotud hematopoeetiliste protsessidega ning neid ekspresseeritakse hematopoeetilistes tüvirakkudes ja spetsialiseerunud hematopoeetilistes eellasrakkudes ning osalevad T-lümfotsüütide, erütrotsüütide ja megakarüotsüütide diferentseerumises (Burch, 2005; Bertrand *et al.*, 2005). *Gata4*, *Gata5* ja *Gata6* ekspresseeritakse mitmetes mesodermaalset või endodermaalset päritolu organites nagu süda, kops, maks, gonaadid ja sool, kus nad osalevad koespetsiifilises geeniekspressioonis (Burch, 2005; Molkentin, 2000).

4. Transkriptsioonifaktor Gata3

Lisaks hematopoeetilisele süsteemile esineb ajalis-ruumiliselt kontrollitud *Gata3* ekspressioon ka mitmetes teistes kudedes (Lakshmanan *et al.*, 1999). *Gata3* ekspressioon hiire embrüos on esimesena detekteeritav ektoplatsentaalkoonuses, lõpuskaartes ning kloaagi piirkonnas E8.5 arengupäeval. Geeni *Gata3* ekspressioon hiire arenevas kesknärvisüsteemis algab E9.0 arengupäeval ning esineb neuraalitoru neljanda rombomeeri piirkonnas, kus osaleb tõenäoliselt tagaaju arengus (Pata *et al.*, 1999). Kuni E11.0 arengupäevani on geeni *Gata3* ekspressioon lokaliseerunud otsaju anterioorsesse piirkonda,

perifeerse närvisüsteemi ganglionitesse, areneva silma ning kõrva piirkonda ja mesonefrilise valli rakukogumikesse (George *et al.*, 1994). Samuti on *Gata3* detekteeritav nefrilises juhas ning kloaagis (Lakshmanan *et al.*, 1999). Arenguperioodil E11.0–E12.5 ilmneb *Gata3* ekspressioon keskaju seintes, ajusillas, sümpaatilistes ganglionites, seljakeeliku ventraalsel poolel, spinaalganglionites, südame ja maksa piirkonnas (George *et al.*, 1994). Samuti on ekspressioon detekteeritav lõua ning kaela piirkonnas, arenevate jäsemete proksimaalsetes osades, mesonefroses ning nefrilises juhas (Lakshmanan *et al.*, 1999). E14.5 arengupäeval jätkub ekspressioon keskajus, ajusillas, vaheajus, sisekõrvas ja perifeerse närvisüsteemi ganglionites. Samal perioodil on *Gata3* detekteeritav veel tüümuse alges, neeru glomeerulites ja neerupealises (George *et al.*, 1994).

Gata3 homosügootsed mutandid (*Gata3*^{-/-}) ei ela tavaliselt üle E11.5 arengupäeva. Surma peamiseks põhjuseks peetakse südameriket, kuna noradrenaliini puuduses ei suudeta säilitada südame homöostaasi (Lim *et al.*, 2000). Samuti on mutantsetel hiirtel kirjeldatud häireid hematopoeesis (Pandolfi *et al.*, 1995). E9.5-E10.5 arengupäeva vanused embrüod on elujõulised, kuid võrreldes samaealiste *wild-type* hiirtega aneemilised ning kasvult väiksemad. E11.5 arengupäevastele *Gata3* homosügootsetel mutantidel on iseloomulikud hüpereemilised tursunud koed ning tugevad sisemised verejooksud alakeha piirkonnas. Esinevad kõrvalekalded perifeerses- ja kesknärvisüsteemis. *Gata3* mutantide neuroepiteel on redutseerunud ning ajupõiekesed peaaegu täielikult kokku kukkunud. Neuraalitoru on tugevalt moondunud ning selle sulgumine ei pruugi olla täielik. Paljudel embrüotel on reetina alapigmenteerunud (Pandolfi *et al.*, 1995). *Gata3*^{-/-} hiirtel peatub neerude areng enne metanefrose diferentseerumist (van Esch, Bilous, 2001).

Gata3 heterosügootsed hiireloomed on elujõulised ning võimelised andma järglasi (Pandolfi *et al.*, 1995).

Transkriptsioonifaktor *Gata3* geeniekspressioon inimesel sarnaneb suuresti hiirega, viidates ajalis-ruumilise ekspressioonimustri suurele evolutsioonilisele konserveerumisele (Debacker *et al.*, 1999). Inimesel põhjustab *Gata3* haplopuudulikkus HDR (*hypoparathyroidism, deafness, renal dysplasia*) sündroomi, millega kaasneb kõrvalkilpnäärme alaareng, kurtus ja neerupuudulikkus (van Esch *et al.*, 2000).

5. Transkriptsioonifaktor *Gata3* seos hematopoesiga

Varasemates katsetes on näidatud, et transkriptsioonifaktor *Gata3* on seotud müeloerütropoesiga ning geeni ekspressiooni on täheldatud ka hematopoeetilistes rakkudes (George *et al.*, 1994). *Knock-out* katsed viitavad, et *Gata3* ei ole vajalik primitiivseks hematopoesiks (Pandolfi *et al.*, 1995). Samuti ei ekspresseerita *Gata3* rebukoti veresaarekestes, kus algab primitiivne hematopoees, ega ka rebukoti päritolu hematopoeetilistes või endoteliaalsetes rakkudes (Manaiia *et al.*, 2000). Küll aga ekspresseeritakse *Gata3* kaudaalses splanhnopleuras, kus asub embrüosiseste hematopoeetiliste tüvirakkude kujunemise piirkond ning esinevad hematopoeetiliste tüvirakkude kogumikke sisaldavad veresooned (aort, omfalomesenteeriumi ja nabaväadi arterid) (Manaiia *et al.*, 2000). *Gata3* ekspressioon esineb dorsaalaordi ventraalse külje all olevas mesodermaalses piirkonnas kogu intraembrüonaalse hematopoeetiliste tüvirakkude moodustumise ajal, mis toimub E8.0 arengupäevast kuni E12.0 arengupäevani (Manaiia *et al.*, 2000; Godin *et al.*, 1999).

Ringeelundkonnas esineb *Gata3* ekspressioon südames, südame väljavoolukulglas ja nabaväadis, kuid kaob peale veresoonkonna täielikku väljakujunemist E14.0-E15.0 arengupäeval (Lakshmanan *et al.*, 1999). Kuigi *Gata3* on ekspresseerunud areneva veresoonkonna vähestes piirkondades, põhjustab transkriptsioonifaktor *Gata3* puudus suuri hälbeid tsirkulatsioonisüsteemi arengus. Homosügootse *Gata3* mutatsiooniga kaasnevad defektid veresoonkonna formeerumises või häired siseorganite vaskulariseerimises, mille tulemusel on mutantsed embrüod võrreldes *wild-type* loodetega aneemilisemad. Samuti esinevad homosügootsetel mutantidel kõrvalekalded vereloomes ja südame ehituses (Pandolfi *et al.*, 1995; Raid *et al.*, 2006). *Gata3* mutandile on iseloomulik definitiivse hematopoeesi algamise järgselt tugevad sisemised verejooksud alakeha piirkonnas (Pandolfi *et al.*, 1995).

6. Hematopoeetiliste tüvirakkude kujunemine

Varajases embrüonaalses arengus on kaks peamist hematopoeetiliselt aktiivset piirkonda – rebukott ja embrüosisese splanhnilise mesodermi piirkond, kus toimub maksaeelne hematopoes (Medvinsky, Dzierzak, 1996). Hiire rebukott ja kaudaalne intraembrüonaalne splanhnopleura on võimelised teineteisest sõltumatult moodustama hematopoeetilisi tüvirakke. Rebukoti ja splanhnopleura tüvirakud erinevad nii diferentseerumiselt kui ka hematopoeetiliste omaduste kestvuse poolest (Cumano *et al.*, 1996). On näidatud, et erinevalt splanhnopleura päritolu hematopoeetilistest tüvirakkudest, ei ole rebukoti tüvirakud võimelised andma lümfoidset rakuliini (Nishikawa *et al.*, 1998; Cumano *et al.*, 2001) ega asustama täiskasvanud organismi lüüdi ning taastootma hematopoeetilisi rakuliini (Müller *et al.*, 1994).

Hematopoeetilise süsteemi arenemine hiire embrüos saab alguse E7.5 arengupäeval, kui ekstraembrüonaalsest mesodermist pärinev rakkude populatsioon spetsialiseerub hemangioblastideks, mis omakorda moodustavad veresaarekesed (Shalaby *et al.*, 1997). Veresaarekeste sisemised rakud kujunevad hematopoeetilisteks tüvirakkudeks, välimised rakud endoteeli eellasteks ehk angioblastideks (Rossant, Tam, 2002). Rebukoti veresaarekestes on esmased hematopoeetilised tüvirakud detekteeritavad E8.0 arengupäeval, kuid need rakud ei sisene vereringesse enne E8.5 arengupäeva, kui on ühinenud ekstraembrüonaalne ja intraembrüonaalne veresoonkond (McGrath *et al.*, 2003). Rebukoti hematopoeetilised tüvirakud panevad aluse primitiivsele hematopoesile ning vaskulogeneesile. Definiitvise hematopoeesi eellased diferentseeruvad embrüosisestest hematopoeetilistes tüvirakkudest (Cumano *et al.*, 2001).

Intraembrüonaalsed tüvirakud saavad alguse E8.0 arengupäeval aordi ventraalsel küljel asuvas kaudaalses splanhnopleuras (Cumano *et al.*, 1996; Godin *et al.*, 1999; de Bruijn *et al.*, 2000; North *et al.*, 2002). E8.5 arengupäeva vanuste hiireloodete splanhnopleura eksplanteerimisega on näidatud, et selles piirkonnas arenevad hematopoeetilised tüvirakud *in situ* mesodermist ning ei liigu sinna vereringega rebukotist. (Cumano *et al.*, 1996). Antud rakkudele on iseloomulik pikaajaline taastootmise võime (LTR) (*long-term repopulating*), mida rebukotis kujunevatel hematopoeetilistel

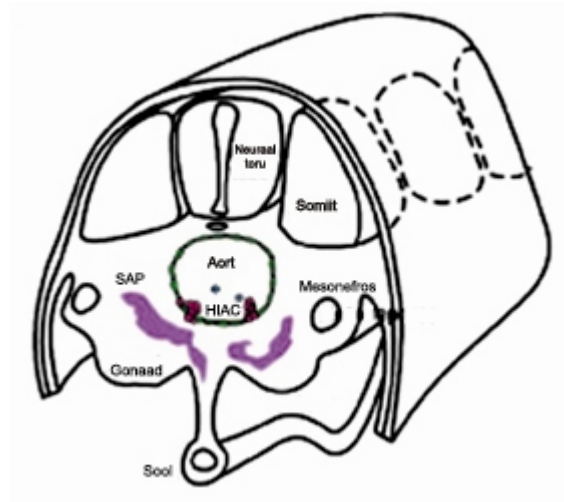
tüvirakkudel sellel perioodil veel ei esine (Cumano *et al.*, 1996; Cumano *et al.*, 2001). Peale vereringe moodustumist, E8.5 arengupäeval, on multipotentsed hematopoeetilised LTR aktiivsusega tüvirakud leitavad ka verest ja rebukotist (Müller *et al.*, 1994; Yoder *et al.*, 1997; Delassus, Cumano, 1996). Erinevalt rebukoti tüvirakkudest on splanhnopleura päritolu hematopoeetilised tüvirakud võimelised arenema nii müeloidseteks kui ka lümfooidseteks rakkudeks (Godin *et al.*, 1995). Alates E10.0 arengupäevast nimetatakse kaudaalse splanhnopleura piirkonda aort-gonaad-mesonefros (AGM) regiooniks. (Müller *et al.*, 1994). Hematopoeetiliste tüvirakkude arv AGM piirkonnas on väike, piirdudes E10.5 arengupäeva vanuses hiirelootes 100-150 rakuga (Bertrand *et al.*, 2005; Godin *et al.*, 1999). AGM piirkonna tüvirakkudele on iseloomulik transkriptsioonifaktorite Gata2 ja Gata3 ekspressioon (Bertrand *et al.*, 2005).

