

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

Anett-Hildegard Laarmann

**Kasvajaspetsiifiliste signaaliradade iseloomustamine DEN indutseeritud maksakasvaja  
mudelis**

Bakalaureusetöö geenitehnoloogia erialal (12 EAP)

Juhendajad:

MSc, Kristina Mäemets-Allas

PhD, MD, Viljar Jaks

## INFOLEHT

Kasvajaspetsiifiliste signaaliradade iseloomustamine DEN indutseeritud maksakasvaja mudelis.

Maks on tähtis organ, mis reguleerib pidevalt organismis toimuvaid elulisi protsesse. Maksavähk on maailmas kolmandal kohal põhjustamaks surmaga lõppevaid haigusjuhtumeid. Täpsed molekulaarsed mehhanismid kartsinogeneesis on teadmata, kuid vähi tekkes on täheldatud erinevate signaaliradade aktivatsiooni. Käesolev töö kirjeldab võimalike signaaliradade aktivatsiooni hepatotsellulaarse kartsinoomi kujunemises.

Märksõnad: maks, Hedgehog signaalirada, Wnt signaalirada, hepatotsellulaarne kartsinoom

CERCS: B200 Tsütoloogia, onkoloogia, kantseroloogia

Characterization of tumor-specific signaling pathways in DEN-induced liver tumor model.

The liver is one of the most important organs, constantly regulating the vital processes in the body. Liver cancer is the third leading cause of fatal disease. The precise molecular mechanisms of carcinogenesis is unknown, but the activation of different signal transduction pathways in cancer has been observed. This thesis describes possible signalling pathways in the development of hepatocellular carcinoma.

Key words: Liver, Hedgehog pathway, Wnt pathway, hepatocellular carcinoma

CERCS: B200 Cytology, oncology, cancerology

## SISUKORD

INFOLEHT .....	2
SISUKORD .....	3
KASUTATUD LÜHENDID .....	5
SISSEJUHATUS .....	7
<b>1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....</b>	<b>8</b>
<b>1.1 Maks .....</b>	<b>8</b>
1.1.1 Maksa ehitus ja tsirkulatsioon .....	8
1.1.2 Maksa funktsioonid .....	10
1.1.3 Maksa regenereerumine.....	11
<b>1.2 Maksavähi klassifikatsioon.....</b>	<b>11</b>
1.2.1 Hepatotsellulaarne kartsinoom .....	11
1.2.2 Kolangiotsellulaarne kartsinoom .....	12
1.2.3 Fibrolamellaarne hepatotsellulaarne kartsinoom .....	13
<b>1.3 Kasvajaseoselised signaalirajad .....</b>	<b>13</b>
1.3.1 Wnt signaalirada.....	14
1.3.2 PI3K/AKT signaalirada.....	16
1.3.3 p53 signaalirada .....	17
1.3.4 Hedgehog signaalirada .....	19
1.3.5 Notch signaalirada .....	21
1.3.6 Vähi tüvirakkude teooria .....	23
<b>2. EKSPERIMENTAALNE OSA.....</b>	<b>25</b>
2.1 Töö eesmärk.....	25
2.2 Materjal ja meetodika .....	25
2.2.1 Kasutatud hiiremudel .....	25
2.2.2 Proovide töötlus ja analüüs.....	26
2.2.2.1 RNA eraldamine maksaproovidest. ....	26
2.2.2.2 RNA töötlus DNaaS I-ga .....	26
2.2.2.3 cDNA süntees .....	27
2.2.2.4 Polümeraasi ahelreaktsioon.....	27
2.2.2.5 Kvantitatiivne reaalaaja PCR. ....	29
2.2.3 Immuunofluorestsentsanalüüs.....	29
2.2.3.1 Külmutatud koelõikude ettevalmistamine ja immuunofluorestsentsanalüüs .....	29
2.3 Tulemused .....	31

2.3.1 Wnt, Hedgehog ja Notch signaaliradade aktiivsus DEN indutseeritud hiire maksakasvaja mudelis .....	31
2.3.2 $\beta$ -kateniini ekspressioon ja lokalisatsioon DEN indutseeritud hiire maksakasvaja mudelis .....	33
2.3.3 AKT valgu aktiivsete vormide tase ja lokalisatsioon DEN-indutseeritud hiire kasvajakatte mudelis.....	35
2.3.4 p53 ekspressioon ja lokalisatsioon DEN indutseeritud hiire maksakasvaja mudelis .....	37
2.4 Arutelu .....	39
<b>KOKKUVÕTE</b> .....	<b>41</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>42</b>
<b>KASUTATUD KIRJANDUS</b> .....	<b>43</b>
<b>LISAD</b> .....	<b>51</b>
<b>Lisa 1. Loomkatsete luba</b> .....	<b>51</b>
<b>Lisa 2</b> .....	<b>52</b>
<b>Lisa 3</b> .....	<b>55</b>
<b>LIHTLITSENTS</b> .....	<b>56</b>

## KASUTATUD LÜHENDID

ADAM	– <i>a disintegrin and metalloproteinase</i> , disintegriin ja metalloproteinaas
AKT	– <i>protein kinase B</i> , proteiin kinaas B
APC	– <i>adenomatous polyposis coli</i> , kooloni adenomatoosne polüpoos
AXIN2	– <i>Axis inhibitor-2</i> , telginhibiitor-2
BAD	– <i>Bcl-2-associated death promoter</i> , Bcl-2- seoseline apoptoosi promootor
CC	– <i>cholangiocellular carcinoma</i> , hepaatiline kolangiokartsinoom
CK1 $\alpha$	– <i>casein kinase 1<math>\alpha</math></i> , kaseiinkinaas 1 $\alpha$
Cop1	– <i>constitutively photomorphogenic 1</i> , konstitutiivselt fotomofogeeniline 1
CSC	– <i>cancer stem cells</i> , vähi tüvirakud
DEN	– <i>diethylnitrosamine</i> , dietüülnitrosoamiin
DVL	– <i>Dishevelled</i> , Dishevelled valk
EDTA	– <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> , etüleendiamiintetraäädikhape
FL HCC	– <i>fibrolamellar hepatocellular carcinoma</i> , fibrolamellaarne hepatotsellulaarne kartsinoom
FOXO	– <i>forkhead box O</i> , kahvlipsea boksi geen - grupp O
GAPDH	– <i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i> , glütseeraldehüüd-3-fosfaat dehüdrogenaas
Gli	– <i>glioma-associated</i> , glioomiseoseline
GPCR	– <i>G protein-coupled receptor</i> , G- valgu seoseline retseptor
GSK3	– <i>glycogen synthase kinase 3<math>\beta</math></i> , glükogeeni süntaas kinaas 3 $\beta$
HBV	– <i>hepatitis B virus</i> , hepatiit viirus B
HCC	– <i>hepatocellular carcinoma</i> , hepatotsellulaarne kartsinoom
HSP	– <i>heat shock protein</i> , kuumašoki valk
IGF	– <i>insulin like growth factor</i> , insuliinisarnane kasvuhormoon
LDL	– <i>low-density lipoprotein</i> , madala tihedusega lipoproteiin
LGR	– <i>leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor</i> , leutsiinirikkaid kordusi sisaldavaid G-valke siduv retseptor.
LRP	– <i>lipoprotein receptor-related proteins</i> , lipoproteiinseotud valgud
MDM2	– <i>mouse double minute 2 homolog</i> , hiire double minut 2 homolog
MMTV	– mouse mammary tumor virus, hiire rinnavähi viirus
mTORC2	– <i>mechanistic target of rapamycin complex 2</i> , rapamütsiini sihtmärk kompleks 2
NDS	– <i>normal donkey serum</i> , eesli seerum

NICD	– <i>Notch intracellular domain</i> , Notchi intratsellulaarne domään
PB	– <i>phenobarbital</i> , fenobarbitaal
PBS	– <i>phosphate buffered saline</i> , fosfaadiga puhverdatud soolalahus
PCR	– <i>polymerase chain reaction</i> , polümeraasi ahelreaktsioon
PK1	– <i>3-Phosphoinositide-dependent kinase 1</i> , 3-fosfoinositiid-sõltub kinaas 1
PHLPP	– <i>PH domain and leucine rich repeat protein phosphatases</i> , PH domääni ja leutsiinirikkad proteiin-fosfataasi järjestused
PI3K-AKT	– <i>phosphatidylinositol-3 kinases- protein kinase B</i> , fosfatidüülinositool-3 kinaas-proteiin kinaas B
PIP	– <i>phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate</i> , fosfatidüül inositool-3,4,5- trifosfaat
Pirh2	– <i>p53-induced protein with a RING (Really Interesting New Gene)H2 domain</i> , p53 indutseeritud valk koos RING (uus huvitav geen) H2 domääniga
PKA	– <i>protein kinase A</i> , proteiin kinaas A
PP2A	– <i>protein phosphatase 2A</i> , proteiin-fosfataas 2A
PTEN	– <i>phosphatase and tensin homolog</i> , fosfataasi ja tensiini homoloog
RSPO	– <i>R-spondin</i> , R-spondiin
RTK	– <i>receptor tyrosine kinase</i> , türosiin-kinaasi retseptor
SHIP	– <i>SH2-containing inositol phosphatase</i> , SH2-sisaldav inositoolfosfataas
ZPA	– <i>zone of polarizing activity</i> , polariseeruva aktiivsusega tsoon
TAE	– <i>tris-acetate-EDTA</i> , Tris-atsetaat-EDTA
TBP1	– <i>TATA-binding protein 1</i> , TATA-siduv valk
TP53	– <i>tumor protein 53</i> - tuumor valk p53
Trib2	– <i>tribbles pseudokinase 2</i> , Tribbles pseudokinaas 2
Wnt1	– <i>wingless-type MMTV integration site 1</i> , tiivutu hiire rinnavähi viiruse tüüp, seondumissait 1

## SISSEJUHATUS

Maks on meie organismi suurim näärmeline siseelund, mis kannab eluliselt tähtsaid rolle. Maks on oluline endokriinne, immunogeenne ja mürkaineid lagundav organ. Lisaks on maksal erakordne regenereerumisvõime, mille käigus taastatakse vananenud, hävinenud või apoptoossed rakud ning need asendatakse uute ja elujõulistega.

Keskse rolli tõttu organismis on selle organiga seotud haigused tihtipeale raskekujulised ja võivad lõppeda surmaga. Olenevalt vähi tüübist on kartsinogeneesi põhjused erinevad. Vähk võib välja kujuneda eelnevast kahjustusest nagu maksatsirroos või rasvmaks. Põhjuseks võib olla ka pikaajaline hepatiit B viiruse haigusjuht või erinevad keskkonnategurid. Samuti võib vähk tekkida maksas, kus pole eelnevat kahjustust. Sellisel puhul on mõjutajateks erinevad kromosoom-mutatsioonid. Täpsed kartsinogeneesi molekulaarsed mehhanismid on teadmata, kuid on näidatud erinevate signaaliradade, näiteks Hedgehog ja Wnt, aktivatsiooni vähi tekkes ja kujunemises. Sellest lähtuvalt püstitati eksperimentaalses osas eesmärk uurida kas ja kuidas muutub DEN-indutseeritud hiire maksakasvaja mudelis Wnt, Notch ja Hedgehog signaaliradade ning p53 ja AKT valgu aktiivsus kasvaja arengu käigus.

Töö kirjanduse ülevaade jaotub kaheks osaks, kus esimeses kirjeldatakse maksa üldist ehitust, tähtsamaid funktsioone ja regenereerumist. Kirjanduse teine osa keskendub maksa kartsinogeneesile ning kirjeldab sagedamini esinevaid maksavähi tüüpe.