7. Hematopoeetiliste tüvirakkude embrüonaalsed kogumikud

Kaudaalse splanhnopleura regioonis on hematopoeetilised tüvirakud detekteeritavad kahes piirkonnas (joonis 2). Esimene piirkond, kus moodustuvad hematopoeetilised tüvirakud *in situ*, asub aordi ventraalse külje all. Seda nimetatakse subaortiliseks hematopoeetiliste tüvirakkude kogumikuks (SAP) (*subaortic patches*), mis ekspresseerib lisaks tuntud hematopoeetiliste tüvirakkude markeritele ka transkriptsioonifaktorit Gata3 (Petrenko *et al.*, 1999; Maniaia *et al.*, 2000). SAP-d on hiires detekteeritavad juba esimeste embrüosiseste hematopoeetiliste tüvirakkude ilmumisega E8.5-E9.0 arengupäeval (Godin *et al.*, 1995) ning nende esinemist on näidatud ka inimese embrüos (Marshall *et al.*, 1999).

Hiireloote hilisemas arengus, E10.0 – E10.5 arengupäeva on tuvastatud ka teine hematopoeetiliste tüvirakkude populatsioon, mis esineb embrüo aordi sees, aordi ventraalsel küljel ja endoteeli rakkude vahel. Antud rakupopulatsiooni käsitletakse kui hematopoeetiliste tüvirakkude aordisest kogumikku (HIAC) (*hematopoietic intraaortic clusters*) (Garcia-Porrero *et al.*, 1995; Godin, Cumano, 2002). HIAC tüüpi kogumikke on kirjeldatud kõikides selgroogsetes embrüotes – lindudel (Jaffredo *et al.*, 1998), inimesel

(Tavian *et al.*, 1996), sebrakalal (Thompson *et al.*, 1998) ja amfiibil (Ciau-Uitz *et al.*, 2000).



Joonis 2. Intraembrüonaalsete hematopoeetiliste tüvirakkude kogumikud. Hematopoeetilised tüvirakud esinevad E10.5 arengupäeva vanuses hiireembrüos dorsaalaordi ventraalse külje all asuvas mesodermis (SAP) või dorsaalaordi ventraalsel küljel (HIAC). Lühendid: SAP, subaortiliste hematopoeetiliste tüvirakkude kogumik; HIAC, hematopoeetiliste tüvirakkude aordisene kogumik. (Bertrand *et al.*, 2005 järgi).

HIAC-d on leitavad ainult embrüosiseste hematopoeetiliste tüvirakkude produktsiooni haripunktis (Garcia-Porrero *et al.*, 1995; Godin *et al.*, 1999). Samas SAP-d esinevad kogu intraembrüonaalsete tüvirakkude moodustumise vältel (Godin *et al.*, 1999). On oletatud, et hematopoeetilised tüvirakud arenevad SAP-des, migreeruvad aordi ventraalse külje suunas, läbivad endoteeli ning moodustavad rakkude kogumikud - HIAC-d (Bertrand *et al.*, 2005). Mõlemad struktuurid kaovad hematopoeetiliste tüvirakkude produtseerimise lõppemisel AGM regioonis E12.0 arengupäeval (Garcia-Porrero *et al.*, 1995; Maniaia *et al.*, 2000; Godin *et al.*, 1999).

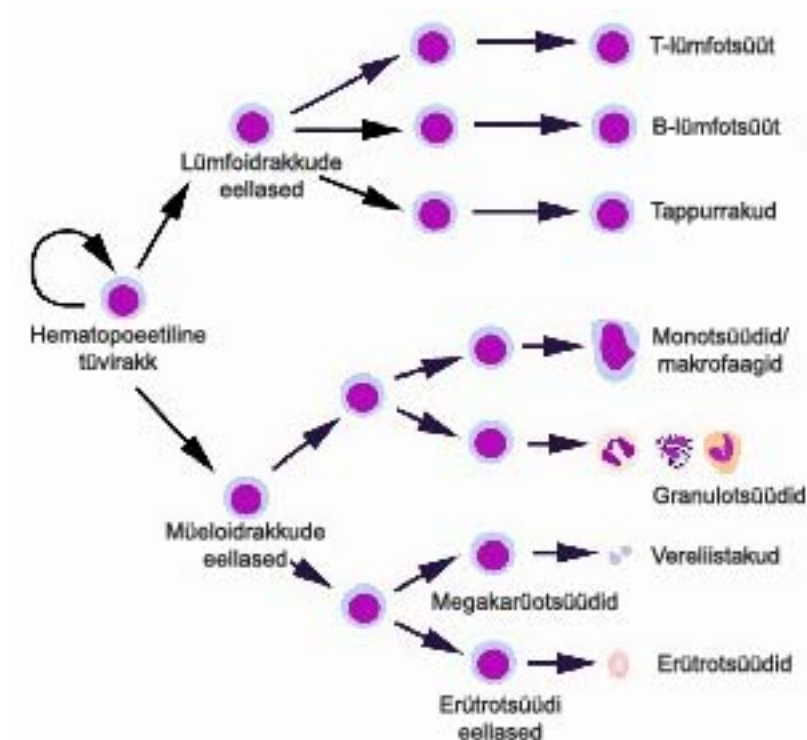
8. Hematopoeetiliste tüvirakkude diferentseerumine mittehmatopoeetilisteks rakkudeks täiskasvanud organismis

Tüvirakke defineeritakse kahe omaduse põhjal – tüvirakud on võimelised iseennast taastootma ning suutelised diferentseeruma vähemalt üheks spetsiifiliseks rakuliiniks. Hematopoeetilised tüvirakud on võimelised arenema kõikideks hematopoeetilisteks rakuliinideks ning varustama nendega organismi kogu elu vältel (joonis 3). Embrüonaalsed hematopoeetilised tüvirakud koloniseerivad hilises lootelises arengus luuüdi. Seal diferentseeruvad multipotentsed hematopoeetilised tüvirakud spetsialiseerunud hematopoeetilisteks rakkudeks (Spangrude *et al.*, 1988).

Palju on vaieldud selle üle, kas hematopoeetilised tüvirakud on võimelised arenema teisteks rakutüüpideks peale hematopoeetiliste rakkude. Viimastel aastatel on ilmunud mitmeid töid, kus on näidatud, et täiskasvanud organismi luuüdist eraldatud hematopoeetilised tüvirakud on suutelised diferentseeruma mittehmatopoeetilisteks rakkudeks, sealhulgas epiteeliks (Krause *et al.*, 2001), maksarakkudeks (Lagasse *et al.*, 2000), kardiomyotsüütideks (Bittner *et al.*, 1999), ajukoeks (Mezey *et al.*, 2000) ja skeletilihaskudeks (Ferrari *et al.*, 1998).

Transplantatsioonikatsetega on näidatud, et üks hematopoeetiline tüvirakk on võimeline taastama kiiritatud retsipientorganismi luuüdi hematopoeetilise rakupopulatsiooni ning samas diferentseeruma mitmete organite epiteelirakkudeks, sealhulgas kopsu, maksa, seedetrakti ja naha epiteliaalseteks rakkudeks (Krause *et al.* 2001). Luuüdist eraldatud hematopoeetilised tüvirakud suudavad kopsuvigastuse järgselt kujuneda kopsu epiteeliks, diferentseerudes nii tüüp I kui ka tüüp II pneumotsüütideks (Krause *et al.* 2001; Kotton *et al.*, 2001; Ortiz *et al.*, 2003). Sarnaselt on hematopoeetilised tüvirakud võimeline arenema seedetrakti epiteliaalseteks rakkudeks, sealhulgas söögitoru-, mao-, peensoole- ja käärsooleepiteeliks taastades vähesel määral kahjustatud epiteeli (Krause *et al.*, 2001; Okamoto *et al.*, 2002; Körbling *et al.*, 2002). On leitud, et epidermises kujunevad hematopoeetilistest tüvirakkudest tsütokeratiin-positiivsed epiteelirakud (Krause *et al.*, 2001). Doonorrakke esineb vähesel hulgal karvasibula piirkonnas, kuid ka naha vigastuse korral vigastatud ala servadel, kus toimub aktiivne jagunemine

(Körbling *et al.*, 2002; Borue *et al.*, 2004). Hematopoeetilised tüvirakud suudavad diferentseeruda ka neeru tuubulite epiteeliks (Poulsom *et al.*, 2001; Kale *et al.*, 2003).



Joonis 3. Hematopoeetilise tüviraku diferentseerumine hematopoeetilisteks rakuliinideks. Transplantatsioonikatsetega on näidatud, et hiire üks hematopoeetiline tüvirakk on võimeline taastama iseennast ning diferentseeruma kõigiks hematopoeetilisteks rakuliinideks (<http://www.isscr.org/public/adultstemcells.htm>).

Inimese embrüonaalses maksas esinevad eellasrakud, mis ekspresseerivad hematopoeetiliste tüvirakkude markergeene ning on võimelised *in vitro* diferentseeruma hepatotsüütideks ja kolangiotsüütideks (Nava *et al.*, 2005). Ka täiskasvanud organismis esinevad maksa bipotentsed tüvirakud, ovaalrakud, mis ekspresseerivad samuti hematopoeetiliste tüvirakkude markereid ning tagavad hepatotsüütide ja kolangiotsüütide

produktiooni tugeva maksakahjustuse järel (Theise *et al.*, 1999; Crosby *et al.*, 2001). Luuüdist eraldatud hematopoeetiliste tüvirakkude transplantatsioonikatsetega on näidatud, et maksavigastuse või geneetilise haiguse tagajärjel, pärinevad vähemalt osaliselt jagunevad ovaalrakud, hepatotsüüdid ja kolangiotsüüdid luuüdist (Petersen *et al.*, 1999; Theise *et al.*, 2000; Krause *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2003).

Hematopoeetiliste tüvirakkude potentsiaali kujuneda lihasrakkudeks on uuritud seoses lihasvigastuste või degeneratiivsete lihashaigustega. Hematopoeetilised tüvirakud on võimelised diferentseeruma skeletilihaskudeks ja kardiomyotsüütideks (Ferrari *et al.*, 1998; Bittner *et al.*, 1999). Ühe raku transplantatsioonikatsetega on näidatud, et hematopoeetilised tüvirakud suudavad vähesel määral regenererida silelihasrakke (Camargo *et al.*, 2003; Corbel *et al.*, 2003). Normaalses kudedes tüvirakkude diferentseerumine silelihasrakkudeks on väga väike, jäädes 0.01%-0.1% vahele. Nende võime regenererida lihaskiude suureneb lihaste vigastuse järgselt kuni 5%-ni (LeBarge, Blau, 2002; Brazelton *et al.*, 2003). Hematopoeetiliste tüvirakkude transplanteerimine müokardiumisse, infarkti ala lähedusse, võimendab müokardiumi regeneratsiooni (Orlic *et al.*, 2001). Hematopoeetilistel tüvirakkudel on võime diferentseeruda nii müotsüütideks kui ka südame endoteelirakkudeks (Jackson *et al.*, 2001).

Hematopoeetilised tüvirakud on võimelised migreeruma peajju ning kujunema rakkudeks, mis ekspresseerivad neuronitele omaseid antigeene (Mezey *et al.*, 2000; Brazelton *et al.*, 2000). Esineb ka vastassuunalist diferentseerumist, kus neuraalsed tüvirakud on suutelised arenema müeloid- ja lümfoidrakkudeks (Bjornson *et al.*, 1999). Täiskasvanud organismi hematopoeetilised tüvirakud on võimelised diferentseeruma neuraalseteks eellasrakkudeks ja spetsialiseeruma neuraalseteks rakutüüpideks, kujunema nii mikroglia kui ka makroglia rakkudeks, ekspresseerides astrotsüütide ja oligodendrotsüütide markereid (Eglitis, Mezey, 1997; Bonilla *et al.*, 2002; Reali *et al.*, 2006).

9. Embrüonaalsete hematopoeetiliste tüvirakkude diferentseerumine mittehmatopoeetilisteks rakkudeks

Seniajani on peamiselt uuritud hematopoeetiliste tüvirakkude rolli täiskasvanud organismi patoloogilistes kudedes. Väga vähe on teada hematopoeetiliste tüvirakkude rollist täiskasvanud organismi normaalsete kudede bioloogias ning veel vähem on seda uuritud embrüonaalses organismis.

Kana-vuti kimääriga tehtud katsetega on näidatud, et ka embrüonaalses arengus on hematopoeetilised tüvirakud võimelised diferentseeruma mittehmatopoeetiliste organite rakkudeks. Vereringest pärinevad hematopoeetilised tüvirakud lülituvad areneva vaskulatuuri koosseisu, ning diferentseeruvad endoteeli-, silelihas- ja adventitsiaalrakkudeks (Zhang *et al.*, 2006). Südames arenevad vereringest pärinevad hematopoeetilised tüvirakud kardiomüotsüütideks (Zhang *et al.*, 2006). Ka täiskasvanud hematopoeetilised tüvirakud on transplantatsiooni järgselt kana embrüo südamesse võimelised diferentseeruma kardiomüotsüütideks (Eisenberg *et al.*, 2006). Vastupidise näitena on AGM regioonist eraldatud hematopoeetiliste tüvirakkude transplantatsioonil täiskasvanud organismi maksa näidatud, et embrüonaalset päritolu rakud on võimelised lülituma maksa, neeru, kopsu ja peensoole koosseisu (Tamura *et al.*, 2002).

Kokkuvõtteks võib seniste andmete põhjal järeldada, et hematopoeetilised tüvirakud on võimelised lülituma paljude organite morfogeneesi.

Ekspérimentaalne töö

1. Materjal ja metoodika

1.1 Kasutatud hiireliin ja genotüüpiseerimine

Antud töös kasutati *Gata3^{nslacZ}* hiireliini (Hendriks *et al.*, 1999). Embrüote genotüüpiseerimiseks kasutati dissekteerimisel eraldatud rebukoti koematerjali. Kudede lüüsimiseks valmistati lüüsilahus (1x lüüsipuhver (180 mM Tris-HCl (pH 9.0); 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0.02% Tween 20); 0.5 mg/ml proteinaas K; ddH₂O). Koematerjali inkubeeriti lüüsilahuses üleöö 56°C juures ning inaktiveeriti 20 min 98°C juures. Lüüsilahust fuugiti 5 min 12.000g ning tuubides sisalduvat DNA-d kasutati polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR) läbiviimiseks. PCR teostamiseks kasutati järgnevaid praimereid:

G3ex2-F 5'-CCT CCG ACG GCA GGA GTC-3' ,
G3ex2-R 5'-ACC GTA GCC CTG ACG GAG TTT-3' ,
LacZ-R1 5'-ACG GCG GAT TGA CCG TAA TG-3'.

PCR reaktsioonisegu koostisosadeks olid: 1× (NH₄)₂SO₄ puhver (Fermentas), 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 0.25 µM praimer G3ex2-F, 0.1 µM praimer G3ex2-R, 0.15 µM praimer LacZ-R1, 1 ühikTaq DNA polümeraas, millele lisati 10-50 ng uuritavat DNA-d. Proovi kogumaht oli 20 µl. Kasutatud PCR programmi tingimused olid:

94°C 5 min
94°C 30s
60°C 30s } 33 tsükli
72°C 40s
72°C 5 min

PCR produkti analüüsiti 1% TAE agarosgeel-elektroforeesil.

1.2. Embrüote dissekteerimine

Antud töös kasutatud hiirelooted olid embrüonaalses vanuses E9.0, E9.25, E9.5 ja E10.5 arengupäeva. Embrüote vanus määrati somiidipaaride arvu järgi ning jagati vastavalt vanusegruppidesse (Kaufman, 1992). Embrüod dissekteeriti emakasarvedest ning vabastati embrüonaalsetest kestadest. Dissekteerimisel eraldatud rebukotti kasutati loote genotüübi määramiseks. Embrüod fikseeriti toatemperatuuril kas 4% paraformaldehüüd (PFA)/PBS lahuses 30 min või Amsterdami fiksaatoris 2 tundi.

1.3. β -galaktosidaasi värvusreaktsioon hiireembrüotel

β -galaktosidaasi värvusreaktsiooni esilekutsumiseks *Gata3^{nlslacZ}* hiireloodel, fikseeriti embrüoid 4% PFA/PBS lahuses 30 min. Järgnevalt pesti embrüoid kolm korda Rinse puhvris (100 mM PBS (pH 7.3), 72 mM Na₂HPO₄, 28 mM NaH₂PO₄, 2 mM MgCl₂) 30 min. Hiirelooted asetati värvilahusesse (1× Rinse puhver, 5 mM kaalium ferritsüaniid, 5 mM kaalium ferrotsüaniid, 1 mg/ml X-Gal (20 mg/ml dimetüülformamiid; Fermentas)). Värvusreaktsioon toimus toatemperatuuril pimedas üleöö. Värvilahuse eemaldamiseks pesti embrüoid Rinse puhvriga kolm korda 5 min ning järelfikseeriti 4% PFA/PBS lahusega üleöö +4°C juures. Värvusreaktsiooni uurimiseks sisestati hiirelooted araldiiti ning lõigati mikrotoomiga.

1.4 Embrüote sisestamine araldiiti ja lõikamine mikrotoomiga

Mikrotoomilõikude valmistamiseks sisestati uuritav materjal araldiiti. Selleks dehüdreeriti looted tõusvas etanooli reas (50%, 70%, 80%, 90%, 96%, 100%). Igas lahuses hoiti embrüoid 30 min. Järgnevalt hoiti looteid 5 min 100% etanooli ja atsetooni segus (1:1). Araldiidiga immutamine toimus astmeliselt, mille käigus hoiti embrüoid atsetoon/araldiidi segus 3:1 30 min ning atsetoon/araldiidi segus 1:1 3 tundi. Viimase etapina sisestati looted puhta araldiidiga täidetud vanni. Peale kolmetunnist 100% araldiidis

seismist, järgnes loodete polümeriseerimine kahes etapis. Esmalt hoiti araldiiti sisestatud looteid 24 tundi 37°C juures ning seejärel 24 tundi 60°C juures.

Lõplikult tardunud embrüotest valmistati mikrotoomiga SuperCut 2050 10-15 µm paksused lõigud, mis sulundati araldiiti.

1.5 Parafiinlõikude valmistamine embrüotest

Immunohistokeemia tegemiseks sisestati dissekteeritud hiirelooted parafiini ning valmistati parafiinlõigud. Dissekteeritud looted fikseeriti Amsterdami fiksaatoris (metanool:atsetoon: jää-äädikas:ddH₂O suhtes 7:7:1:5) 2 tundi, toatemperatuuril. Järgnes pesu 3 korda 15 min PBS-is. Looded dehüdreeriti tõusvas alkoholi reas, vastavalt 3 korda 15 min 50% etanoolis, 3 korda 10 min 70% etanoolis, 10 min 90% etanoolis, 2 korda 8 min 96% etanoolis ja 2 korda 8 min 100% etanoolis. Järgnevalt hoiti looteid 5 min ksüleenis ning viidi üle ksüleen/parafiin 1:1 segusse ja inkubeeriti 57°C juures 1 tund. Looded viidi üle 100% parafiini ning inkubeeriti 57°C juures 2 tundi. Järgmises etapis asetati embrüod parafiini sisaldavasse plastvormi, mida eelnevalt oli määratud glütserooliga ning jahutati külmaplaadil. Parafiinplokke säilitati 4°C juures kuni lõikamiseni. Parafiinplokkide lõikamiseks kasutati mikrotoomi Microm HM 200, millega valmistati 7 µm paksused lõigud. Parafiinlõigud asetati silaanitud alusklaasile veetilga sisse ning hoiti 24 tundi 37°C juures. Parafiinlõigud säilitati edasiseks tööks 4°C juures.

1.6. Immunohistokeemia parafiinlõikudele

Valgu ekspressiooni lokaliseerimiseks teostati immunohistokeemia parafiinlõikudele. Deparafineerimise eelselt soojendati parafiinlõikudega alusklaase 57°C juures 30 min. Seejärel deparafineeriti alusklaasid ksüleeniga ning rehüdreeriti, kasutades langevat alkoholirida (100% etanool; 96% etanool; 80% etanool; 70% etanool; 50% etanool), hoides iga lahust peal 3 min. Viimases etapis pesti alusklaase 2 korda 5 min ddH₂O-ga. Koelõike kuumutati 12 min 10mM tsitraathappes (pH6.0) ning jahutati. Seejärel

pesti 3 korda 3 min PBS puhvriga. Lõike töödeldi 3% H₂O₂ lahusega 5 min pimendatud niisutuskambris ning pesti taas 3 korda 3 min PBS lahusega. Blokeerimiseks kasutati 1.5% hobuse seerumit (Vectastain), millele järgnes kudede inkubeerimine primaarse antikehaga (anti-CD34) (Santa Cruz Biotechnology), lahjendusega 1:200 üleöö +4°C juures pimendatud niisutuskambris. Sekundaarse antikehaga (Biotinylated anti-goat IgG (H+L) (Vector Laboratories) (10 µg/ml) inkubeeriti 1 tund pimendatud niisutuskambris. Koelõike pesti 3 korda 3 min PBS lahusega ning inkubeeriti ABC-reagendiga (Vectastain) 30 min pimedas niisutuskambris. Värvusreaktsiooni esilekutsumiseks inkubeeriti lõike 1x DAB substraadiga (Boehringer Mannheim) 3-5 min. Reaktsiooni blokeerimiseks kasutati kraanivett. Lõigud dehüdreeriti tõusvas alkoholireas (50% etanool, 70% etanool, 90% etanool, 96% etanool), hoides igat lahust peal 3 min. Viimase etapina hoiti koelõike 5 min ksüleenis ja sulundati kasutades sulundusvedelikku DePeX (Serva Electrophoresis).

1.7. *Whole-mount* embrüote ja koelõikude pildistamine

Whole-mount embrüoid vaadeldi binokulaariga Olympus SZX12 ning kasutati vaheobjektiivi Olympus DF Plapo 1xPF. Koelõikude vaatlemiseks kasutati mikroskoopi Zeiss Axioskop. Pildistamiseks kasutati CCD kaamerat SensiCam ning parema kvaliteedi saamiseks töödeldi pilte arvutiprogrammiga Adobe Photoshop 7.0.

Tulemused

1. Wolffi juha elongatsioon *Gata3* homosügootses mutandis

Homosügootsete *Gata3* mutantsete hiirte neerude arengu morfoloogia kirjeldamiseks kasutati *Gata3^{nlslacZ}* hiireliini embrüoid vanuses E9.0, E9.25, E9.5 ja E10.5 arengupäeva (joonis 4, 5). Nimetatud hiireliini embrüotes peegeldab β -galaktosidaasi ekspressioon endogeense *Gata3* ekspressiooni (Pata *et al.*, 1999). Võrdluseks kasutati *Gata3* heterosügootseid hiirelooteid, kuna nende neerude arengus, võrreldes *wild-type* embrüotega, erinevusi ei ole täheldatud.

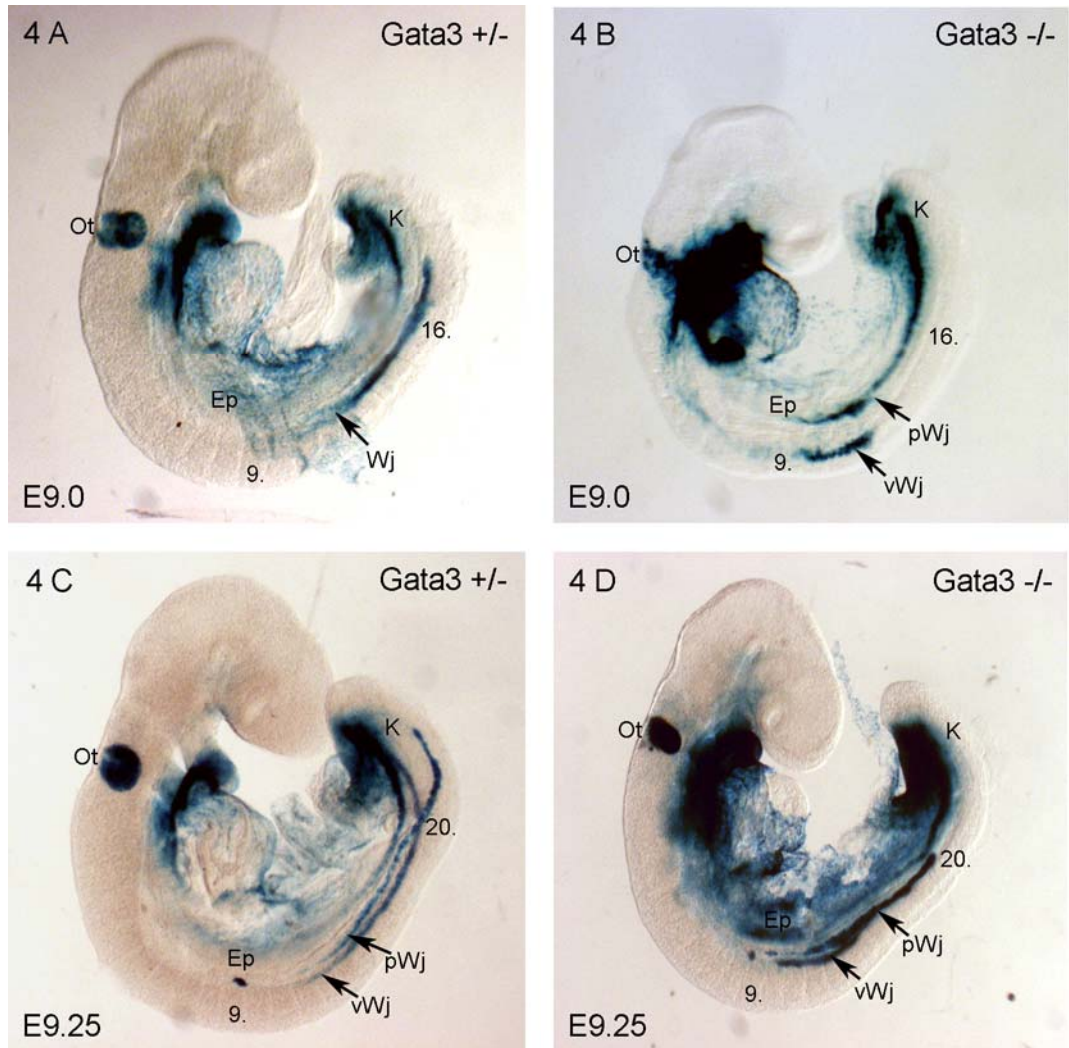
Gata3 mutantsed (*Gata3^{-/-}*) hiirelooted on varajases embrüonaalses arengus võrreldes heterosügootidega (*Gata3^{+/-}*) mahajäänunud ja kasvult märgatavalt väiksemad (joonis 4 A, B). E9.0 arengupäevastel hiireloodetel esineb β -galaktosidaasi ekspressioon lisaks mitmetele teistele piirkondadele ka arenevates Wolffi juhades. Selles vanuses *Gata3^{+/-}* hiireloodetel on Wolffi juhad pikenenud 18.-19. somiidipaarini (joonis 4 A). *Gata3^{-/-}* embrüote Wolffi juha elongatsioon on aeglasem, ulatudes vaevalt 16. somiidipaarini (joonis 4 B). Vanuses E9.0 arengupäeva ilmneb, et mutantse organismi Wolffi juhade pikenedamine võib olla asümmeetriline (joonis 4 B).