Märksõnad: maks, Hedgehog, Wnt, hepatotsellulaarne kartsinoom

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

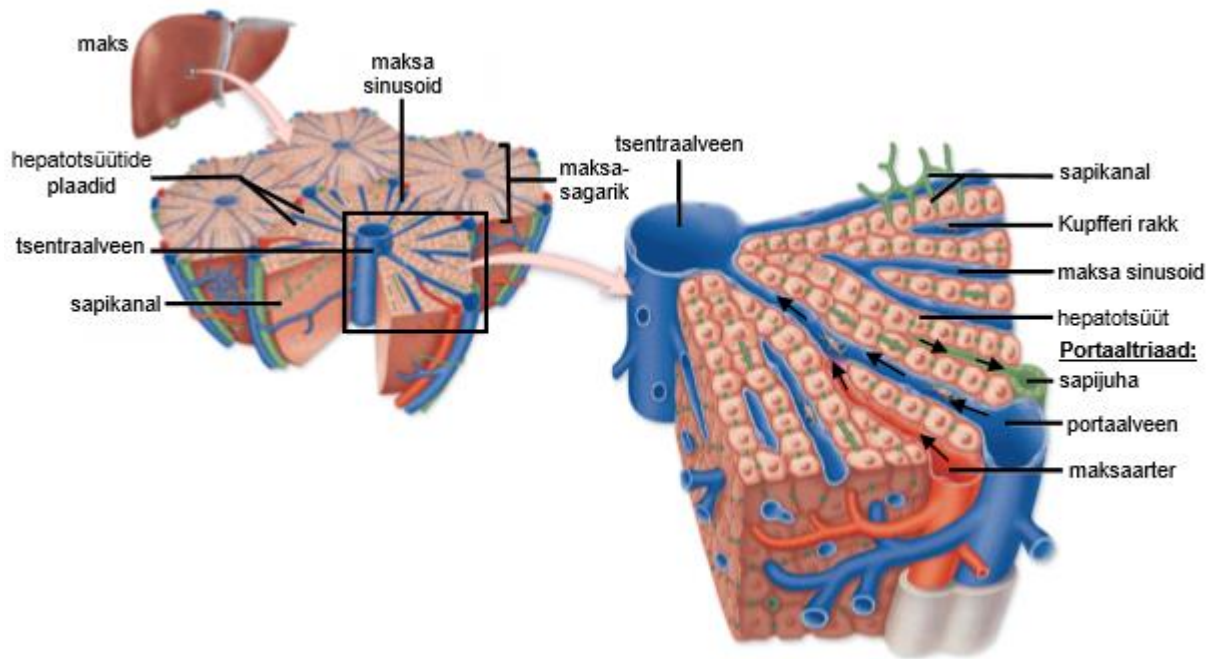
## 1.1 Maks

Maks on suurim näärmeline siseelund, mis kannab elulise tähtsusega rolle reguleerimaks ainevahetust. Lisaks funktsioneerib maks ka immunogeense organina, endokriinse elundina, eraldades sappi ja fagotsütaarse organina, lagundades mürkaineid. Esmakordselt kirjeldati seda organit 1664. aastal seamaksa näitel Šveitsi patoloogi J.J. Wepferi laboris (Bloch, 1970). Kuigi maks mängib tähtsat rolli organismi funktsioneerimises, pole suudetud vastata kõigile selle elundi molekulaarseid mehhanisme puudutavatele küsimustele.

### 1.1.1 Maksa ehitus ja tsirkulatsioon

Maks on inimese suurim siseorgan, mis moodustab umbes 2-3% kehakaalust. See asub paremal pool ülal kõhuõõnes diafragma all ja sellel on makroanatomilise jaotuse alusel 4 sagarat: parem-, vasak-, saba- ja ruutsagar. Maksa kaitseb rinnakukorv ning organit katab Glissoni kapsel, mis on läbipaistev sidekoeline kiht. (Abdel-Misih ja Bloomston, 2010) Parem- ja vasaksagar on suurimad ja üksteisest lahutab neid ümarside. Saba- ja ruutsagar on väiksemad ja paiknevad paremsagara tagaküljel. Sapipõis on seotud ruutsagaraga, mis paikneb selle ümber. (Busuttil ja Klintmalm, 2014) Maksas on ligikaudu 50 000-100 000 sagarikku, mis on maksa struktuurilisteks ja funktsioneerivateks ühikuteks (Joonis 1.). Kõik sagarikud on omavahel ühendatud õhukese sidekoega. Maksasagariku nurkades paikneb portaaltriaad, mille moodustavad maksaarter, portaalveen ja sapijuha. Keset maksasagarikku paikneb tsentraalveen, mille suunas liigub maksaarteris ja protaalveenis veri, olenemata sellest on sapijuhas vool vastupidine. Maksasagarik jaotub sinusoidideks, mis on täidetud hepatotsüütidega, mille vahelistes ruumides on segunenud arteriaalne ja venoosne veri. Sinusoidide vahelistes ruumides paiknevad maksa makrofaagid ehk Kupferi rakud. Hepatotsüütide vahel kulgevad sapikanalikesed. (Mescher, 2009; Pocock *et al.*, 2012)





**Joonis 1. Maks ja selle ehitus.** Vasakpoolne kujund näitab organi kuju, keskmine kujund kirjeldab koe jaotumist maksasagarikus ja selle ehitust ning joonise parempoolne kujund kirjeldab maksasagariku mikrostruktuure. Maksarakud moodustavad korrapäraseid kuusnurkseid sagarikke, mille iga nurgas paikneb portaaltriad ja keskel tsentraalveen. Portaaltriadi moodustavad maksaarter, portaalveen ja sapijuha. Hepatotsüütide plaadid asuvad sinusoidide vahel. Kupferi rakud paiknevad hepatotsüütide vahelises vabas ruumis. Modifitseeritud. (Mescher, 2009)

Maksal on väljakujunenud hea verevarustus tänu juhtesüsteemile, mille kaudu transporditakse toitainete- ja hapnikurikast verd. Puhkeolekus liigub 25% südame minutimahu väljapumbatud verest maksa. Organil on kahekordne verevarustussüsteem, mis on jagatud maksaarteri ja portaalveeni vahel, millest esimene vastutab 25-30% ja portaalveen 70-75% verevarustuse eest. Portaalveen kannab toitaineterikast, hapnikuvaest ja ainevahetuse kõrvalprodukte sisaldavat verd ning maksaarter transpordib hapnikurikast verd. Enne vere liikumist läbi õnesveeni üldisesse vereringesse, seguneb arteriaalne ja venoosne veri maksa sinusoidides, liikudes sinna läbi maksaarteri väiksemaid harusid. Sinusoidid on organismi teiste kapillaaridega võrreldes palju laiemad, kuid õhemate seintega. (Blumgart ja Belghiti, 2007; Nienstedt *et al.*, 2005)

Maksas palju sapikanaleid, mis koos vaskulaarsete ühendustega moodustavad mikroanatomilise struktuuri. (Bloch, 1970) Sapikapillaarid ühinevad sapijuhadeks, mis

kulgevad piki värativeeni ja maksaarteri harusid ning alates maksaväratist liigub sapp mööda paremat ja vasakut maksajuha. Maksast eritub ööpäevas 0,5-1 liitrit sappi. Eritumine toimub pidevalt ja seda mõjutavad mitmed tegurid. (Nienstedt *et al.*, 2005) Sapijuhades oleva sapp on isotooniline ning selle pH on 7-8. Sapp sisaldab sapisooli, pigmente, kolesterooli, letsitiini ja lima. Sapijuha epiteelrakud modifitseerivad primaarse sapi koostist, lisades sinna vett ja bikarbonaadirikkaid ühendeid. Sappi eritatakse pidevalt duodeenumisse või hoitakse sapipõies. Sapp ja selles olevad ained on pidevas ringluses ja taaskasutuses. (Pocock *et al.*, 2012) Rohkem kui 90% sapisooladest jõuab värativeeni kaudu tagasi maksa ja imendub. Organismis kasutatakse üht molekuli rohkem kui 10 korda, enne kui see täielikult väljutatakse. (Nienstedt *et al.*, 2005)

### **1.1.2 Maksa funktsioonid**

Maks on suurim nääre eritades seedimiseks sappi, mis emulgeerib soolestikus rasvu ja aitab neil imenduda. Maksas säilitatakse palju rasvlahustuvaid vitamiine, sest tänu sapisooladele on need võimelised imenduma. Sappi eritades eraldab maks organismist jääkaineid ja toimib seega erituselundina. Lisaks on maksal fagotsütaarne roll, lagundades hormoone, erinevaid mürkaineid ja teisi elusaid või elutuid kahjulikke tegureid. Sinusoidide seintes on õgirakke, mis kuuluvad makrofaagsüsteemi. Nad eemaldavad verest baktereid ja teisi võõrkehi, lisaks hävitavad viirusi sisaldavaid ning pahaloomuliseks muutunud rakke. Seega toimib maks ka immunogeense organina. Lootel on maks vereloomeorganiks, kuid ka täiskasvanutel on ta vereloome protsessis oluline. Maksa koguneb raud ja vitamiin B<sub>12</sub>, mis on olulised normaalseks erütropoesiks. (Nienstedt *et al.*, 2005) Maks on oluline energia ja karbohüdraatide metabolismis säilitades glükoosi glükogeenina, konverteerides aminohappeid glükoosiks ja metaboliseerides rasvhappeid. Lisaks on maks läbi glükoneogeneesi võimeline tootma glükoosi. Maksal on endokriinne roll. Ainevahetuse käigus metaboliseerib maks vitamiin D 25-hüdroksükolekaltsiferooliks, mis on oluline plasmavalkude (v.a immunoglobuliinide) biosünteesis. Maks sekreteerib arvukalt hormoone, sealhulgas insuliinisarnaseid kasvuhormoone (IGF, ingl *insulin like growth factor*), hepsidiini, trombopoeetiini ja lipoproteiine. (Pocock *et al.*, 2012)

### 1.1.3 Maksa regenereerumine

Maksakoel on suur regenereerumisvõime. Läbi morfoloogiliste ja biokeemiliste muutustele asendatakse kahjustunud, vananenud, eemaldatud või hävinenud maksakoe rakud uute ja funktsioneerivatega. (Levi ja Zeppa, 1971) Uute rakkude moodustumine toimub samaaegselt kõigis allesjäänud maksakoe sagarikes. Regeneratsioon on kõige intensiivsem 24 tundi pärast maksakoe eemaldamist ja lõppeb, kui on taastatud esialgne koemass. (Bucher, 1967) Uurimustes närilistega on näitatud, et 50% hepatektoomia tagajärjel taastub maksakude 7 päeva jooksul ja 70% koe eemalduse järel 9 päevaga. (Xu *et al.*, 1993)

Regenereerumises osalevad hepatotsüüdid, sapijuha epiteelrakud, vahedega endoteelirakud (erilist tüüpi endoteelirakud, milles on suured tsütoplasmaatilised vahed, mis lubavad maksimaalset kontakti hepatotsüütide ja tsirkuleeriva vere vahel), Kupferi rakud ja ito rakud, mis säilitavad vitamiini A ning sünteesivad sidekoe valke ja kasufaktoreid. Täpsemad regenereerumismehhanismid on siiski teadmata. Uute rakkude teke algab maksasagarike äärealadelt – protaaltriaadist ning jätkub peritsentraalsetel aladel. Hepatotsüüdid on esimesed rakud, mis hakkavad prolifereeruma. Ülejäänud rakud hakkavad jagunema umbes 24 tundi hiljem. (Michalopoulos ja DeFrances, 1997)

## 1.2 Maksavähi klassifikatsioon

Maksavähki liigitatakse tekkepõhjuste ja asukoha alusel. 90% kõikidest primaarsetest maksavähi juhtumitest on hepatotsellulaarsed kartsinoomid (HCC, ingl *hepatocellular carcinoma*) (Forner *et al.*, 2012; Llovet *et al.*, 2016; Mu *et al.*, 2015) ning teisel kohal on kolangiokartsinoom. (CC, ingl *cholangiocellular carcinoma*) (Xu *et al.*, 2006) Kõige vähemlevinum on fibrolamellaarne hepatotsellulaarne kartsinoom (FL HCC, ingl *fibrolamellar hepatocellular carcinoma*), mis on HCC üheks harvemini esinevaks vormiks. (Riggle *et al.*, 2016)