Järgmiseks vaadeldavaks ajapunktiks oli embrüonaalne vanus E9.25 arengupäeva. Selles vanuses on *Gata3^{+/-}* hiireloodetel Wolffi juhad jõudnud pikeneda kloaagi piirkonda (joonis 4 C). Samavanustel *Gata3^{-/-}* embrüotel ulatub Wolffi juha ainult 20. somiidipaarini (joonis 4 D). Homosügootsetele mutantidele on iseloomulik juhade asümmeetriline elongatsioon, mis väljendub vasaku juha ekstensiooni mahajäävuses parempoolsest juhast (joonis 4 D).

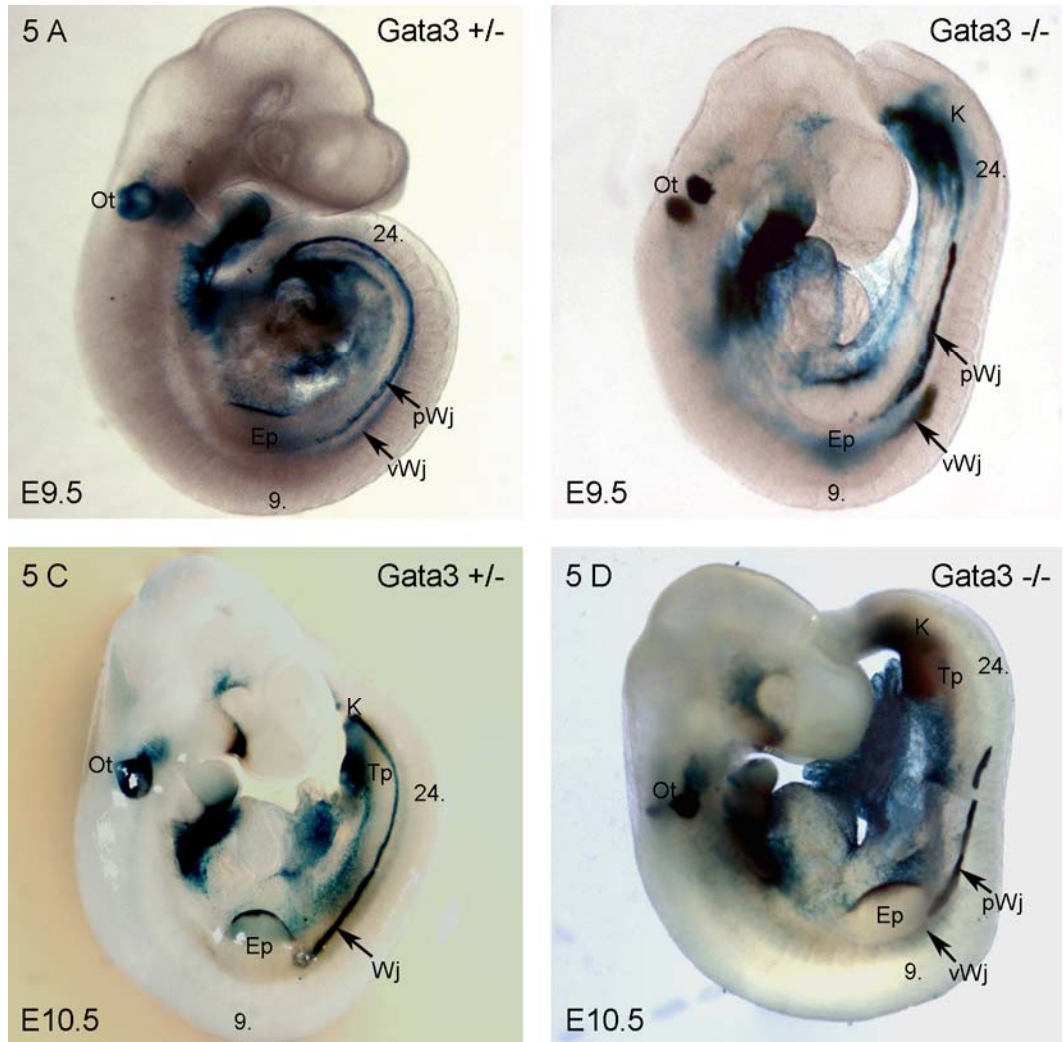
E9.5 arengupäeval on *Gata3^{+/-}* embrüote Wolffi juhad jõudnud kloaagini (joonis 5 A). Samas on *Gata3^{-/-}* loodetel parempoolse Wolffi juha pikenedamine seisma jäänud 20. somiidipaari juures. Vasakpoolse Wolffi juha elongatsioon jääb omakorda parempoolsest maha 5-6 somiidipaari (joonis 5 B).

E10.5 arengupäeva vanuste hiireloodete Wolffi juha morfoloogia on analoogiline E9.5 arengupäevastele embrüotele. Heterosügootse loote Wolffi juha on pikenenud

kloaagini (joonis 5 C). Samas *Gata3* homosügootses mutandis on parempoolse juha kaudaalne tipp jätkuvalt 20. somiidipaari juures ja vasak omakorda 5-6 somiidipaari tagapool, mis näitab, et vanuse kasvades *Gata3*^{-/-} embrüotes juhade ekstensiooni ei toimu ning Wolffi juhade pikenemine lõpeb neil vanuses E9.5 arengupäeva (joonis 5 D).



Joonis 4. *Gata3*^{-/-} ja *Gata3*^{+/-} hiireembrüote ekspressioonimustri üldpilt vanuses E9.0 ja E9.25 arengupäeva, β-galaktosidaasi värvusreaktsioon. Vanuses E9.0 arengupäeva *Gata3*^{+/-} loote Wolffi juha on pikenenud 19. somiidipaarini (A). *Gata3*^{-/-} embrüo Wolffi juha vanuses E9.0 arengupäeva, ulatub 16. somiidipaarini (B). Vanuses E9.25 arengupäeva *Gata3*^{+/-} loote Wolffi juha on jõudnud kloaagi piirkonda (C). E9.25 arengupäeva vanuse *Gata3*^{-/-} embrüo Wolffi juha on pikenenud 20. somiidipaarini (D). Vasakpoolse juha ekstensioon jääb homosügootsetel mutantidel maha parempoolsest (B, D). Suurendus: 32 X (A, B), 25 X (C, D) Lühendid: ot, ototsüst; Ep, esijäsemepung; K, kloaak; Wj, Wolffi juha; vWj, vasakpoolne Wolffi juha; pWj, parempoolne Wolffi juha; 9., 16., 20., somiidipaaride arv.



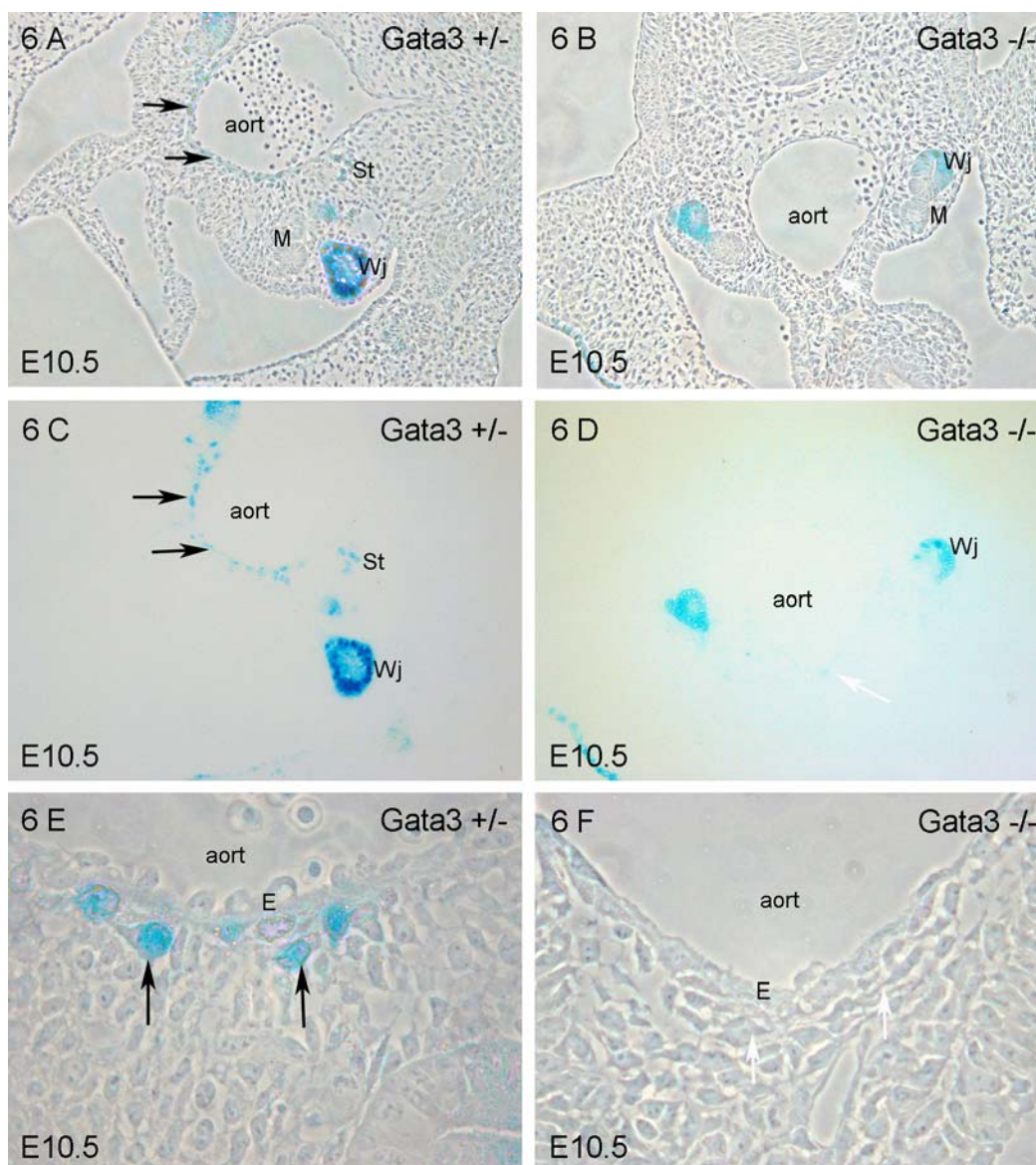
Joonis 5. *Gata3*^{-/-} ja *Gata3*^{+/-} hiireembrüote ekspressioonimustri üldpilt E9.5 ja E10.5 arengupäeva, β-galaktosidaasi värvusreaktsioon. Vanuses E9.5 arengupäeva on *Gata3*^{+/-} hiireloote Wolfffi juha jõudnud kloaagini (A). *Gata3*^{-/-} Wolfffi juha pikenemine on seisma jäänud 20. somiidipaari juures. *Gata3*^{-/-} embrüo vasakpoolse juha elongatsioon jääb selgelt maha parempoolsest (B). Vanuses E10.5 arengupäeva Wolfffi juha pikenemine on analoogne vanusega E9.5 - *Gata3*^{+/-} Wolfffi juha on elongeerunud kloaki (C), *Gata3*^{-/-} embrüo Wolfffi juha pikenemine on lõplikult seisma jäänud 20. somiidipaari juures (D). Suurendus: 25 X (joonis A, B), 20 X (joonis C, D). Lühendid: ot, ototsüst; Ep, esijäsemepung; Tp, tagajäsemepung; K, kloak; Wj, Wolfffi juha; vWj, vasakpoolne Wolfffi juha; pWj, parempoolne Wolfffi juha; 9., 24., somiidipaaride arv.

2. *Gata3* ekspressioon dorsaalaordi ventraalsel küljel

Uurimaks lähemalt Wolffi juha elongatsiooni, valmistati β -galaktosidaasi värvusreaktsiooniga ilmnestatud *Gata3*^{+/+} ja *Gata3*^{-/-} loodetest seerialõigud.

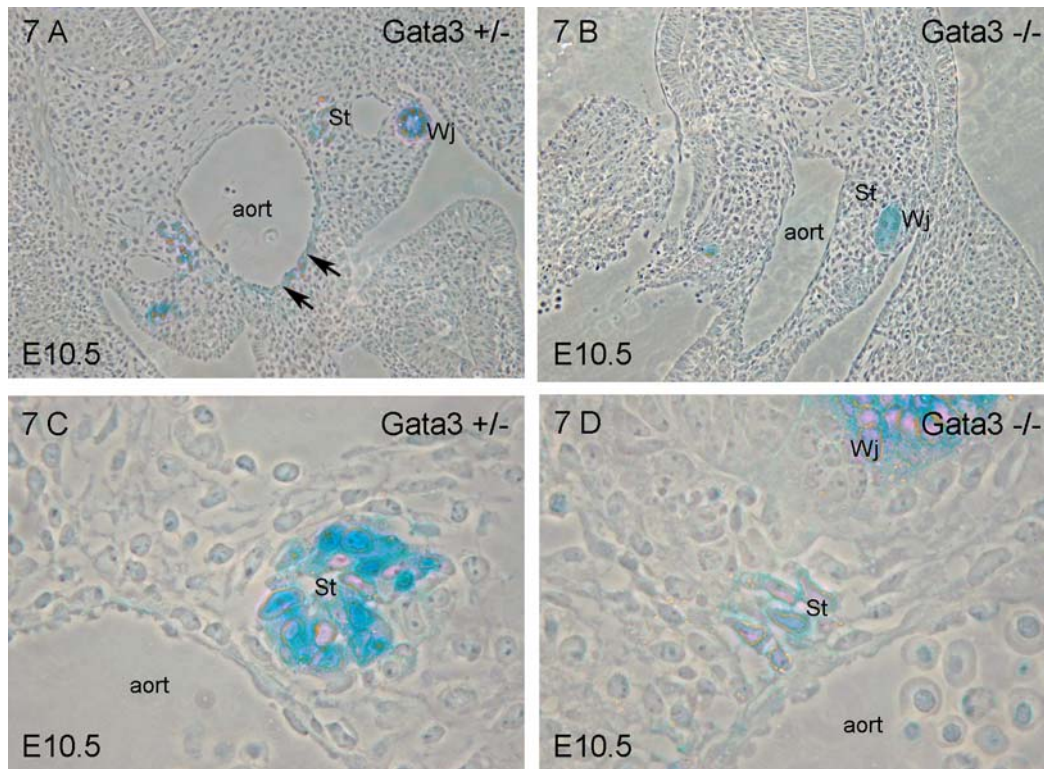
Vanuses E10.5 arengupäeva tuvastati *Gata3* heterosügootsete embrüote seerialõikudel AGM regioonis *Gata3* positiivsete rakkude populatsioonid. *Gata3* positiivsed rakud esinesid *Gata3* heterosügootsete embrüote dorsaalaordi ventraalsel küljel (joonis 6 A, C, E). Antud rakkude morfoloogia erines ümbritsevatest rakkudest, olles märgatavalt suuremad ning ümara kujuga (joonis 6 E). Uurides *Gata3*^{-/-} embrüote AGM regiooni ilmnes, et iseloomuliku kuju ja paigutusega *Gata3* positiivsete rakkude arvukus oli tugevalt langenud. Dorsaalaordi ventraalsel küljel olid *Gata3* positiivsed rakud enamikel juhtudel kadunud, esinesid vaid üksikud *Gata3* positiivsed rakud (joonis 6 B, D, F). Dorsaalaordi endoteelirakud kummagi genotüübi puhul *Gata3* positiivset värvusreaktsiooni ei andnud (joonis 6 E, F).

Samas olid detekteeritavad ka dorsaalaordist lateraalselt esinevad *Gata3* positiivsed sümpaatilise närvitüve rakud, mis oma käävja kuju ja lateraalse paigutusega olid selgesti eristatavad dorsaalaordi ventraalse külje rakupopulatsioonist (7 A, C). *Gata3*^{-/-} loodetes oli sümpaatilise närvitüve rakkude arvukus märgatavalt langenud (joonis 7 B, D).



Joonis 6. Gata3 ekspressioon aordi piirkonnas E10.5 arengupäeva, β -galaktosidaasi värvusreaktsioon.

Gata3^{+/-} (A, C, E) ja *Gata3*^{-/-} (B, D, F) *Gata3*^{+/-} hiireembrüotes esineb *Gata3* ekspressioon Wolffii juhades, sümpaatilises närvitüves ning dorsaalaordi ventraalsel küljel (A, C). Dorsaalaordi ventraalsel küljel *Gata3* positiivsete rakkude populatsioon (C). Homosügootses mutandis *Gata3* ekspressioon täheldatav Wolffii juhades (B, D). Dorsaalaordi ventraalsel küljel *Gata3* positiivseid rakke ei esine (F). Joonisel A, B, E, F kasutatud faaskontrast-mikroskoopi. Suurendus: 400 X (A, B, C, D); 1000 X (E, F). Lühendid: M, mesonefros; Wj, Wolffii juha; Sü, sümpaatiline tüvi; E, endoteel. Mustad nooled viitavad võimalikele *Gata3* positiivsetele hematopoeetilistele tüvirakkudele aordi ventraalses osas. Valged nooled viitavad samale regioonile *Gata3*^{-/-} lootes, kus *Gata3* positiivsed rakud puuduvad.



Joonis 7. *Gata3* ekspressioon aordi lateraalses piirkonnas E10.5 arengupäeva, β -galaktosidaasi värvusreaktsioon. *Gata3*^{+/+} (A, C) ja *Gata3*^{-/-} (B, D) hiirelooted. Dorsaalaordist lateraalselt paiknevad *Gata3* positiivsed sümpaatilise närvitüve rakud (A). Rakkudele on iseloomulik kävjas kuju ja koondumine tihedasse gruppi (C). *Gata3*^{-/-} hiireloodetes on sümpaatilise närvitüve rakkude arvukus langenud (B, D). Kasutatud faaskontrast-mikroskoopi. Suurendus: 400 X (A, B), 1000 X (C, D). Lühendid: St, sümpaatiline närvitüvi; Wj, Wolffi juha. Nooled viitavad võimalikele hematopoeetilistele tüvirakkudele.

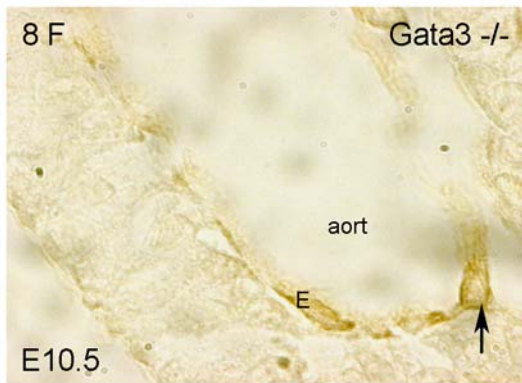
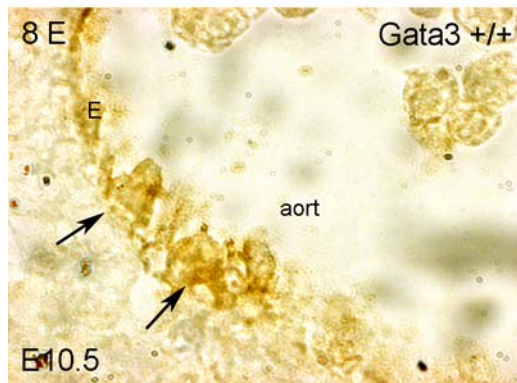
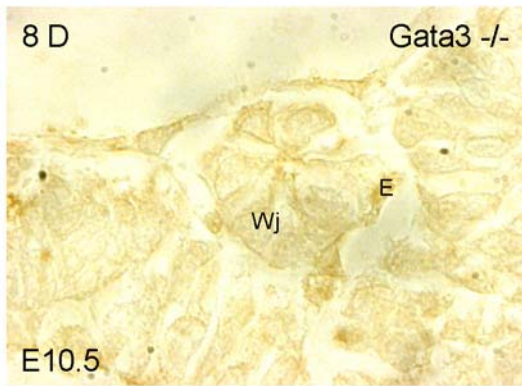
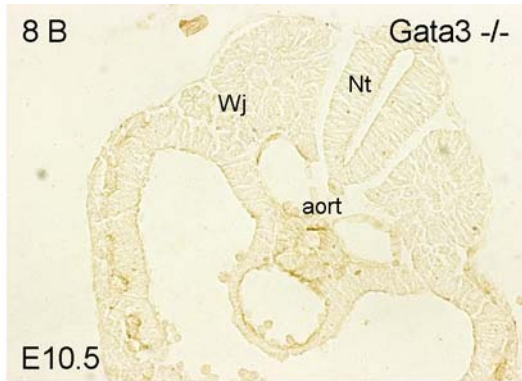
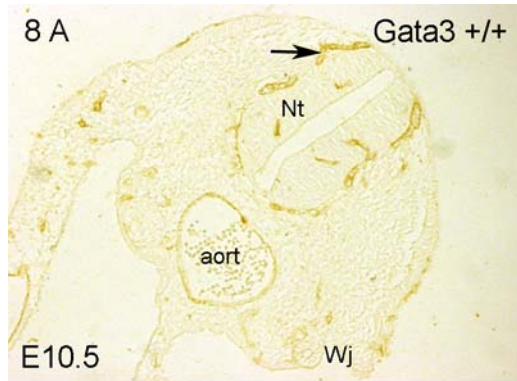
3. CD34 positiivsete rakkude levik aordi piirkonnas

Tuvastamiseks dorsaalaordi ventraalselt küljelt leitud *Gata3* positiivset rakupopulatsiooni, kasutati hematopoeetiliste tüvirakkude markerit CD34. Et uurida CD34 ekspressiooni erinevusi *wild-type* (*Gata3*^{+/+}) hiireloometes ja homosügootsetes mutantides (*Gata3*^{-/-}), valmistati E10.5 arengupäeva vanustest embrüotest 7 µm paksused parafiinlõigud, millele teostati immunohistokeemiline reaktsioon, kasutades CD34-vastast antikeha.

Parafiinlõikudel ilmnes, et CD34 ekspressioon oli *Gata3*^{-/-} hiireloometes võrreldes *Gata3*^{+/+} alanenud (joonis 8). *Wild-type* hiireloometes ekspresseeriti CD34 laialdaselt endoteeli rakkudes (joonis 8 A, C). Homosügootses mutandis oli CD34 ekspressioon märgatavalt langenud – endoteelirakud ekspresseerisid CD34 vähemal määral või ei ekspresseerinud üldse (joonis 8 B, D). Kui *Gata3*^{+/+} embrüote Wolffii juha ümbritsevate veresoonte endoteelirakud ekspresseerisid tugevalt CD34 (joonis 8 C), siis *Gata3*^{-/-} loodete nefrilist juha saatvates veresoontes oli CD34 ekspressioon märgatavalt langenud. Vaid üksikud endoteelirakud olid CD34 positiivsed (joonis 8 D).