### 1.2.1 Hepatotsellulaarne kartsinoom

Enamikel juhtudel areneb HCC välja juba eelnevalt tekkinud kroonilisest maksahaigusest (Sherman, 2010) ning patsientidel, kellel on väljakujunenud maksatsirroos, on HCC peamiseks surmapõhjuseks (Forner *et al.*, 2012). Hepatotsellulaarse kartsinoomi tekkimispõhjused võivad olla erinevad, kuid peamisteks riskifaktoriteks loetakse hepatiit B või C viiruse infektsiooni,

liigset alkoholi tarbimist ja rasvmaksa haigust. Inimestel, kes põevad kroonilist HBV (ingl *hepatitis B virus*) infektsiooni (olles positiivsed pinnaantigeeni HbsAg vastu) on suurem risk saada HCC, kui nad on meessoost või vanemaealised. Kui peres on eelnevalt olnud HCC haigusjuhtumeid, kokkupuudet hallitusseene toksini aflatoksiin B1-ga või lisaks HBV-le on olnud nakatunud hepatiit C viirusega või hepatiit Delta viirusega on eelsoodumus haigestuda HCC-sse. (El-Serag, 2011; Forner *et al.*, 2012)

Täpsed HCC kartsinogeneesi molekulaarsed mehhanismid on teadmata. Eelnevalt on kirjeldatud nii hepatotsüütidest, kui sapiteede kanalites olevad fakultatiivsed progenitor rakkudest tekkinud HCC-d. Arvatakse, et krooniline maksakahjustus, hepatotsüütide regeneratsioon ja põletik on aluseks kartsinogeneesile. Bipotentsed hepatoblastid toimivad mõlemal arengusuunal põhilise rakulise allikana ning diferentseeruvad arenevas maksas hepatotsüütideks ja kolangiotsüütideks. Tänapäevaks on teada, et hepatotsellulaarne kartsinoom saab alguse hepatotsüütidest, mitte sapiteedes asuvatest progenitorrakkudest. (Miyajima *et al.*, 2014; Mu *et al.*, 2015)

## **1.2.2 Kolangiotsellulaarne kartsinoom**

Kolangiotsellulaarne kartsinoom või lühidalt kolangiokartsinoom (CC), on pahaloomuline kasvaja, mille puhul on täheldatud muutusi sapijuhade epiteelkoos. Täpsed molekulaarsed mehhanismid kartsinogeneesi tekkeks on teadmata. (Sirica, 2005; Xu *et al.*, 2006) Hetkel arvatakse, et kolangiokartsinogeneesi eelduseks on kromosomaalsed muutused, pikka aega kestev põletik või mehhaaniline vigastus sapiteedes. Samuti võib kartsinogeneesi põhjuseks olla viirusinfektsioon progenitor-rakkudes. (Terraz ja Becker, 2005)

Kolangiokartsinoom on ühine nimetus, millega kirjeldatakse intra- ja ekstrahepaatilisi sapiteede kasvajaid. Rohkem kui 90% CC-dest on adenokartsinomid, mille hulgas on erinevaid histoloogilisi variante nagu näiteks papillaarsed adenokartsinomid, soolestiku adenokartsinomid ja mutsinoossed adenokartsinomid. Kolangiokartsinoome klassifitseeritakse vastavalt diferentseerumisele kas hästi, mõõdukalt või halvasti diferentseernud. Erineva intensiivsusega tiheda sidekoe tekkimine ümber kasvaja (desmoplastiline reaktsioon) on samuti üheks kolangiokartsinoomi tüüpiliseks tunnuseks. Terminiga „perifeeriline kolangiokartsinoom“ kirjeldatakse kasvajaid, mis on alguse saanud maksast. Hilumist pärit kolangiokartsinoome tuntakse nime all hilar, perihilar või Klaskini kasvaja. Kuigi CC-d võivad esineda igal pool sapiteede kanalites, siis umbes 40-70%

kartsinoomi juhtudest esineb maksa hilumi lähedal või parema ja vasaku maksakanali lahkemiskohal, samas kui 5-20% kolangiokartsinoomidest areneb maksa sees. (Sirica, 2005)

### **1.2.3 Fibrolamellaarne hepatotsellulaarne kartsinoom**

Fibrolamellaarne hepatotsellulaarne kartsinoom on primaarse kasvaja tüüp, mille haigusjuhte on leitud noorte seas, kellel puudub eelnev maksakahjustus. H. A. Edmondson oli esimene, kes kirjeldas 1956. aastal seda vähitüüpi HCC ühe vormina, millel on omapärased morfoloogilised ja kliinilised omadused. (Craig *et al.*, 1980; Peters, 1976) FL HCC moodustab ainult 1% kõikidest primaarsetest vähijuhtudest, kuid alla 30-aastasel patsientidel on enamike maksavähi haigusjuhtude puhul tegu just selle vähitüübiga. (Eggert *et al.*, 2013)

FL HCC esineb harva ning seda vähitüüpi on keeruline uurida, kuna puuduvad korralikud eksperimetaalsüsteemide. Seetõttu on selle vähitüübi kartsinogeneesi molekulaarsed põhjused teadmata ja neid on keeruline uurida. Hiljuti leiti mutatsioon, mis on olemas kõikides uuritud fibrolamellaarsetes vähiproovides, kuid mitte üheski uuritud HCC või CC proovis. (Xu *et al.*, 2015) Avastati ühekoopiline 400 kB suurune deletsioon 19. kromosoomis, mis mõjutab HSP-40 (ingl *heat shock protein*) (DNAJB1) ja PKA (ingl *protein kinase A*) katalüütilist subühikut (PRKACA) (Honeyman *et al.*, 2014) Analüüsides üle 200 FL HCC haigusjuhu leiti kõigis sama mutatsioon, mis lubab arvata, et DNAJB1-PRKACA mutatsioon on üks põhjuseid FL HCC tuumorigeneesiks. (Riggle *et al.*, 2016)

### **1.3 Kasvajaseoselised signaalirajad**

Erinevate vähitüüpide kindlakstegemine ja eristamine on tänapäeva vähiravi üks probleemidest. Kogu genoomi ekspressiooni kirjeldamine vähikoes on tihtipeale erinevate tüüpide eristamise aluseks. Seega on kindla geeniekspressiooni leidmine, mis kirjeldaks rohkem kui ühte vähitüüpi, asjakohaseks uurimisteemaks vähiuuringutes. Kindlad ekspressioonimustrid aitaksid paremini mõista, millised signaalirajad mõjutavad erinevate vähitüüpide avaldumist. (Kessler *et al.*, 2013) Kui kontroll signaaliradade regulatsiooni üle kaob, siis koos muutustega rakkude füsioloogias võivad vähirakud omandada kontrollimatu prolifererumisvõime. (Hanahan ja Weinberg, 2000) Kasvufaktori ligandide, näiteks Sonic Hedgehog, üleekspressiooni võib viia vähi tekkeni. Hedgehog signaalirada mõjutab progenitorrakkude jagunemist ning selline aktiivsus on seotud tuumorigeneesiga. (Ehtesham *et al.*, 2007) Lisaks Hedgehog signaalirajale

on HCC kujunemises ning rakkude differentseerumises olulised Wnt ja Notch signaalirada. (Villanueva *et al.*, 2007) Rakkudesisene mediaator AKT mõjutab HCC kujunemist ja arengut. (Moeini *et al.*, 2012) Patsientidel, kellel on kirurgiliselt eemaldatud HCC, võib tõusnud aktiivse AKT-i (pAKT) tase põhjustada kasvaja taastekkimist ja metastaaside teket. (Nakanishi *et al.*, 2005) Uuringud erinevate mutatsioonide, onkogeenide ja tuumorsupressorite kohta HCC-S näitavad, et ühes kõige sagedamini muteerunud geeniks on *TP53*. (Moeini *et al.*, 2012)

### 1.3.1 Wnt signaalirada

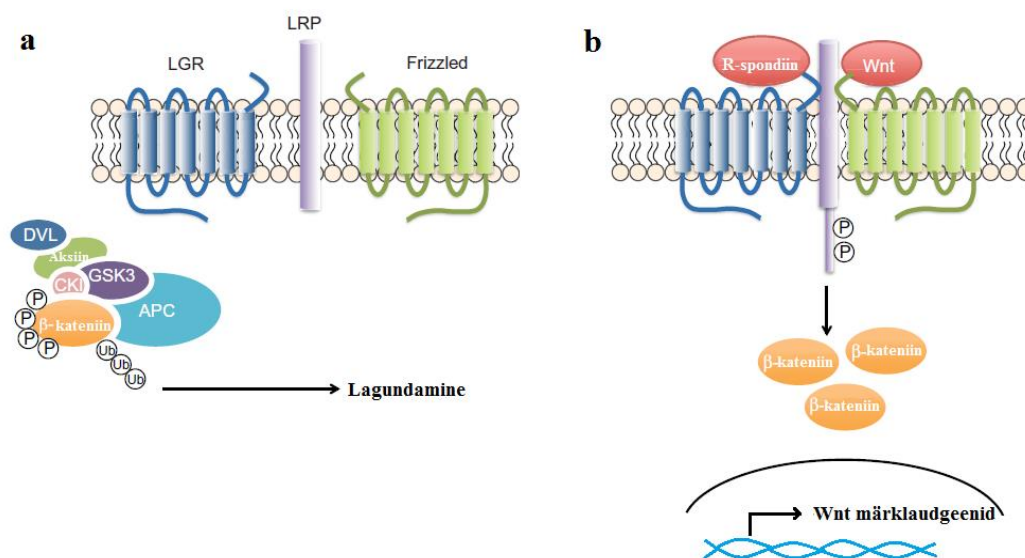
Esimest korda kirjeldati Wnt signaalirada umbes 30 aastat tagasi, kui hiire rinnavähi viirust MMTV (ingl *Mouse Mammary Tumor Virus*) uurides avastati proto-onkogeen *Int-1*, mis põhjustas hiire rinnakoes pahaloomulisi muutusi. Uuringud näitasid, et *Int-1* on *Drosophila wingless* homoloog, mis kontrollib kehasegmentide polaarsust vastse arengul ning seetõttu pandi signaalirajale nimeks Wnt (ingl *wingless-type MMTV integration site 1*). Wnt signaalirada on oluline embrüonaalses arengus, mõjutades arenguprotsesse, organogeneesi ja rakkude migratsiooni. Lisaks reguleerib see signaalirada pluripotentsete tüvirakkude säilimist ja diferentseerumist. (Nusse ja Varmus, 1982; Van Camp *et al.*, 2013)

Tänaseks on kirjeldatud nii kanooniline ehk  $\beta$ -kateniin sõltuv, kui ka mittekanoniline ehk  $\beta$ -kateniin sõltumatu signaalirada. Olenevat Wnt ligandide seondumisest retseptorite ja ko-retseptoritega raku pinnal võivad mõlemad signaalirajad aktiveeruda. (Van Camp *et al.*, 2013)  $\beta$ -kateniin on paljudes kudedes ekspresseerita multifunktsionaalne valk, mis reguleerib rakk-rakk ühendusi ja geenide transkriptsiooni.  $\beta$ -kateniini üleekspressiooni ja mutatsioone seostatakse paljude vähitüüpidega nagu näiteks hepatotsellulaarne kartsinoom, jämesoole vähk, kopsuvähk, halvaloomuline rinnakasvaja ning munasarja- ja emakakaelakasvaja. (Kraus *et al.*, 1994; Morin, 1999; Peifer *et al.*, 1991)

Wnt/ $\beta$ -kateniin signaalirajas osaleb kaks transmembraansete retseptorite klassi: Frizzled tüüpi 7 korda membraani läbiv valk ja lipoproteiiniga seotud valgud LRP5 ja LRP6 (ingl *lipoprotein receptor-related proteins*), mis kuuluvad LDL (ingl *low-density lipoprotein*) retseptorperekonda. (Wodarz ja Nusse, 1998)  $\beta$ -kateniini stabiilsuse regulatsioonis on oluline AXIN2 (ingl *Axis inhibitor-2*) valk. AXIN2 valgu funktsiooni kadumine toob endaga kaasa  $\beta$ -kateniini kuhjumise, mis indutseerib soolestiku kasvajate teket.  $\beta$ -kateniin mutatsioone on sagedasti leitud erinevatest kasvajatest aga eelkõike HCC-st. (Liu *et al.*, 2000)