Uurides dorsaalaordi ventraalset piirkonda, tuvastati *wild-type* hiireloometes CD34 positiivsete rakkude populatsioon, mis oma kujult erinesid endoteeli rakkudest (joonis 8 E, G). Kujult ümmargused ja suured rakud esinesid ainult dorsaalaordi ventraalses piirkonnas dorsaalaordi all või dorsaalaordi põhjas (joonis 8 E, G). *Gata3*^{-/-} hiireloometes CD34 positiivseid iseloomuliku kujuga rakke dorsaalaordi all üldjuhul ei esinenud. Detekteeritavad olid vaid üksikud CD34 positiivsed rakud (joonis 8 F). Oma mõõtmetelt ja paigutuselt langesid aordi ventraalses osas olevad rakud kokku LacZ positiivsete (*Gata3* ekspresseerivate) rakkudega samas piirkonnas.

Sümpaatilise närvitüve piirkonnas CD34 positiivsed rakke ei tuvastatud (joonist pole näidatud).



Joonis 8. CD34 positiivsete rakkude levik aordi piirkonnas. CD 34 ekspressioon *wild-type* ($Gata3^{+/+}$) embrüotes (A, C, E, G) ja $Gata3^{-/-}$ loodetes (B, D, F) vanuses E10.5 arengupäeva. CD34 ekspressioon *wild-type* embrüo endoteelis on märgatavalt intensiivsem kui $Gata3^{-/-}$ embrüotel (A, B, C, D). Homosügootse mutandi Wolff'i juha saatvates veresoontes on CD34 ekspressioon langenud võrreldes kontrolliga (C, D). *Wild-type* loodete dorsaalaordi ventraalses osas esinevad CD34 positiivsed hematopoeetilised tüvirakud (nool) ja endoteeli rakud (E, G). $Gata3^{-/-}$ loodete samas piirkonnas esinevad vaid üksikud hematopoeetilised tüvirakud (nool) (F). Endoteelis on CD34 ekspressioon tugevalt langenud (F). Suurendus: 100 X (A, B); 1000 (C, D, E, F, G). Lühendid: Nt, neuraalitoru; Wj, Wolff'i juha; E, endoteel. Nool viitab CD34 positiivsetele hematopoeetilistele tüvirakkudele.

Arutelu

Nefriline juha ehk Wolfffi juha on neerude ja gonaadide arengu üheks keskseks elemendiks. Oma pikenemisel kloaagi suunas, indutseerib ta mesonefroose ja metanefroose arengu ning osaleb ka isassuguorganite kujunemises (Kuure *et al.*, 2000). Kuigi Wolfffi juha on neerude arengus oluline, on teadmised tema varajase arengu kohta siiski kesised. Seniajani on peamine rõhuasetus olnud kusejuha punga väljasopistumise ja metanefroose arengu uurimisel. Suhteliselt vähe on teada Wolfffi juha initsiatsiooni, elongatsiooni ja diferentseerumise kohta. Arvatakse, et nefrilise juha pikenemine toimub täna rakkude migratsioonile kaudaalses suunas ja/või rakkude värbamisele ümbritsevast vahelmisest mesodermist (Rossant, Tam, 2002). On selgunud, et Wolfffi juha elongatsioon on liigispetsiifiline, kuid imetajate nefrilise juha pikenemise mehhanismi ei tunta.

Nefrilise juha elongatsiooni ja neerude arenguga on seotud mitmed transkriptsioonifaktorid, sealhulgas *Gata3*, mille mutatsioonid resulteeruvad hiire Wolfffi juha arengu häiretega ning selle tulemusel nii neeru kui ka isassuguorganite puudulikkusega. Sarnaselt hiirele põhjustab *Gata3* puudulikkus häireid ka inimese neerude arengus (Lim *et al.*, 2000; van Esch *et al.*, 2000). Antud töö esmaseks eesmärgiks oli Wolfffi juha elongatsiooni uurimine. *Gata3* homosügootse mutandi Wolfffi juha areng on häiritud juba elongatsiooni varajastes staadiumites. E9.0 arengupäevastes hiireloodetes on täheldatav, et mutantse organismi Wolfffi juha pikenemine on võrreldes heterosügootse kontrolliga aeglasem ning asümmeetriline. Erinevus *Gata3*^{+/-} organismiga suureneb vanuse kasvades. E9.5 arengupäeval, kui heterosügootse hiireloote Wolfffi juha on jõudnud pikeneda kloaaki, on *Gata*^{-/-} embrüo Wolfffi juha oma arengus 20. somiidipaari juurde seisma jäänud. Seda et elongatsioon on lõppenud, tõestab ka E10.5 arengupäeva vanuste hiireloodete analüüs. *Gata3*^{-/-} hiireloodetele on iseloomulik vasakpoolne juha mahajäävus parempoolsest. Asümmeetrilise pikenemise tagamaad on veel selgusetud. Antud töö teiseks eesmärgiks oli leida vastus küsimusel, miks Wolfffi juha elongatsioon *Gata3*^{-/-} hiireloodetes lõpuni ei lähe.

Imetajate mesonefros kujuneb mesodermaalses piirkonnas, mida nimetatakse aort-gonaad-mesonefros (AGM) regiooniks. Kuigi mesonefros on lühiajaline organ, on tal siiski tähtis funktsioon arengus. Lisaks mesonefrilise neeru arengule on AGM regioon

intraembrüonaalsete hematopoeetiliste tüvirakkude algallikas ning oluline vererakkude arenemiseks (Medvinsky, Dzierzak, 1996). Faktorid mis kujundavad AGM regiooni on senini veel tundmata. On spekuleeritud, et AGM regioonis võib esineda anterioorne-posterioorne hematopoeetiliste tüvirakkude gradient, millel võib olla mõju pronefroose piirkonna rakkude migratsioonile. (Medvinsky, Dzierzak, 1996; Pietilä, Vainio, 2005). Nendele faktidele tuginedes pöörati tähelepanu *Gata3*^{-/-} loodete AGM regiooni lähemale uurimisele.

Antud töös näidati β -galaktosidaasi värvusreaktsiooniga endogeense *Gata3* ekspressiooni *Gata3*^{+/-} organismi AGM regioonis. Selgus, et heterosügootsetel loomadel on arodi ventraalses piirkonnas vaadeldavad suured *Gata3* positiivsed iseloomuliku ümmarguse kujuga rakud, mis oma lokalisatsioonilt vastavad hematopoeetilistele tüvirakkudele. Tuleb rõhutada, et selliste rakkude arvukus erines tunduvalt *Gata3* heterosügootsetel ja homosügootsetel mutantsetel embrüotel. *Gata3*^{-/-} loodete aordi ventraalsel küljel võis täheldada vaid üksikuid nõrgalt värvunud rakkusid.

Kuna *Gata3* positiivsete rakkude lokalisatsioon viitas, et tegemist võib olla hematopoeetiliste tüvirakkudega ning kuna geenikiibi katsetega on näidatud, et *Gata3* ekspresseeritakse LTR aktiivsusega hematopoeetilistes tüvirakkudes (Zhong *et al.*, 2005; Bertrand *et al.*, 2005), püüti selgitada välja nende rakkude päritolu. Tuvastamaks, kas tegemist on tõesti hematopoeetiliste tüvirakkudega, kasutati detekteerimiseks glükoproteiini CD34. CD34 on transmembraanne raku pinna valk, mida ekspresseeritakse inimese ja hiire hematopoeetilise süsteemi tüvirakkudes ja eellasrakkudes. *CD34* ekspressioon kaob peale rakkude lõplikku diferentseerumist. Samas on *CD34* ekspressioon täielikult kadunud täiskasvanud hiire luuüdi hematopoeetilistel tüvirakkudel. Inimesel ekspressioon säilib (Krause *et al.*, 1994; Sato *et al.*, 1999; Novelli *et al.*, 1998). Samuti esineb *CD34* angioblastides ja endoteeli rakkudes (Fina *et al.*, 1990). Uurides valgu ekspressiooni lõigu tasemel ilmnes, et CD34 ekspressioon oli *Gata3* mutantidel märgatavalt langenud. *Gata3* homosügootsetes mutantides esines väga harva CD34 positiivseid hematopoeetilisi tüvirakke dorasaalaordi ventraalsel küljel. Samas *wild-type* embrüotes olid hematopoeetiliste tüvirakkude kogumikud SAP-des selgesti detekteeritavad. *Wild-type* loodetes olid vaadeldavad ka *Gata3* positiivsed HIAC-d, mis on otseses kontaktis aordi

endoteeliga. Seega on transkriptsioonifaktor Gata3 vajalik hematopoeetiliste tüvirakkude moodustumiseks AGM regioonis.

Aordi piirkonnas tüvirakkude uurimisel on alati oht, et ekslikult võetakse arvesse ka sümpaatilise närvitüve rakud, mis on samuti *Gata3* positiivsed. Siinkohal tuleb aga toonitada, et sümpaatilise närvitüve kogumikud lokaliseeruvad vaadeldavas perioodis aordi lateraalsetes osades. Need rakud on oma mõõtmetelt väiksemad, käävja kujuga ja moodustavad ebakorrapäraseid kogumikke. Seega on lihtne neid rakke eristada hematopoeetilistest tüvirakkudest.

Eraldi tuleb diskuteerida CD34 positiivsete endoteelirakkude üle. Nagu meie uurimusest selgus, on selliste endoteelirakkude levikus suured erinevused *wild-type* ja *Gata3*^{-/-} hiireloomudel. Senini ei ole kirjanduses täit selgust selliste rakkude olemuse üle. Kas tegemist on hematopoeetiliste rakkude eellastega või järglastega? Hüpoteese on püstitatud mõlema kohta. Meie töös on ilmne, et CD34 positiivse endoteeliga kapillaare on *wild-type* loodudel areneva nefrilise juha ümber märgatavalt rohkem kui seda esineb *Gata3*^{-/-} embrüotel. Sellest tuleneb väga oluline tööhüpotees tuleviku jaoks. Võiks oletada, et nefrilist juha saatvate veresoonte rolli juha pikenemises on alahinnatud. On võimalik, et arenev Wolffi juha kannab saatva kapillaari näol kaasas elongatsiooniks vajalikku rakuressurssi ja vereringest pärinevad hematopoeetilised tüvirakud osalevad otseselt nefrilise juha morfogeneesis. Seega ei tuleks otsida nefrilist juha moodustavaid rakke mitte ainult mesodermist, vaid tähelepanu võiks pöörata ka tsirkuleerivatele hematopoeetilistele tüvirakkudele.

Tuginedes viidetele, et hematopoeetilised tüvirakud on märgatavalt laiemad diferentseerumisvõimega kui arvati, võib olla võimalik, et nad integreeruvad Wolffi juha koosseisu. Kirjanduses on arvukalt näiteid luuüdi päritolu kui ka embrüonaalsete hematopoeetiliste tüvirakkude diferentseerumisvõimest mittehmatopoeetilisteks rakuliinideks. Viimastel aastatel on kasvanud tõendite arv, et tsirkuleerivad tüvirakud võivad siseneda ka neeru ning diferentseeruda neeru rakkudeks. On näidatud et hematopoeetilised tüvirakud on võimelised diferentseeruma tubulaarseteks epiteelirakkudeks, glomerulaarseteks endoteelirakkudeks, podotsüütideks, mesangiaalrakkudeks ja neeru interstitsiaalrakkudeks (Masuya *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2005). Sellele

tuginedes on võimalik, et hematopoeetilised tüvirakud on võimelised osalema ka embrüonaalses neeru arengus. Kuna Wolffi juha areng saab alguse umbes samal perioodil kui ka hematopoeetiliste tüvirakkude moodustumine intraembrüonaalses splanhnopleuras ning lõpeb samal ajajärgul kui AGM regioonis hematopoeetiliste tüvirakkude tootmine, võib esineda seos, et hematopoeetilised tüvirakud võivad anda oma panuse Wolffi juha elongatsiooni.

Kokkuvõte

Käesolevas magistritöös käsitleti Wolffi juha elongatsiooni kirjeldamist transkriptsioonifaktor *Gata3* transgeensetes hiirtes ning juha pikenemise häirete võimalike põhjuste väljaselgitamist *Gata3*^{-/-} hiirtes. Sellest tulenevalt uuriti hematopoeetiliste tüvirakkude populatsiooni transkriptsioonifaktor *Gata3* transgeensetes hiirtes. Uurimiseks kasutati β -galaktosidaasi värvusreaktsiooni ilmestamiseks endogeense *Gata3* ekspressiooni ja hematopoeetiliste tüvirakkude spetsiifilise antigeeni, CD34, immunohistokeemilist detekteerimist. Käesoleva magistritöö eksperimentaalses osas selgus, et:

- Wolffi juha elongatsioon *Gata3*^{-/-} hiirtes peatub E9.5 arengupäeval 20. somiidipaari läheduses ning edasist ekstensiooni ei toimu;
- hematopoeetiliste tüvirakkude esinemine on tugevasti langenud *Gata3*^{-/-} hiirte dorsaalaordi piirkonnas;
- CD34 positiivse endoteelirakkude arvukuses esinevad suured erinevused mutantsetel ja *wild-type* hiirtel;

Saadud tulemused viitavad hematopoeetiliste tüvirakkude võimalikule osalusele nefrilise juha morfogeneesis.