LGR-valgud (ingl *leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor*) on Wnt/ $\beta$ -kateniini signaaliraja retseptoriteks, seondudes nii Frizzled kui LRP valkudega. R-spondiini perekonna valgud – RSPO1, RSPO2, RSPO3 ja RSPO4 (ingl *R-spondin*) on LGR-valkude ligandideks (de Lau *et al.*, 2011), mis aktiveerivad kanoonilise signaaliraja. (Kazanskaya *et al.*, 2004) *Lgr5* on somaatiliste tüvirakkude marker seedeelundkonna epiteelis ja karvafolliikulis. Lisaks on *Lgr5* Wnt signaaliraja sihtmärkgeen. *Lgr5* on laialdaselt ekspresseeritud soolestikus ja jagunevates rakkudes. (Haegebarth ja Clevers, 2009)

Kanoonilises Wnt signaalirajas reguleeritakse geeniekspressiooni  $\beta$ -kateniini hulga kontrolliga (Joonis 2.). Wnt ligandide olemasolul  $\beta$ -kateniini ei lagundata, mistõttu ta liigub edasi tuuma, kus mõjutatakse sihtmärkgeenide transkriptsiooni. Kui Wnt ligandid puuduvad, toimub mitmekomponentse lagundamiskompleksi abil  $\beta$ -kateniini pidev lagundamine ning sihtmärkgeene ei transkribeerita. Lagundamiskompleksi kuuluvad APC (ingl *adenomatous polyposis coli*), aksiin, CK1 $\alpha$  (ingl *casein kinase 1 $\alpha$* ), GSK3 (ingl *glycogen synthase kinase 3 $\beta$* ) ja DVL (ingl *Dishevelled*) (Peifer ja Polakis, 2000)



**Joonis 2. Wnt/ $\beta$ -kateniini signaalirada. a.** Wnt ligandide puudumisel lagundab valgukompleks  $\beta$ -kateniini ning sihtmärkgeenide transkriptsiooni ei toimu. **b.** Wnt ligandide olemasolul võimendab LGR signaali,  $\beta$ -kateniini ei lagundata ning see liigub tuuma, kus ta reguleerib märklauageenide transkriptsiooni. (Nakata *et al.*, 2014)

### 1.3.2 PI3K/AKT signaalirada

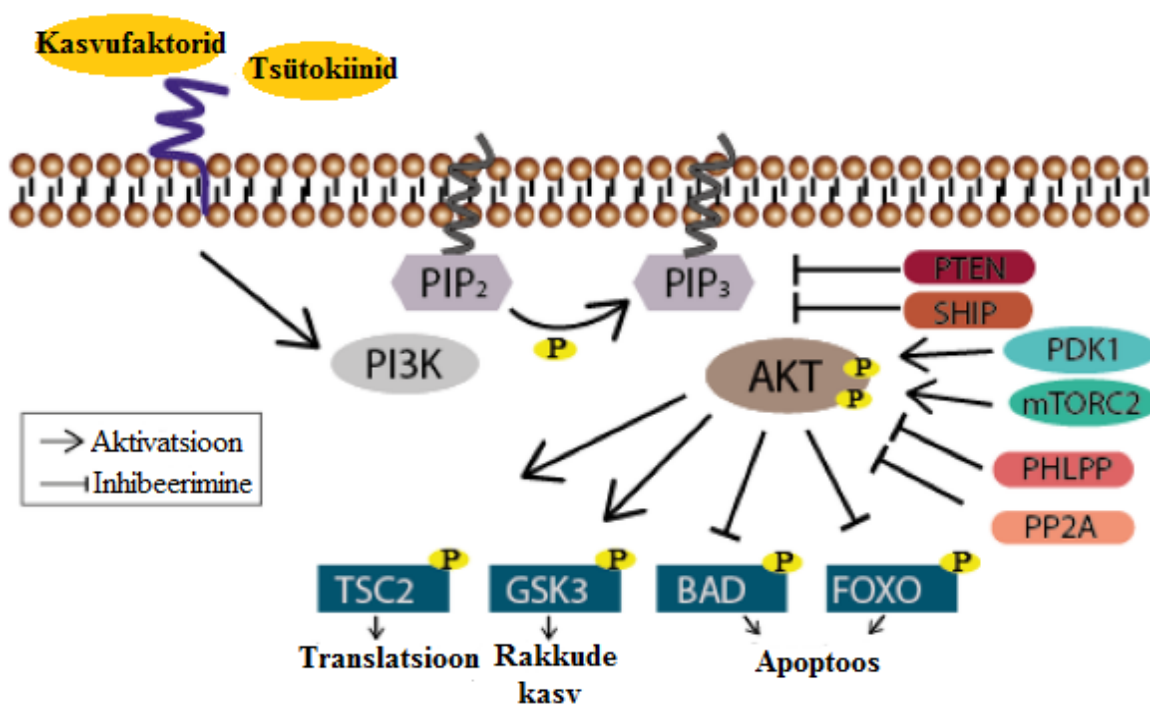
PI3K/AKT signaalirada kontrollib rakkudes erinevaid protsesse nagu rakkude jagunemine, valkude süntees ja glükoosi metabolism. Aktiivne signaalirada tagab rakkude ellujäämise, kuid inaktiveeritud signaalirada põhjustab apoptoosi. (Diehl ja Schaal, 2013) Maksa- ja soolestikukasvajate puhul on kirjeldatud ebanormaalselt AKT signaaliraja aktivatsiooni. (Taniguchi *et al.*, 2010) Lisaks kasvaja tekkele põhjustab PI3K/AKT signaalirada resistentsust kasvaja ravile. Uueks paljulubavaks ravimeetodiks saab seetõttu pidada AKT signaaliraja vastu suunatud teraapiat. (Fresno Vara *et al.*, 2004)

AKT-i iseloomustati kahe geeni, *Akt1* ja *Akt2*, järgi, mis on inimeses viraalse onkogeeni *v-akt* homologid. (Staal, 1987) Hilisemad uuringud näitasid, et *v-akt* ja selle homologid kodeerisid inimeses proteiinkinaasi, millel olid sarnased omadused proteiin kinaas C- ja A-ga. Seetõttu nimetatakse AKT-i proteiin kinaas B-ks. (Murthy *et al.*, 2000) AKT-il on 3 isovormi: AKT1-3. AKT1 leidub paljudes kudedes ning see valk mängib rolli rakkude ellujäämises ja apoptoosis. AKT2 on ekspresseeritud peamiselt lihas- ja rasvarakkudes ning ta vastutab glükoosi homöostaasi eest. AKT3 on ekspresseeritud peamiselt ajus ning ta on tähtis aju embrüonaalses arengus. (Gonzalez ja McGraw, 2009) Aktiveeritud AKT on kasvaja "ellujäämisfaktoriks." AKT fosforüleerib ja inaktiveerib valke, mis reguleerivad apoptoosi nagu näiteks pre-apoptootilist faktorit BAD (ingl *Bcl-2-associated death promoter*) ja prekaspaas-9 (Downward, 2004) ning transkriptsioonifaktorit FOXO (ingl *forkhead box O*), mis on seotud apoptoosi tekitavate geenidega. Lisaks suudab AKT aktiveerida NF- $\kappa$ B positiivset regulaatorit kinaasi. NF- $\kappa$ B soodustab Fas-ligandi vahendatud apoptoosi. (Pommier *et al.*, 2004) AKT fosforüleerib ka MDM2, põhjustades selle liikumise tuuma, kus lagundatakse p53. (Cheung ja Testa, 2013)

Signaaliraja käivitavad kasvufaktorid või tsütokiinid, mis aktiveerivad fosfatidüülinositool 3-kinaasi (PI3K) läbi RTK (ingl *receptor tyrosine kinases*) või G-valgu seoselised retseptorite (GPCR) (Joonis 3.) PI3K fosforüleerib PIP2 (ingl *phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate*), mis omakorda fosforüleerib PIP3. PIP3 liidab AKT valgu. Akt valk muudab oma konformatsiooni ning PDK1 (ingl *3-Phosphoinositide-dependent kinase 1*) ja mTORC2 (ingl *mechanistic target of rapamycin complex 2*) fosforüleerivad AKT-i fosforüleerimissaitidest T-308 ja S-473. Fosforüleerides edasisi valke, osaleb AKT rakuliste protsesside, nagu translatsioon, rakkude kasv ja apoptoos, reguleerimises. Signaalirada võivad inhibeerida PHLPP (ingl *PH domain and leucine rich repeat protein phosphatases*) ja PP2A (ingl *protein phosphatase 2A*) defosforüleerides AKT-i või PTEN (ingl *Phosphatase and tensin homolog*)



või SHIP (ingl *SH2-containing inositol phosphatase*), mis defosforüeerivad PIP3. (Diehl ja Schaal, 2013)



**Joonis 3. PI3K/AKT signaalirada.** Kasvufaktorid või tsütokiinid aktiveerivad PI3K läbi RTK või GPCR retseptorite. PI3K fosforüeerib PIP<sub>2</sub>, mis omakorda fosforüeerib PIP<sub>3</sub>. AKT valk liitub PIP<sub>3</sub>-ga ja muudab oma konformatsiooni. PDK1 ja mTORC2 fosforüeerivad AKT-i fosforüeerimissaitidest T-308 ja S-473. Fosforüeerides edasisi valke, osaleb AKT rakuliste protsesside reguleerimises. Signaalirada võivad inhibeerida PHLPP ja PP2A, defosforüeerides AKT-i, või PTEN ning SHIP, mis defosforüeerivad PIP<sub>3</sub>. Modifitseeritud. (Diehl ja Schaal, 2013)

### 1.3.3 p53 signaalirada

Tuumor supressor p53 on p53 valgu isovorm, mida kodeerivad homoloogilised *p53* geenid, näiteks *TP53* (ingl, *tumor protein 53*) inimestes ja *Trp53* hiirtes. (Surget *et al.*, 2013) p53 valk on oluline välise stressisignaali põhjustatud rakulise vastuse tekkimises. Nendeks võivad olla DNA kahjustused, hüpoksia ja ebanormaalsed prolifererumissignaalid, näiteks onkogeneen aktiveerimine. Stressisignaali mõjutuse järgselt p53 stabiliseeritakse ning seotakse järjestusspetsiifiliselt DNA külge. Nii mõjutatakse rakulistes protsessides oluliste geenide transkriptsiooni regulatsiooni. Sellisteks protsessideks võivad olla DNA reparatsioon,

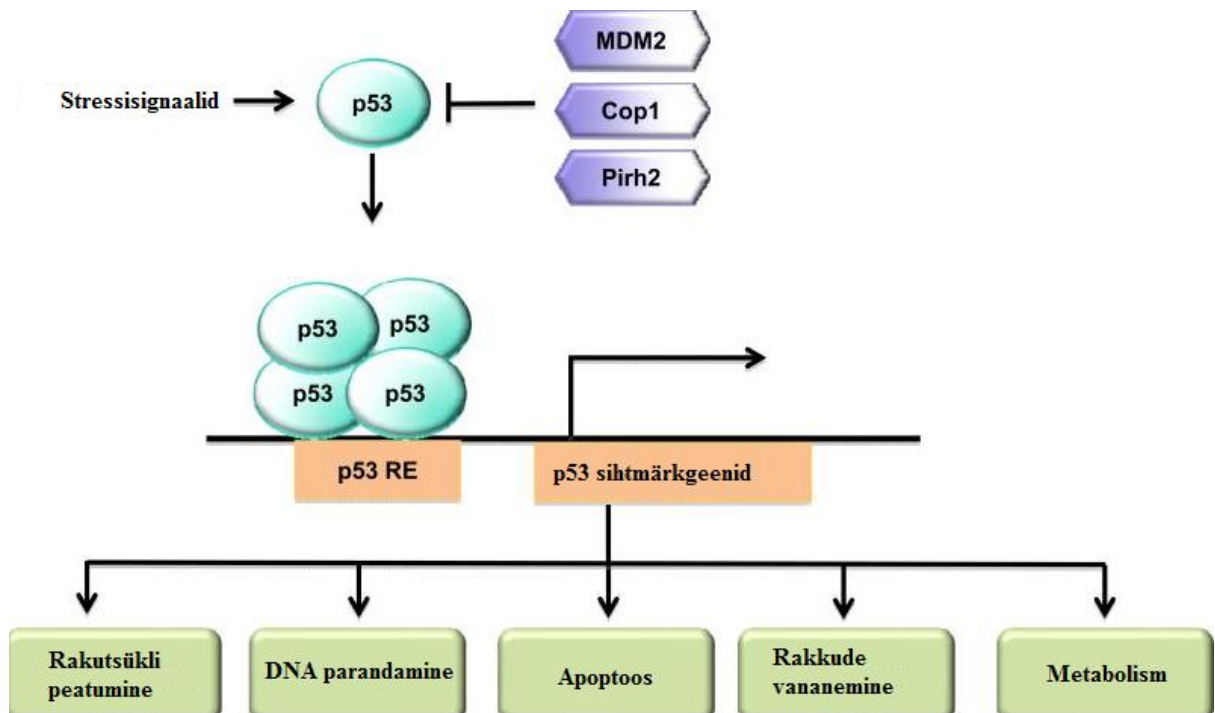
rakutsükli peatumine, vananemine ja apoptoos. (Levine, 1997; Riley *et al.*, 2008) p53 valgu funktsioonid on vajalikud kartsinogeneesi peatamises, rakuliste vastuste mõjutamises, DNA kahjustustes ja vähiteraapias. Inimestes toimib p53 geen tuumorsupressorina surudes alla somaatilisi mutatsioone vähirakkudes. (Petitjean *et al.*, 2007)

Esimesed tõendid, et p53 põhjustab apoptoosi, avaldati 1991. aastal, kui uuriti müeloidse leukeemia rakke. Mõjutades neid p53-ga, on tulemuseks rakkude elujõulisuse vähenemine ja mitmete apoptoosimärkide teke- tuumade fragmenteerumine, kromantiini kondensatsioon ja DNA lagunemine. (Yonish-Rouach *et al.*, 1991)

p53 hulka reguleeritakse läbi erinevate mehhanismide, mis tagavad p53 madala taseme rakkudes. p53 transkriptsiooni tase tõuseb alles G<sub>1</sub> faasi lõpu poole. Erinevad negatiivsed regulaatorid nagu MDM2, Cop1 (ingl *constitutively photomorphogenic 1*) ja Pirh2 (ingl *p53-induced protein with a RING (Really Interesting New Gene-H2 domain)*) hoiavad ilma kahjustuseta rakkudes p53 taseme madalana. (Davidoff *et al.*, 1991) MDM2 on selle signaaliraja kõige tugevam negatiivne regulaator. MDM2 seondub otseselt p53-ga ja vahendab ubikvitiinsõltuvat p53 lagundamist. Samal ajal mõjutab p53 ise MDM2. Nii moodustavad MDM2 ja p53 negatiivse tagasiside rõnga. (Harris ja Levine, 2005)

Erinevate stressisignaali tulemusel p53 aktiveeritakse ning see hakkab rakkudes kogunema (Joonis 4.). Aktiveeritud p53 seondub reageeriva elemendiga (p53 RE), et reguleerida sihtmärkgeenide ekspressiooni. See mõjutab paljusid erinevaid bioloogilisi protsesse, nagu rakutsükli peatumine, DNA parandamine, apoptoos, rakkude vananemine ja metabolism. (Liu *et al.*, 2015)

p53 aktivatsioon on kartsinogeneesis oluline. Inimese kasvajatel on sageli täheldatud p53 geeni mutatsioone, seal hulgas deletsioone ja allelide kadumist. Selliste mutatsioonidega kasvajarakkudes on täheldatud rakutsükli peatumist ja tugevat apoptoosi. (Fearon ja Vogelstein, 1990; Vogelstein ja Kinzler, 1992)



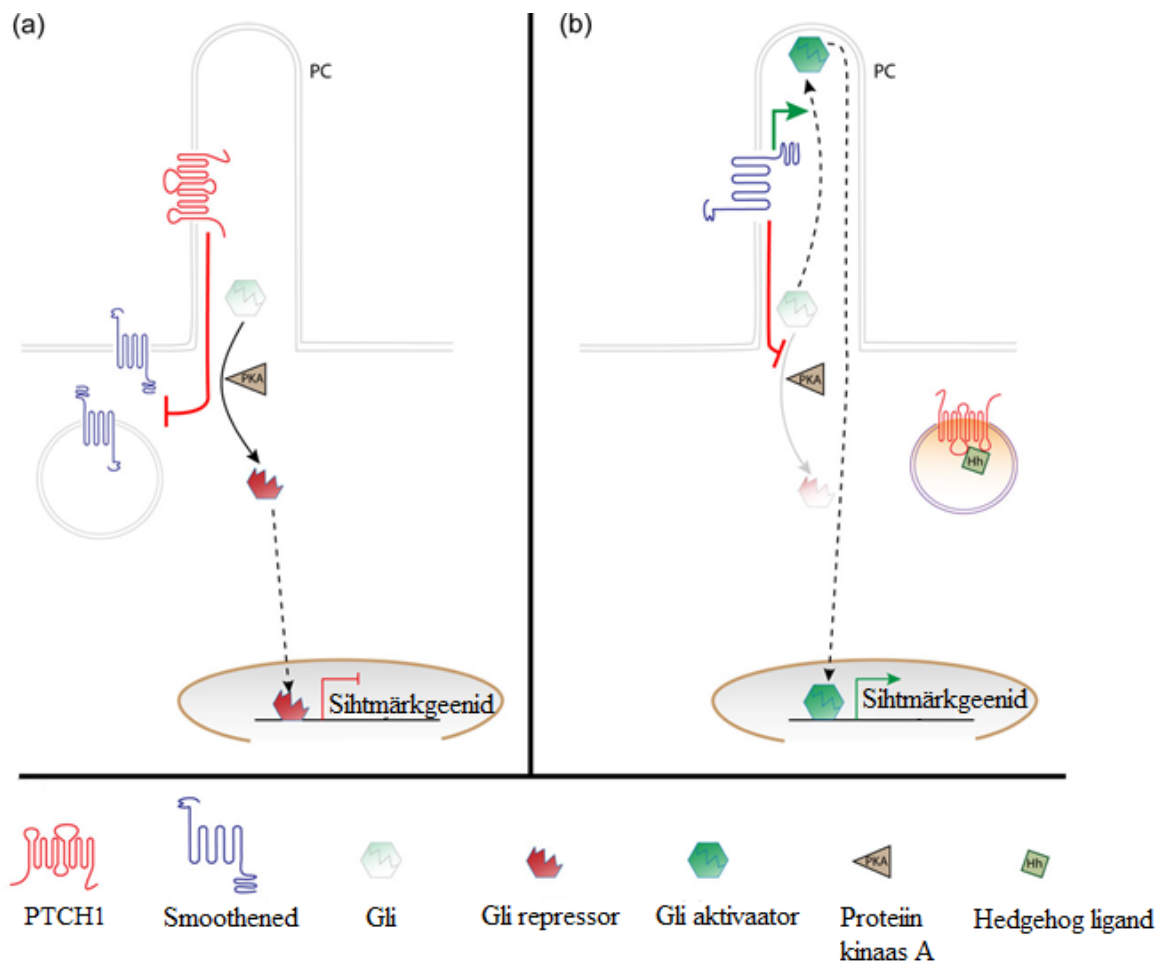
**Joonis 4. p53 signaalirada.** Negatiivsed regulaatorid MDM2, Cop1 ja Pirh2 hoiavad stressivabades rakkudes p53 taseme madalana. Stressisignaaliide tulemusena p53 aktiveeritakse ning valk hakkab kogunema rakkudesse. Aktiveeritud p53 seondub reageeriva elemendiga (p53 RE), et reguleerida sihtmärkgeenide transkriptsiooni. Nii mõjutatakse paljusid erinevaid bioloogilisi protsesse. Modifitseeritud. (Liu *et al.*, 2015)

### 1.3.4 Hedgehog signaalirada

Esimesena kirjeldati Hedgehog signaalirada äädikakärbsel. Uuriti mutatsioone *Drosophila* vastse arengus (Nüsslein-Volhard ja Wieschaus, 1980). Signaaliraja nimetus tuleneb *Drosophila* vastse kutiikula lühikesest ja ogalisest fenotüübist, mis sarnaneb siili ogadele (Varjosalo ja Taipale, 2008). Evolutsiooniliselt on see signaalirada konserveerunud ning reguleerib kahekülgete, putukate ja selgrootute kesknärvisüsteemi ning jäsemete arenguprotsesse. Lisaks on Hedgehog signaalirada oluline rakkude jagunemises ja diferentseerumises. See signaalirada on kriitilise tähtsusega loote arengustaadiumis, kus defektne signaalirada tekitab ajus ja näopiirkonnas mutatsioone. Tavalisteks näideteks on holoprosentsefaalia, mikrotsefaalia, kükloopia, puuduv nina või suulaelõhe. (Belloni *et al.*, 1996). Hedgehog signaalirajal on kirjeldatud 3 sekreteeritavat analoogi: Indian, Desert ja Sonic Hedgehog. Neist kolmest on enim ekspresseeritud Sonic Hedgehog geeni kodeeritud ligand, mis on mediaator-vahendajaks ZPA-tsoonis (ingl, *zone of polarizing activity*), mõjutades normaalset jäsemete ja kesknärvisüsteemi arengut. Signaaliraja aktivatsiooni täheldatakse vähi

arengus, kus Sonic Hedgehogi ekspressioon on vähikoldes, mitte ümbritsevas koes (Echelard *et al.*, 1993; Johnson *et al.*, 1994; Riddle *et al.*, 1993). Indian Hedgehog tagab normaalse luukoe arengu. (Bitgood ja McMahon, 1995) Desert Hedgehog kontrollib areneva organismi närvide perineurimi arengut, mis on võtmeelement Schwanni rakkudes, säilitades perifeerseid närve. Desert Hedgehog on ekspresseeritud ainult gonaadis. (Bitgood *et al.*, 1996; Jung *et al.*, 2015)

Patched1 valk (PTCH1) seob omavahel Hedgehog ligande ja tagab Hedgehog signaaliraja aktivatsiooni (Joonis 5.). PTCH1 valk on Hedgehog signaaliraja retseptor ja transkriptsiooni sihtmärk. See valk funktsioneerib kui tuumor-supressor, pärssides antagonistlike geenide vabanemist. (Ingham, 1998; Ingham *et al.*, 1991) Signaalide edasikandumise tagab transmembraanne Smoothened valk (Smo), mis aktiveerib sihtmärkgeene läbi GLI (ingl *glioma-associated*) perekonna transkriptsioonifaktore. (Ingham ja McMahon, 2001; Taipale *et al.*, 2002). Selles perekonnas on kolm GLI valku, millest GLI1 ja GLI2 käituvad selgrootsetes organismides aktivaatoritena ja GLI3 repressorina. GLI valgud on olulised rakutsükli, organismi embrüonaalses arengus ja rakkude proliferatsioonis. *Gli* geenid on näidatud olema onkogeenid ning *Gli1* ekspressiooni on täheldatud tuumoris, mitte ümbritsevas koes. (Ruppert *et al.*, 1991) Hedgehog ligandi puudumisel hoiab PTCH1 Smo-d inaktiivses olekus. Sihtmärkgeenide ekspressioon surutakse maha, kui PKA lõikab *Gli* transkriptsioonifaktorit ja represseritud vorm liigub edasi tuuma. Ligandi olemasolul seondub see PTCH1 valguga ja liigub edasi tsütoplasmasse. Kuna SMO valgu aktiivsust enam ei pärsita, saab Smo represserida transkriptsioonifaktori lõikamist. SMO valk aktiveerib transkriptsioonifaktor GLI, mis saab edasi liikuda tuuma, kus aktiveeritakse sihtmärkgeenide transkriptsioon.