Summary

Hematopoietic stem cells analysis of $Gata3^{-/-}$ mice

The nephric (Wolffian) duct is a central constituent of kidney development. As it elongates caudally to the cloaca, it induces metanephros (adult kidney) formation. The transcription factor $Gata3$ deficient animals Wolffian duct elongation is stopped at 20-somite stage and it never induces metanephros development or reaches cloaca. To elucidate the reasons for this phenomenon, aorta-gonad-mesonephros region was taken under observation. It occurred, that transcription factor $Gata3$ deficient animals lack $Gata3^{+}$ and $CD34^{+}$ hematopoietic stem cells in the ventral side of the dorsal aorta and that the expression of CD34 antigen is decreased in endothelial cells over embryo proper.

These findings give reason to believe that hematopoietic stem cells may be involved in Wolffian duct development.

Kasutatud kirjandus

- Bertrand, J. Y., Giroux, S., Golub, R., Klaine, M., Jalil, A., Boucontet, L., Godin, I., Cumano, A., (2005), Characterization of purified intraembryonic hematopoietic stem cells as a tool to define their site of origin, *PNAS*, 102(1), lk. 134-139.
- Brennan, H. C., Nijjar, S., Jones, E. A. (1998), The specification of the pronephric tubules and duct in *Xenopus laevis*, *Mechanisms of Development*, 75(1-2), lk.127-137.
- Bittner, R., E., Scholfer, C., Weipoltshammer, K., Ivanova, S., Streubel, B., Hauser, E., Freilinger, M., Hoger, H., Elbe-Burger, A., Wachtler, F., (1999), Recruitment of bone-marrow-derived cells by skeletal and cardiac muscle in adult dystrophic mdx mice, *Anatomy and Embruology*, 199(5), lk. 391-396.
- Bjornson, C. R. R., Rietze, R. L., Reynolds, B. A., Magli, M. C., Vescovi, A. L., (1999), Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo, *Science*, 283(5401), lk. 534-537.
- Bonilla, S., Alarcon, P., Villaverde, R., Aparicio, P., Silva, A., Martinez, S., (2002), Hematopoietic progenitor cells from adult bone marrow differentiate into cells that expresse oligodendroglial antigens in the neonatal mouse brain, *The European Journal of Neuroscience*, 15(3), lk. 575-582.
- Borue, X., Lee, S., Grove, J., Herzog, E. L., Harris, R., Diflo, T., Glusac, E., Hyman, K., Theise, N. D., Krause, D. S., (2004), Bone marrow-derived cells contribute to epithelial engraftment during wound healing, *The American Journal of Pathology*, 165(5), lk. 1767-1772.
- Brazelton, T. R., Rossi, F. M., Keshet, G. I., Blau, H. M., (2000), From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice, *Science*, 290(5497), lk. 1775-1779.
- Brazelton, T. R., Nystrom, M., Blau, H. M., (2003), Significant differences among skeletal muscles in the incorporation of bone marrow-derived cells, *Developmental Biology*, 262(1), lk. 64-74.
- Burch, J. B., (2005), Regulation of GATA gene expression during vertebrate development, *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 16(1), lk. 71-81.

- Camargo, F. D., Green, R., Capetanaki, Y., Jackson, K. A., Goodell, M. A., (2003), Single hematopoietic stem cells generate skeletal muscle through myeloid intermediates, *Nature Medicine*, 9(12), lk. 1520-1527.
- Ciau-Uitz, A., Walmsley, M., Patient, R., (2000), Distinct origins of adult and embryonic blood in *Xenopus*, *Cell*, 102(6), lk. 787-796.
- Clarke, N. D., Berg, J. (1998), Zink finger in *Caenorhabditis elegans*: finding families and probing pathways, *Science*, 282(5396), lk. 2018-2022.
- Corbel, S. Y., Lee, A., Yi, L., Duenas, J., Brazelton, T. R., Blau, H. M., Rossi, F. M., (2003) Contribution of hematopoietic stem cells to skeletal muscle, *Nature Medicine*, 9(12), lk. 1461-1462.
- Cornish, J. A., Etkin, L. D. (1993), The formation of the pronephric duct in *Xenopus* involves recruitment of posterior cells by migrating pronephric duct cells, *Developmental Biology*, 159(1), lk. 338-345.
- Crosby H. A., Kelly, D. A., Strain, J. A., (2001), Human hepatic stem-like cells isolated using c-kit or CD34 can differentiate into biliary epithelium, *Gastroenterology*, 120(2), lk. 534-544.
- Cumano, A., Dieterlen-Lievre, F., Godin, I., (1996), Lymphoid potential, probed before circulation in mouse, is restricted to caudal intraembryonic splanchnopleura, *Cell* 88(6), lk. 907-916.
- Cumano, A., Ferraz, J. C., Klaine, M., Di Santo, J. P., Godin, I., (2001), Intraembryonic, but not yolk sac hematopoietic precursors, isolated before circulation, provide long-term multilineage reconstitution, *Immunity*, 15(3), lk. 477-485.
- Debacker, C., Catala, M., Lebastie, M. C., (1999), Embryonic expression of the human GATA3 gene, *Mechanisms of Development*, 85(1), lk. 183-187.
- de Bruijn, M. F., Speck, N. A., Peeters, M. C., Dzierzak, E., (2000), Definitive hematopoietic stem cells first develop within the major arterial regions of the mouse embryo, *EMBO Journal*, 19(11), lk.2465-2474.
- Delassus, S., Cumano, A., (1996), Circulation of hematopoietic progenitors in the mouse embryo, *Immunity*, 4(1), lk. 97-106.

- Drawbridge, J., Meighan, C. M., Lumpkins, R., Kite, M. E. (2003), Pronephric duct extension in amphibian embryos: migration and other mechanisms, *Developmental Dynamics*, 226(1), lk. 1-11.
- Drummond, I. A., Majumdar, A., Hentschel, H., Elger, M., Solnica-Krezel, L., Schier, A. F., Neuhauss, S. C., Stemple, D. L., Zwartkruis, F., Rangini, Z., Driever, W., Fishman, M. C. (1998), Early development of the zebrafish pronephros and analysis of mutations affecting pronephric function, *Development*, 125(23), lk. 4655-4667
- Eglitis, M., Mezey, E., (1997) Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice, *PNAS USA*, 94(8), lk. 4080-4085.
- Eisenberg, C. A., Burch, J. B., Eisenberg, L. M., (2006), Bone marrow cells transdifferentiate to cardiomyocytes when introduced into the embryonic heart, *Stem Cells*, 24(5), lk. 1236-1245.
- Ferrari, G., Cusella, de Angelis, G., Coletta, M., Paolucci, E., Stornaiuolo, A., Cossu, G., Mavilio, F., (1998), Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors, *Science*, 279(5356), lk. 1528-1530.
- Garcia-Porrero, J. A., Godin, I. E., Dieterlen-Lievre, (1995), Potential intraembryonic hemogenic sites at pre-liver stages in the mouse, *Anatomy and Embryology*, 192(5), lk. 425-435.
- George, K. M., Leonard, M. W., Roth, M. E., Lieu, K. H., Kioussis, D., Grosveld, F., Engel, J. D. (1994), Embryonic expression and cloning of the murine GATA-3 gene, *Development*, 120(9), lk. 2673-2686.
- Gilbert, S. F. (2000), *Developmental biology*, 6th ed
- Godin, I., Dieterlen-Lievre, F., Cumano, A., (1995), B-lymphoid potential in pre-liver mouse embryo, *Seminars in immunology*, 7(3), lk. 131-141.
- Godin, I., Garcia-Porrero, J. A., Dieterlen-Lievre, F., Cumano, A., (1999), Stem cell emergence and hemopoietic activity are incompatible in mouse intraembryonic sites, *The Journal of Experimental Medicine*, 190(1), lk. 43-52.
- Godin, I., Cumano, A., (2002), The hare and the tortoise: an embryonic haematopoietic race, *Nature Reviews. Immunology*, 2(8), lk. 593-604.

- Gussoni, E., Soneoka, Y., Strickland, C. D., Buzney, E. A., Khan, M. K., Flint, A. F., Kunkel, L. M., Mulligan, R. C., (1999), Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation, *Nature*, 401(6751), lk. 390-394.
- Hendriks, R. W., Nawijn, M. C., Engel, J. D., van Doorninck, H., Grosveld, F., Karis, A., (1999), Expression of the transcription factor GATA-3 is required for the development of the earliest T cell progenitors and correlates with stages of cellular proliferation in the thymus, *European Journal of Immunology*, 29(6), lk.1912-1918.
- Hiruma, T., Nakamura, H. (2003), Origin and development of the pronephros in the chick embryo, *Journal of Anatomy*, 203(6), lk. 539-552.
- Jackson, K. A., Majka, S. M., Wang, H., Pocius, J., Hartley, C. J., Majesky, M. W., Entman, M. L., Michael, L. H., Hirschi, K. K., Goodell, M. A., (2001), Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells, *The Journal of Clinical Investigation*, 107(11), lk. 1395-1402.
- Jaffredo, T., Gautier, R., Eichmann, A., Dieterlen-Lievre, F., (1998), Intraaortic hemopoietic cells are derived from endothelial cells during ontogeny, *Development*, 125(22), lk. 4575-4583.
- Kale, S., Karihaloo, A., Clark, P. R., Kashgarian, M., Krause, D. S., Cantley, L.G., (2003), Bone marrow stem cells contribute to repair of the ischemically injured renal tubule, *The Journal of Clinical Investigation*, 112(1), lk. 42-49.
- Kaufman, M. H. (1992), *The atlas of mouse development*.
- Kaufman, M. H., Bard, J. B. L. (1999), *The anatomical basis of mouse development*, Academic Press.
- Ko, L. J., Engel, J. D. (1993), DNA-binding specificities of the GATA transcription factor family, *Molecular Cell Biology*, 13(7), lk. 4011-4022.
- Kotton, D. N., Ma, B. Y., Cardoso, W. V., Sanderson, E. A., Summer, R. S., Williams, M. C., Fine, A., (2001), Bone marrow-derived cells as progenitors of lung alveolar epithelium, *Development*, 128(24), lk. 5181-5188.
- Krause, D., Ito, T., Fackler, M. J., Smith, O. M., Collector, M. I., Sharkis, S. J., May, W. S., (1994), Characterization of murine CD34, a marker for hematopoietic progenitor and stem cells, *Blood*, 84(3), lk. 691-701.

- Krause, D., Theise, N., Collector, M.m Henegariu, O., Hwang, S., Gardner, R., Neutzel, S., Sharkis, S., (2001), Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell, *Cell*, 105(3), lk. 369-377.
- Kuure, S., Vuolteenaho, R., Vainio, S. (2000), Kidney morphogenesis: cellular and molecular regulation, *Mechanisms of Development*, 92(1), lk. 31-45.
- Körbling, M., Katz, R. L., Khanna, A., Ruifrok, A. C., Rondon, G., Albitar, M., Champlin, R. E., Estrov, Z., (2002), Hepatocytes and epithelial cells of donor origin in recipients of peripheral-blood stem cells, *The New England Journal of Medicine*, 346(10), lk. 738-746.
- Lagasse, E., Connors, H., Al-Dhalimy, M., Reitsma, M., Dohse, M., Osborne, J., Wang, X., Finegold, M., Weissman, I. L., Grompe, M., (2000), Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo, *Nature Medicine*, 6(11), lk. 1229-1234.
- Lakshmanan, G., Lieuw, K. H., Lim, K.-C., Gu, Y., Grosveld, F., Engel, J. D., Karis, A. (1999), Localization of distant urogenital system-, central nervous system-, and endocardium-specific transcriptional regulatory elements in the GATA-3 locus, *Molecular and Cellular Biology*, 19(2), lk. 1558-1568.
- LeBarge, M. A., Blau, H. M., (2002), Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury, *Cell*, 111(4), lk. 589-601.
- Lechner, M. S., Dressler, G. R. (1997), The molecular basis of embryonic kidney development, *Mechanisms of Development*, 62(2), lk. 105-120.
- Lim, K.-C., Lakshmanan, G., Crawford, S. E., Gu, Y., Grosveld, F., Engel, J. D. (2000), Gata3 loss leads to embryonic lethality due to noradrenaline deficiency of the sympathetic nervous system, *Nature Genetics*, 25(2), lk. 209-212.
- Lin, F., Moran, A., Igarashi, P., (2005), Intrarenal cells, not bone marrow-derived cells, are the major source for regeneration in postischemic kidney, *The Journal of Clinical Investigation*, 115(7), lk. 1756-1764.
- Lynch, K., Fraser, S. E. (1990), Cell migration in the formation of the pronephric duct in *Xenopus laevis*, *Developmental Biology*, 142(2), lk. 283-292.