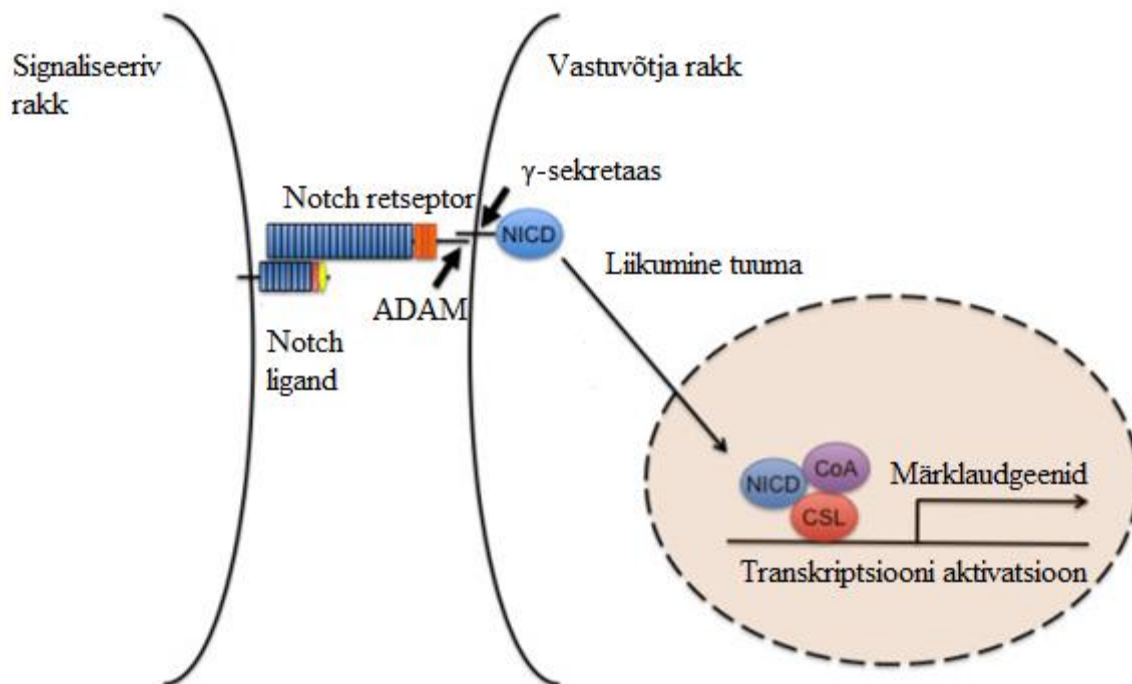
**Joonis 5. Hedgehog signaalirada.** (a) Patched1 valk hoiab Hedgehog ligandi puudumisel Smoothened valku inaktiivsena. Proteiin kinaas A lõikab GLI ja selle represeeritud vorm liigub edasi tuuma, kus transkriptsioonifaktor geeniekspressiooni maha surub. (b) Kui Hedgehog ligand on olemas, seondub see Patched1 valguga. Tekkinud kompleks liigub edasi tsütoplasmasse. Smoothened valgu aktiivsust ei pärssita ja see takistab GLI lõikamist. Lõikamata GLI liigub edasi tuuma, kus aktiveeritakse sihtmärkgeenide transkriptsiooni. Modifitseeritud. (Carney ja Ingham, 2013)

### 1.3.5 Notch signaalirada

Evolutsioonilise konserveerunud Notch signaalirada kontrollib rakkude saatust ning diferentseerumist. (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1999; Kume, 2009) Imetajatel on Notch signaalirajas neli erinevat transmembraanset retseptorit: NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3 ja NOTCH4 ning viis erinevat raku pinnal ekspresseeritud ligandi (Jagged 1-2 ja Delta-like 1, 3, 4), millega seondudes aktiveeruvad retseptorid. NOTCH3 kodeeriv geen on peamiselt ekspresseeritud vaskulaarsetes silelihasrakkudes ja aitab kaasa rakkude orientatsioonile

arteriaalses arengus. *Notch3* on ekspresseeritud ka erinevate organite vähirakkudes, näiteks munasarjas, rinnas ja jämesooles. See geen on oluline regulaator vähi arengus. (Park *et al.*, 2006) *Notch3* geeni translokatsiooni on täheldatud kopsukasvajas ning selle geeni järjepidev ekspressioon indutseerib neoplastilisi transformatsioone lisaks eelmainitud organitele ka ajus ja hematopoeetilistes kudedes. (Dang *et al.*, 2000) Notch signaalirada on vahendatud läbi rakk-rakk interaktsioonide ligandi ekspresseeriva signaliseeriva raku ja retseptorit ekspresseeriva vastuvõtja raku vahel (Joonis 6.) Enne signaaliraja aktiveerumist toodab Golgi võrgustikus furiini-sarnane konverteas pre-retseptori, millel on transmembranne ja ekstratsellulaarne subühik. Kui ligand on retseptoriga seondunud, eemaldatakse ekstratsellulaarne osa. Seejärel lõikab ADAM (ingl *a disintegrin and metalloproteinase*) plasmamembraanil tekkinud eellaskompleksi. Viimase lõikamise teostab  $\gamma$ -sekretaas ning tekkinud kompleksi intratsellulaarne domään (NICD, ingl *Notch intracellular domain*) siseneb tsütoplasmasse. NICD liigub edasi tuuma, kus seostub transkriptsioonifaktori CSL-ga, et moodustada koos teiste mediaatoritega transkriptsiooni aktiveerimise kompleks, mis indutseeriks märklaudgeenide ekspressiooni. (Brou *et al.*, 2000; Kume, 2009) Notch signaliseerimine on maksas seotud nekrootilise põletiku tekkega. Uurides patsiente, kellel on eelnev maksakahjustus, on näidatud sihtmärkgeeni *Hes1* ja *Hey1* ekspressiooni kasvu. (Valenti *et al.*, 2013; Villanueva *et al.*, 2012) *Tbp1* geen kodeerib TATA-siduvat valku (ingl *TATA-binding protein*) TBP1, mis on oluline transkriptsiooni aktiveerimise faktor. (Chew *et al.*, 2010)

Notch signaalirada kontrollib geenide regulatsioonimehhanisme, mis on olulised rakkude differentseerumise protsessis nii embrüonaalses kui ka täiskasvanu arengus. Notch signaalirada on oluline angiogeneesis ja vaskulaarses regulatsioonis. (Krebs *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2003) Notchi kirjeldati onkogeena T-raku lümfoblastilises leukeemias. Toimus kromosomaalne translokatsioon T-raku  $\beta$ -retseptori N-terminaalse ja NOTCH1 retseptori C-terminaalse otsa vahel. See viis NOTCH1 retseptori ekstratsellulaarse subühiku puuduseni. (Ellisen *et al.*, 1991) Notch valkude ebanormaalset regulatsiooni on täheldatud ka teistes kasvujates, nagu emakakaelas, peas ja kaelas, neerudes, pankreases, eesnäärmes, munasarjades, suuõõnes, maksas ja seedeelundkonnas. (Espinoza ja Miele, 2013) Notch signaaliraja sihtmärkgeen *Trib2* (ingl *tribbles pseudokinase 2*) kuulub *Tribbles* geeniperekonda. Selle geeni funktsioonide kadumise puhul täheldatakse proliferatsiooni kasvu, kusjuures üleekspressioon aeglustab rakutsükli. Lisaks on näidatud, et *Trib2* geen põhjustab müeloidset leukeemiat. (Keeshan *et al.*, 2006). *Ccnd1* geen kodeerib inimeses tsükliin-D1 valku, millel on seos tuumor-supressor valgu Rb-ga. Selle geeni mutatsioonid, amplifitseerimine ja üleekspresseerumine häirib rakutsykli ja on täheldatud esinema kasvujates ja kantserogeneesis. (Motokura *et al.*, 1991)



**Joonis 6. Notch signaalirada.** Notch signaalirada on vahendatud rakk-rakk interaktsioonidega, kus ligand ja retseptor moodustavad omavahel kompleksi. Enne lõpliku kompleksi moodustumist toimub kolmekordne lõikamine ning valmis ligand-retseptor kompleks saab liikuda tuuma, kus seostudes transkriptsioonifaktoritega aktiveeritakse geeniekspressioon. Modifitseeritud. (Kume, 2009)

### 1.3.6 Vähi tüvirakkude teooria

Kõikides erinevates kudedes on rakkude jagunemises olulised tüvirakud, mida esineb väga väikesel hulgal. Tüvirakkudel on võime säilitada ennast ise-uuendades. (Spangrude *et al.*, 1988) Need tüvirakud annavad aluse kiiresti jagunevatele progenitor-rakkudele, mis viivad täiskasvanud epiteelrakkude kujunemiseni kudedes. Enamikes kudedes on tüvirakud ainsad pikaajalised rakud ning teiste rakkude eluiga ulatub päevadest mõne nädalani. (Al-Hajj ja Clarke, 2004).

Kartsinogeneesi põhjuseid on erinevaid, kui on leitud, et vähki võib tekitada väike hulk vähi tüvirakke (CSC, ingl *cancer stem cells*), mis on sarnate omadustega proliferatsioonivõimega nagu tavalised tüvirakud. (Bonnet ja Dick, 1997; Reyal *et al.*, 2001) Vähiravis on oluline vähendada kasvaja massi ja lõpuks kasvajakud kaotada. Kemoteraapia, kiiritus ja kasvaja kirurgiline eemaldamine ei pruugi olla lõpliku efektiivsusega, vaid ainult haigust levendava

toimega. CSC sisaldavad vähikoed võivad olla ravile resistentsed tänu DNA parandusmehhanismide aktiveerimisele. Lisaks on nädatud, et CSC on olulised angiogeneesi initsieerimises nii enne, kui pärast raviteraapiat ja põhjustavad ka metastaatiliste kasvaja kujunemist. (Eyler ja Rich, 2008) Seetõttu võib peale raviteraapia rakendamist kasvaja esmases koes uuesti tekkida või ilmnevad metastaasid. Seda arvesse võttes peaks vähiteraapia olema suunatud just kasvaja tüvirakkude hävitamisele, mitte ümbritseva koe eemaldamisele.

Vähi tüvirakkude raviteraapia resistentsuses ja vähi uuestitekkimises on olulised ka erinevad signaalirajad. Hedgehog (Clement *et al.*, 2007) ja Wnt/ $\beta$ -kateniin signaalirajad on olulised kiirusresistentsuses, rakkude ellujäämises ja uuenemises. (Woodward *et al.*, 2007)



## 2. EKSPERIMENTAALNE OSA

### 2.1 Töö eesmärk

Töö eesmärk on uurida kas ja kuidas muutub DEN indutseeritud hiire maksakasvaja mudelis Wnt, Hedgehog ja Notch signaaliradade ning p53 ja AKT valgu aktiivsus kasvaja arengu käigus.

### 2.2 Materjal ja metoodika

#### 2.2.1 Kasutatud hiiremudel

Käesolevas bakalaureusetöös kasutati uurimismudelina isaseid CBA hiiri, kellele indutseeriti maksakasvaja teke kasutades DEN (ingl *diethylnitrosamine*) (50 µg/g) ja PB (ingl *phenobarbital*) (lahustatud soolalahuses [0.5 g/l]) manustamist.

DEN on keemiline kartsinogeen, mis põhjustab kasvajaid erinevates organites nagu maks ja nahk ning samuti seede- ja hingamiseldkonnas (Parka *et al.*, 2009; Varna *et al.*, 1996).

PB mõju seostatakse maksakahjustuse tekitamisega, mille tagajärjeks võib olla tõsine või fataalne haigusjuht. Fenobarbital mõjutab maksarakkude tsütoplasmat ja organelle ning tekkinud muutused viivad maksarakkude hüpertroofiani, mis soodustab hepatokartsinogeneesi teket. (Stäubli *et al.*, 1969)

Kontrollhiirtena kasutati PBS (ingl *phosphate buffered saline*) süstitud hiiri. Antud töös uuriti 5, 12, 25 nädala vanuseid hiiri. Ajapunktid valiti vastavalt eelnevalt teostatud katsetele, mis viitasid, et visuaalsed märgid kasvajatest tekkisid just 13. ja 25. nädala vahel. (Belitškin, 2013, Magistritöö) Edasiseks analüüsimiseks säilitati proove kahel moel:

- RNA analüüsimiseks lõigati maksast koetükid, mida hoiustati 1,5 ml tuubides -80°C juures.
- Krüolõikude tegemiseks asetati maksaproovid krüovormidesse (*Sakura Finetek*, Holland), kaeti *Tissue-Tek O.C.T. Compound* (*Sakura Finetek*, Holland) külmutamisseguga ning säilitati vedelas lämmastikus -80 °C juures. Selline meetod tagab RNA ja antikeha epitoopide parema säilivuse (Schoenberg ja Slamon, 2001).

Igas katsegrupis oli vähemalt 3 DEN indutseeritud ja 3 kontrollhiirt.

Katseid hiirte süstimisest kuni nende mahavõtmiseni sooritas Kristina Mäemets-Allas, MSc. Loomkatsed on sooritatud loa alusel (Lisa 1).

## **2.2.2 Proovide töötlus ja analüüs**

### **2.2.2.1 RNA eraldamine maksaproovidest.**

RNA eraldamiseks koetükid kaaluti ning seejärel lõhustati Trizolis (1 ml Trizoli/50-100 mg tüki kohta) (*Ambion*, USA) kasutades mehhaanilist koehomogenisaatorit. Pärast proovide segamist Vortexil lisati kloroform (*Sigma-Aldrich*, USA) (0,2 ml/1 ml Trizoli kohta) ja proove inkubeeriti toatemperatuuril 2-3 minutit. Proove tsentrifugeeriti 12000 rpm (*Mikro 200R, Hettich Lab technology*, Saksamaa) 15 minutit 4 °C juures, et eraldada lahus faasideks. Eraldati vesifaas, mis sisaldab RNA-d. RNA sadestamiseks lisati isopropanooli (*BioTop Naxo*, Eesti) (0,5 ml isopropanooli/1ml Trizoli kohta) ning seejärel inkubeeriti proove 10 minutit toatemperatuuril. RNA sadestamiseks tsentrifugeeriti proove 12000 rpm 10 minutit 4 °C juures. Pärast tsentrifugeerimist eemaldati supernatant ning RNA sadet pesti 75% etanooliga (1 ml etanooli/1 ml Trizoli kohta). Proove tsentrifugeeriti 7500 rpm 5 minutit 4 °C juures ning seejärel eemaldati kogu etanool ja allesjäänud sadet kuivatati 5-10 minutit. Proovid lahustati RNAasi vabas vees (*Thermo Scientific*, USA). Proove inkubeeriti 10-15 minutit 55-60 °C juures. RNA kvaliteedi ja kontsentratsiooni määramiseks kasutati *Nanodrop* spektrofotomeetrit (*Nanodrop 1000, Thermo Scientific*, USA)

### **2.2.2.2 RNA töötlus DNAas I-ga**

RNA proove töödeldi DNAas I-ga, et hüdrolüüsida võimalikku allesjäänud genoomset DNA-d.

DNAas I reaktsioonisegu sisaldas järgmisi komponente:

- Uuritav RNA – 1 µg
- 10 x DNAas I reaktsioonipuhver (sisaldas MgCl<sub>2</sub>) – 1 µl
- DNAas I (1u/µl) – 1 µl
- Ribolock DNAas I inhibiitor (20 nM) – 0,5 µl
- Vesi (nukleaasivaba) – kuni 10 µl

Proove inkubeeriti 37 °C juures 30 minutit. Seejärel lisati EDTA (ingl *Ethylenediaminetetraacetic acid*) (lõppkontsentratsiooniga 2,5 mM) ning proove inkubeeriti 65 °C juures 10 minutit.

Katse läbiviimiseks kasutati firma *Thermo Scientific* (USA) reagente.

### 2.2.2.3 cDNA süntees

DNaas I töötuse läbinud proovidest sünteesiti cDNA – eraldatud mRNAle komplementaarne DNA. Reaktsiooni läbiviimiseks kasutati firma *Thermo Scientific* (USA) reagente vastavalt tootja juhistele. Reaktsioonisegu sisaldas järgmisi komponente:

- Vesi (nukleaasivaba) – 5 µl
- RNA (Dnaas I töötuse läbinud) – 5 µl
- Oligo (dT) (0,5 µg/µl) – 1 µl
- 5 x reaktsioonipuhver – 4 µl
- dNTP segu (10 Mm) – 2 µl
- Ribolock (20 U/µl) – 1 µl
- Revertaas (200 U/µl) – 1 µl

Igast maksaproovist valmistati nii revertaas-positiivsed kui ka -negatiivsed proovid. Revertaasi mittedisaldavaid proove kasutati kontrolliks, sest antud proovides ei sünteesita cDNA-d RNA maatriksilt. Revertaas-negatiivsetes proovides asendati revertaasi kogus veega.

Proove inkubeeriti 60 minutit 37 °C ning seejärel 10 minutit 72 °C juures.

### 2.2.2.4 Polümeraasi ahelreaktsioon

Selleks, et kontrollida iga praimeripaari korrektset seondumist viidi läbi kontroll-PCR (ingl *polymerase chain reaction*) termotsükleriga (*2720 Thermal cycler, Applied Biosystems, Singapur*). Kasutatud praimerid on toodud välja tabelis 2. Reaktsioonisegu sisaldas järgmisi komponente:

- 5x *FIREPol* Master Mix (sisaldab 12,5 mM MgCl<sub>2</sub>) (*Solis BioDyne, Eesti*) – 4 µl
- Deioniseeritud vesi – 13 µl
- *Forward* praimer – 1 µl

- Reverse praimer – 1 µl
- cDNA – 1 µl

(*Forward* – pärisuunaline, *reverse* – vastassuunaline).

Kontrollproovis asendati uuritav cDNA katses kasutatud deioniseeritud veega. Reaktsioonisegu maht oli 20 µl. PCR sooritamiseks kasutati järgnevat programmi:

**Tabel 1. Kontroll PCR programm.**

Protsess	Temperatuur	Aeg	Tsükli arv
Algne denaturatsioon	94 °C	3 min	1
Denaturatsioon	94 °C	30 sek	32
Praimerite seondumine	64,4- 69,3 °C	30 sek	
Elongatsioon	72 °C	30 sek	
Lõplik ekstensioon	72 °C	5 min	1
Jahutamine	4 °C	∞	

Konstrueeritud praimerite optimaalne seondumistemperatuur jäi vahemikku 64°C ja 69,3 °C.

**Tabel 2. Kasutatud praimerid kontroll PCR reaktsioonis.**

Uuritav geen	<i>Forward</i> praimer	<i>Reverse</i> praimer
<i>Gli1</i>	5'-cccatagggtctcgggggtctcaaac-3'	5'-aatgtgtcagtcggcgtccaggagg-3'
<i>Lgr5</i>	5'-ccaatggaataaagacgacggcaaca-3'	5'-actgaaactccttctggacttccggg-3'
<i>Ptch1</i>	5-tgctgtgctgtggtcatcctgaatt-3'	5'-cttgggtgccgatacagagcgagac-3'
<i>Axin2</i>	5'-caggaggatgctgaaggctcaaagc-3'	5'-taaacggacgcctcgtcaaaaactc-3'
<i>Gli2</i>	5'-tgaggagagtggaggccagtagca-3'	5'-cgaaacagtcaggtcggggcc-3'
<i>Shh</i>	5'-tgtggaagcaggttctgactgggtct-3'	5'-ctttcgtctctttaggcaccgcc-3'
<i>Gapdh</i>	5'-ggtgtgaacggatttgccgtattg-3'	5'-tgaggtgagtccgtttaagtgcc-3'
<i>Hey1</i>	5'-gccgacgagaccgaatcaataac-3'	5'-cagggcgtgcgcgtcaaaat-3'
<i>Hes1</i>	5'-agccagtgtcaacacgacacc-3'	5'-cgttcatgactcgtgaag-3'
<i>Notch1</i>	5'-gctgcacagaagcaggcat-3'	5'-aggaaaagccgccgagagatagta-3'
<i>Notch3</i>	5'-cacccttctgttgatgga-3'	5'-gtgccgccaccactgaactc-3'
<i>Trib2</i>	5'-gactgttctaccagattgcctcag-3'	5'-gcagccatgcttgcagagagt-3'
<i>Ccnd1</i>	5'-gttcatttccaaccaccctccat-3'	5'-tcttctccaactccccctc-3'
<i>Tbp1</i>	5'- tacagcatcaacatctcagcaacc-3'	5'-cacgaagtgcaatggtctttaggtc-3'

Tulemuste visualiseerimiseks kasutati agaros-geelektroforeesi meetodit. TAE (ingl *Tris-acetate-EDTA*) puhvriga 1,5 % agarosgeelile (*Lonza, USA*) lisati etiidumbromiidi lõppkontsentratsiooniga 0,01 µg/µl (*Sigma-Aldrich, USA*) ning PCR fragmentide pikkuse hindamiseks kasutati markerit *GeneRuler* (50 bp 0,1 µg/µl) (*Thermo Scientific, USA*).

### 2.2.2.5 Kvantitatiivne reaalaaja PCR.

Kvantitatiivne reaalaaja-PCR viidi läbi *7900 HT Fast Real-Time PCR System* (*Applied Biosystems, Soome*) masinal *Sequence Detection Systems 2.4* tarkvaraga.

Reaktsioonisegu sisaldas järgmisi komponente:

- Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (*Thermo Scientific, USA*) – 5 µl
- *Forward* praimer – 0,5 µl
- *Reverse* praimer – 0,5 µl
- cDNA – 4 µl

Reaktsiooni maht oli 10 µl. Kõiki proove kanti plaadile kolmes korduses ja katset korraliti vähemalt kolmel korral. Uuritavate geenide mRNA hulka normaliseeriti referents geeni GAPDH (ingl *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) vastu. Suhtelise ekspresioonitaseme (x) arvutamiseks kasutati  $\Delta\Delta C_t$  valemit  $x=2^{-\Delta\Delta C_t}$ .

**Tabel 3. Kvantitatiivse reaalaaja PCR-i programm**

Aeg	Temperatuur	Tsükli arv
10 min	95 °C	1
15 sek	95 °C	40
1 min	66,5/64,5 °C *	

\* Temperatuur oleneb kasutatavate praimerite seondumistemperatuurist.

### 2.2.3 Immuonfluorestsentsanalüüs

#### 2.2.3.1 Külmutatud koelõikude ettevalmistamine ja immuonfluorestsentsanalüüs

O.C.T lahusesse külmutatud koeplokkidest lõigati krüostaatmikrotoomiga (*Slee Technik, Saksamaa*) 5 µm paksused lõigud, mis asetati spetsiaalsele *StarFrost* (*Waldemar Knittel, Saksamaa*) alusklaasile.

Krüo-koelõigud fikseeriti 4% paraformaldehüüdiga (*AppliChem*, Saksamaa) 15 minutit toatemperatuuril ning pesti 2 korda 2 minutit 1x PBS-ga. Seejärel koelõigud permeabiliseeriti 10 minutit permeabiliseerimislahusega (0,1% Triton-X-100 (*AppliChem*, Saksamaa) 1x PBS-is) ja pesti 2 korda 2 minutit 1x PBS-ga. Blokeerimiseks kasutati 4% NDS-PBS (ingl *normal donkey serum*) lahust, millega lõike inkubeeriti toatemperatuuril 1 tund. Peale blokeerimist lisati 4% NDS-PBS lahuses lahustatud primaarne antikeha ning koelõike inkubeeriti niisutatud pimekambris 4 °C juures üleöö.