- Manaia, A., Lemarchandel, V., Klaine, M., Max-Audit, I., Romeo, P., Dieterlen-Lievre, F., Godin, I., (2000), Lmo2 and GATA-3 associated expression in intraembryonic hemogenic sites, *Development*, 127(3), lk. 643-653.
- Marshall, C. J., Moore, R. L., Thorogood, P., Brickell, P. M., Kinnon, C., Thrasher, A. J., (1999), Detailed characterization of the human aorta-gonad-mesonephros region reveals morphological polarity resembling a hematopoietic stromal layer, *Developmental Dynamics*, 215(2), lk. 139-147.
- Masuya, M., Drake, J. C., Fleming, P. A., Reilly, C. M., Zeng, H., Hill, W. D., Martin-Studdard, A., Hess, D. C., Ogawa, M., (2003), Hematopoietic origin of glomerular mesangial cells, *Blood*, 101(6), lk. 2215-2218.
- McGrath, K. E., Koniski, A. D., Malik, J., Palis, J., (2003), Circulation is established in a stepwise pattern in the mammalian embryo, *Blood*, 101(5), lk. 1669-1676.
- Medvinsky, A., Dzierzak, E., (1996), Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region, *Cell*, 86(6), lk. 897-906.
- Mezey, E., Chandross, K. J., Harta, G., Maki, R. A., McKercher, S. R., (2000) Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow, *Science*, 290(5497), lk. 1779-1782.
- Molkentin, J. D., (2000), The zinc finger-containing transcription factors GATA-4, -5, and -6. Ubiquitously expressed regulators of tissue-specific gene expression, *Journal of Biological Chemistry*, 275(50), lk. 38949-38952.
- Müller, U., Brändli, A. W. (1999), Cell adhesion molecules and extracellular-matrix constituents in kidney development and disease, *Journal of Cell Science*, 112(22), lk. 3855-3867.
- Müller, A. M., Medvinsky, A., Strouboulis, J., Grosveld, F., Dzierzak, E., (1994), Development of hematopoietic stem cell activity in the mouse embryo, *Immunity*, 1(4), lk. 291-301.
- Nava, S., Westgren, M., Jaksch, M., Tibell, A., Broome, U., Ericzon, B. G., Sumitran-Holgersson, S., (2005), Characterization of cells in the developing human liver, *Differentiation*, 73(5), lk. 249-260.

- Nishikawa, S. I., Nishikawa, S., Kawamoto, H., Yoshida, H., Kizumoto, M., Kataoka, H., Katsura, Y., (1998), In vitro generation of lymphohematopoietic cells from endothelial cells purified from murine embryos, *Immunity*, 8(6), lk. 761-769.
- North, T. E., de Bruijn, M. F., Stacy, T., Talebian, L., Lind, E., Robin, C., Blinder, M., Dzierzak, M., Speck, N. A., (2002), Runx1 expression marks long-term repopulating hematopoietic stem cells in the midgestation mouse embryo, *Immunity*, 16(5), lk. 661-672.
- Novelli, E. M., Ramirez, M., Civin, C. I., (1998), Biology of CD34+CD38- cells in lymphohematopoiesis, *Leukemia and Lymphoma*, 31(3-4), lk. 285-293.
- Obara-Ishihara, T., Kuhlman, J., Niswander, L., Herzlinger, D. (1999), The surface ectoderm is essential for nephric duct formation in intermediate mesoderm, *Development*, 126(6), lk. 1103-1108.
- Okamoto, R., Yajimi, T., Yamazaki, M., Kanai, T., Mukai, M., Okamoto, S., Ikeda, Y., Hibi, T., Inazawa, J., Watanabe, M., (2002), Damaged epithelia regenerated by bone marrow-derived cells in the human gastrointestinal tract, *Nature Medicine*, 8(9), lk. 1011-1017.
- Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., Limana, F., Jakoniuk, I., Quaini, F., Nadal-Ginard, B., Bodine, D. M., Leri, A., Anversa, P., (2001), Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival, *PNAS*, 98(18), lk. 10344-10349.
- Ortiz, L. A., Gambelli, F., McBride, C., Gaupp, D., Baddoo, M., Kaminski, N., Phinney, D. G., (2003) Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects, *PNAS*, 100(14), lk. 8407-8411.
- Pandolfi, P. P., Roth, M. E., Karis, A., Leonard, M. W., Dzierzak, E., Grosveld, F. G., Engel, J. D., Lindenbaum, M. H. (1995), Targeted disruption of the GATA3 gene causes severe abnormalities in the nervous system and in fetal liver hematopoiesis, *Nature Genetics*, 11(1), lk. 40-44.
- Pata, I., Studer, M., van Doorninck, J. H., Briscoe, J., Kuuse, S., Engel, J. D., Grosveld, F., Karis, A. (1999), The transcription factor GATA3 is downstream effector of Hoxb1 specification in rhombomere 4, *Development*, 126(23), lk. 5523-5531.

- Patient, R. K., McGhee, J. D., (2002), The GATA family (vertebrates and invertebrates). *Current Options in Genetics and Development*, 12(4), lk. 416-422.
- Petersen, B. E., Bowen, W. C., Patrene, K. D., Mars, W. M., Sullivan, A. K., Murase, N., Boggs, S. S., Greenberger, J. S., Goff, J. P., (1999), Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells, *Science*, 284(5417), lk. 1168-1170.
- Petrenko, O., Beavis, A., Klaine, M., Kittappa, R., Godin, I., Lemischka, I. R., (1999), The molecular characterization of the fetal stem cell marker AA4., *Immunity*, 10(6), lk. 691-700.
- Pietilä, I., Vainio, S., (2005), The embryonic aorta-gonad-mesonephros region as a generator of haematopoietic stem cells, *APMIS*, 113(11-12), lk. 804-812.
- Poole, T. J., Steinberg, M. S. (1981), Amphibian pronephric duct morphogenesis: segregation, cell rearrangement and directed migration of the *Ambystoma* duct rudiment, *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 63, lk. 1-16.
- Poulsom, R., Forbes, S. J., Hodivala-Dilke, K., Ryan, E., Wyles, S., Navaratnarasah, S., Jeffery, R., Hunt, T., Alison, M., Cook, T., Pusey, C., Wright, N. A., (2001), Bone marrow contributes to renal parenchymal turnover and regeneration, *Journal of Pathology*, 195(2), lk. 229-235.
- Raid, R., Krunka, D., Abdelwakid, E., Jokinen, E., Kärner, M., Malva, M., Meier, R., Pelliniemi, L. J., Ploom, M., Karis, A., (2006), Lack of Gata3 results in conotruncal heart anomalies in mouse, *Developmental Biology*, Subscribe submitted.
- Reali, C., Scintu, F., Pillai, R., Cabras, S., Argiolu, F., Ristaldi, M. S., Sanna, M. A., Badiali, M., Sogas, V., (2006), Differentiation of human adult CD34+ stem cells into cells with a neural phenotype: role of astrocytes, *Experimental Neurology*, 197(2), lk. 339-406.
- Rossant, J., Tam, P. P. L. (2002), *Mouse development: patterning morphogenesis, and organogenesis*, Academic Press.
- Sainio, K., Hellstedt, P., Kreidberg, J. A., Saxen, L., Sariola, H. (1997), Differential regulation of two sets of mesonephric tubules by WT-1, *Development*, 124(7), lk. 1293-1299.

- Sato, T., Laver, J. H., Ogawa, M., (1999), Reversible expression of CD34 by murine hematopoietic stem cells, *Blood*, 94(8), lk. 2548-2554.
- Saxén, L. (1987), *Ontogenesis of the vertebrate excretory system*, Cambridge University Press
- Serluca, F. C., Fishman, F. C. (2001), Pre-pattern in the pronephric kidney field of zebrafish, *Development*, 128(12), lk. 2233-2241.
- Shalaby, F., Ho, J., Stanford, W., Fischer, K., Schuh, A., Schwartz, L., Bernstein, A., Rossant, J., (1997), A requirement for Flk1 in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis, *Cell*, 89(6), lk. 981-990.
- Spangrude, G. J., Heimfeld, S., Weissman, I. L., (1988), Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells, *Science*, 290(4861), lk. 58-62.
- Tamura, H., Okamoto, S., Iwatsuki, K., Futamata, Y., Tanaka, K., Nakayama, Y., Miyajima, A., Hara, T., (2002), In vivo differentiation of stem cells in the aorta-gonad-mesonephros region of mouse embryo and adult bone marrow, *Experimental Hematology*, 30(8), lk. 957-966.
- Tavian, M., Coulombel, L., Luton, D., San Clemente, H., Dieterlen-Lievre, F., Peault, B., (1996), Aorta-associated CD34⁺ hematopoietic cells in the early human embryo, *Blood*, 87(1), lk. 67-72.
- Theise, N. D., Nimmakayalu, M., Gardner, R., Illei, P. B., Morgan, G., Teperman, L., Henegariu, O., Krause, D. S., (2000), Liver from bone marrow in humans, *Hepatology*, 32(1), lk. 11-16.
- Theise, N. D., Saxena, R., Portmann, B. C., Thung, S. N., Yee, H., Chiriboga, L., Kumar, A., Crawford, J. M., (1999), The canals of Hering and hepatic stem cells in humans, *Hepatology*, 30(6), lk. 1425-1433.
- Thompson, M. A., Ransom, D. G., Pratt, S. J., MacLennan, H., Kieran, M. W., Detrich, H. W., Vail, B., Huber, T. L., Paw, B., Brownlie, A. J., Oates, A. C., Fritz, A., Gates, M. A., Amores, A., Bahary, N., Talbot, W. S., Her, H., Beier, D. R., Postlethwait, J. H., Zon, L. I., (1998), The cloche and spadetail genes differentially affect hematopoiesis and vasculogenesis, *Developmental Biology*, 197(2), lk. 248-269.

- Vainio, S., Müller, U. (1997), Inductive tissue interactions, cell signaling, and the control of kidney organogenesis, *Cell*, 90(6), lk. 975-978.
- van Esch, H., Bilous, R. W. (2001), Gata3 and kidney development: why case reports are still important, *Nephrol Dial Transplant.*, 16(11), lk. 2130-2132.
- Van Esch, H., Groenen, P., Nesbit, M. A., Schuffenhauer. S., Lichtner, P., Vanderlinden, G., Harding, B., Beetz, R., Bilous, r. W., Holdaway, I., Shaw, N. J., Fryns, J. P., van de Ven, W., Thakker, R. V., Devriendt, K., (2000), GATA3 haplo-insufficiency causes human HDR syndrome, *Nature*, 406(6794), lk. 419-422.
- Vize, P. D., Seufert, D. W., Carroll, T. J., Wallingford, J. B. (1997), Model systems for the study of kidney development: use of the pronephros in the analysis of organ induction and patterning, *Developmental Biology*, 188(2), lk. 189-204.
- Wang, X., Ge, S., McNamara, G., Hao, Q. L., Crooks, G. M., Nolta, J. A., (2003) Albumin-expressing hepatocyte-like cells develop in the livers of immune-deficient mice that received transplants of highly purified human hematopoietic stem cells, *Blood*, 101(10), lk. 4201-4208.
- Yoder, M. C., Hiatt, K., Dutt, P., Mukherjee, P., Bodine, D. M., Orlic, D., (1997), Characterization of definitive lymphohematopoietic stem cells in the day 9 murine yolk, *Immunity* 7(3), lk. 335-344.
- Zhang, N., Mustin, D., Reardon, W., Almeida, A. D., Mozdziak, P., Mrug, M., Eisenberg, L. M., Sedmera, D., (2006), Blood-born stem cells differentiate into vascular and cardiac lineages during normal development, *Stem Cells and Development*, 15(1), lk. 17-28.

<http://www.isscr.org/public/adultstemcells.htm>