**Tabel 4. Kasutatud antikehad ja fluorestseeruvad värvid.**

<b>Primaarne antikeha</b>	<b>Lahjendus</b>	<b>Peremeesorganism</b>	<b>Tootja</b>
$\beta$ -kateniin	1:50	jänes	<i>Cell Signaling</i> , USA
p53	1:100	hiir	<i>Abcam</i> , Inglismaa
AKT1	1:100	hiir	<i>Cell Signaling</i> , USA
pAKT (S-473)	1:100	jänes	<i>R&amp;D Systems</i> , USA
pAKT (T-308)	1:100	jänes	<i>Cell Signaling</i> , USA
<b>Sekundaarne antikeha</b>	<b>Lahjendus</b>	<b>Peremeesorganism</b>	<b>Tootja</b>
<i>Donkey anti mouse-488</i>	1:500	eesel	<i>Invitrogen</i> , USA
<i>Donkey anti rabbit- 594</i>	1:500	eesel	<i>Invitrogen</i> , USA
<b>Tuumade värvimine</b>	<b>Lahjendus</b>	<b>Sihthmärk</b>	<b>Tootja</b>
DAPI	1:10000	tuumad	<i>Sigma-Aldrich</i> , USA

Järgmisel päeval pärast pesu (3 korda 5 minutit 1x PBS lahusega), inkubeeriti lõike 4% NDS-PBS lahuses lahjendatud sekundaarse antikehaga niisutatud pimekambris 1 tund toatemperatuuril (sekundaarsed antikehad on toodud tabelis nr. 4). Koelõike pesti 3 korda 5 minutit 1x PBS-ga ja värviti tuumad kasutades DAPI lahust (1x PBS lahuses). Pärast tuumade värvimist pesti lõike 5 minutit 1x PBS lahusega, sulundati *Fluorescent Mounting Medium* (*Dako*, Taani) lahusega ja kaeti kattedklaasiga. Maksalõike vaadeldi ja pildistati *Olympus IX-81* fluorestsentsmikroskoobiga kasutades programmi *Cell-R* ning pilte töödeldi pilditöötlusprogrammiga *Hokawo 2.1*.

## 2.3 Tulemused

### 2.3.1 Wnt, Hedgehog ja Notch signaaliradade aktiivsus DEN indutseeritud hiire maksakasvaja mudelis

Käesolevas töös analüüsiti kas ja kuidas muutub DEN indutseeritud hiire maksakasvaja mudelis Wnt, Hedgehog ja Notch signaaliradade aktiivsus. Uuriti nende geenide aktivatsiooni, mis osalevad antud signaaliradades või on nende sihtmärgiks. *Shh* on Hedgehog signaalirajas kõige enam ekspresseeritud ligand, mis avaldub ainult vähikoldes. Lisaks vaadeldi *Gli1* ja *Gli2* geene, mis mõlemad on olulised sihtmärkgeenide ekspressiooniks ning *Ptch1* geeni, mille valk PTCH1 on signaalirajas oluliseks retsptoriks. Wnt signaalirajas uuriti *Axin2* geeni ning ko-retseptorit ja märklaudgeeni *Lgr5*, mis on lisaks ka tüvirakkude marker. Aksiin mängib olulist rolli  $\beta$ -kateniini stabiilsuse kontrollis, ning aksiini funktsiooni kadumine toob endaga kaasa  $\beta$ -kateniini kuhjumise, mis omakorda indutseerib kasvajate teket. Notch signaalirajas vaadeldi retseptoreid kodeerivaid geene *Notch1* ja *Notch3* ning sihtmärkgeene *Hey1*, *Hes1*, *Trib2*, *Ccnd1* ja *Tbp1*.

Kõik qPCR tulemused normaliseeriti koduhoidjageeni *Gapdh* suhtes. Selleks kasutati valemit  $\Delta\Delta Ct$ , kus Ct näitab millise tsükli arvu juures on produkti teke jõudnud eksponentsiaalsesse faasi. Selleks pandi paika kindel läviväärtus. Eelduseks on, et 40. tsükliks on jõudnud produktide teke platoole ning seetõttu lahutati 40-st Ct väärtus. Iga tsükliga kasvab produkide hulk kaks korda, seega tuleb korrutada saadud vahe kahega:  $2(40-Ct)$ . Saadud väärtused ühtlustati referentsgeenide järgi, kus uuritava geeni produkti väärtus jagati referentsgeeni produkti väärtusega:  $2(40-Ct)/2(40-Ct)$ . Saadud tulemus näitab proovides olevat mRNA hulka (Lisa 2.). Igas ajapunktis oli vähemalt 3 DEN indutseeritud ja 3 kontrollhiirt. Kõiki katseid sooritati kolmes korduses ning tulemustest arvutati aritmeetiline keskmine.

Võrreldes omavahel Wnt signaaliraja geenide ekspressiooni PBS ja DEN süstitud hiirtel erinevates ajapunktides, ei saa öelda, et tulemuste erinevused oleksid statistiliselt olulised, (Lisa 2, joonis 1. A. ja B.) sest katsetulemuste veapiiridel esineb kokkulangevus. See tähendab, et selleks kasvajatekke mudelis Wnt signaalirajaga seotud geenide ekspressioon ei muutu. Sarnaselt Wnt signaalirajaga ei muutu ka Hedgehog (Lisa 2, joonis nr. C-F) ja Notch (Lisa 2, joonis nr G-N) signaaliradade geenide ekspressioon DEN indutseeritud kasvajatekke mudelis. Tabelis nr. 5 on toodud kokkuvõtvalt tulemused mRNA hulga keskmistest väärtustest grupis Wnt, Hedgehog ja Notch geenide ekspressiooni analüüsist. P-väärtus näitab, kas mRNA hulga (ehk geeniekspressiooni) erinevus kontrollgrupi ja katsegrupi vahel on oluline (p-väärtus peaks jääma alla 0,05, et saadud geeniekspressiooni erinevus oleks statistiliselt oluline).

**Tabel 5. Normaliseeritud mRNA hulk ja p-väärtused.**

	<b>PBS</b>	<b>DEN</b>	<b>p-väärtus</b>
<i>Hes1</i>			
<b>5.nädal</b>	0.0216	0.0108	0.0665
<b>12.nädal</b>	0.0108	0.0087	0.7409
<b>25.nädal</b>	0.0109	0.0102	0.8449
<i>Hey1</i>			
<b>5.nädal</b>	0.0001	0.0002	0.6775
<b>12.nädal</b>	0.0001	0.0001	0.5434
<b>25.nädal</b>	0.0001	0.0001	0.8538
<i>Notch1</i>			
<b>5.nädal</b>	0.0028	0.0023	0.6989
<b>12.nädal</b>	0.0014	0.0010	0.5108
<b>25.nädal</b>	0.0015	0.0016	0.9391
<i>Notch3</i>			
<b>5.nädal</b>	0.0000	0.0008	0.4035
<b>12.nädal</b>	0.0001	0.0000	0.2383
<b>25.nädal</b>	0.0000	0.0000	0.9980
<i>Trib2</i>			
<b>5.nädal</b>	0.0004	0.0002	0.1636
<b>12.nädal</b>	0.0002	0.0002	0.7915
<b>25.nädal</b>	0.0002	0.0004	0.5799
<i>Ccnd1</i>			
<b>5.nädal</b>	0.0187	0.0292	0.6585
<b>12.nädal</b>	0.0131	0.0170	0.6549
<b>25.nädal</b>	0.0230	0.0536	0.4936
<i>Tbp1</i>			
<b>5.nädal</b>	0.0115	0.0055	0.1369
<b>12.nädal</b>	0.0054	0.0073	0.5850
<b>25.nädal</b>	0.0118	0.0057	0.2569
<i>Gli1</i>			
<b>5.nädal</b>	0.0015	0.0003	0.3597
<b>12.nädal</b>	0.0010	0.0017	0.5660
<b>25.nädal</b>	0.0004	0.0006	0.5902
<i>Gli2</i>			
<b>5.nädal</b>	0.0028	0.0018	0.4844
<b>12.nädal</b>	0.0021	0.0031	0.3985
<b>25.nädal</b>	0.0010	0.0018	0.3554
<i>Shh</i>			
<b>5.nädal</b>	0.0261	0.0165	0.2046
<b>12.nädal</b>	0.0319	0.0279	0.7147
<b>25.nädal</b>	0.0332	0.0355	0.8667
<i>Lgr5</i>			



<b>5.nädal</b>	0.1199	0.1465	0.5171
<b>12.nädal</b>	0.1802	0.1400	0.0969
<b>25.nädal</b>	0.0813	0.0956	0.6762
<i>Axin2</i>			
<b>5.nädal</b>	0.0021	0.0026	0.5110
<b>12.nädal</b>	0.0016	0.0019	0.7299
<b>25.nädal</b>	0.0023	0.0018	0.4365
<i>Ptch1</i>			
<b>5.nädal</b>	0.0015	0.0011	0.2699
<b>12.nädal</b>	0.0028	0.0017	0.1762
<b>25.nädal</b>	0.0024	0.0023	0.8684

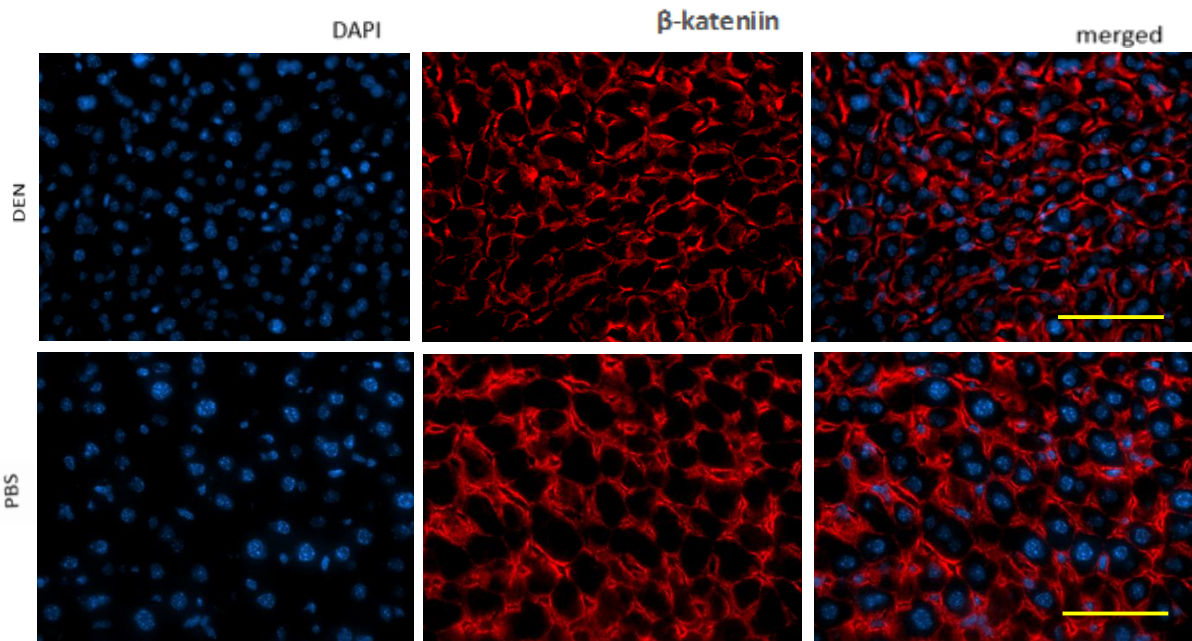
Kuna katsetulemused näitavad, et p-väärtused on suuremad kui 0,05, saab väita, et erinevused uuritavate katsegruppide ja kontrollgruppide vahel on ebaolulised.

Nendest tulemustest järeldub, et töös uuritud hepatotsellulaarse kasvaja moodustumises ei ole Wnt, Hedgehog ja Notch signaalirajad olulised. Põhjuseks peab olema mõne teise kartsinogeneesi põhjustava signaaliraja aktivatsioon või on valitud ajapunktid liiga varajased, et saaks täheldada väljakujunenud hepatotsellulaarset kasvajat.

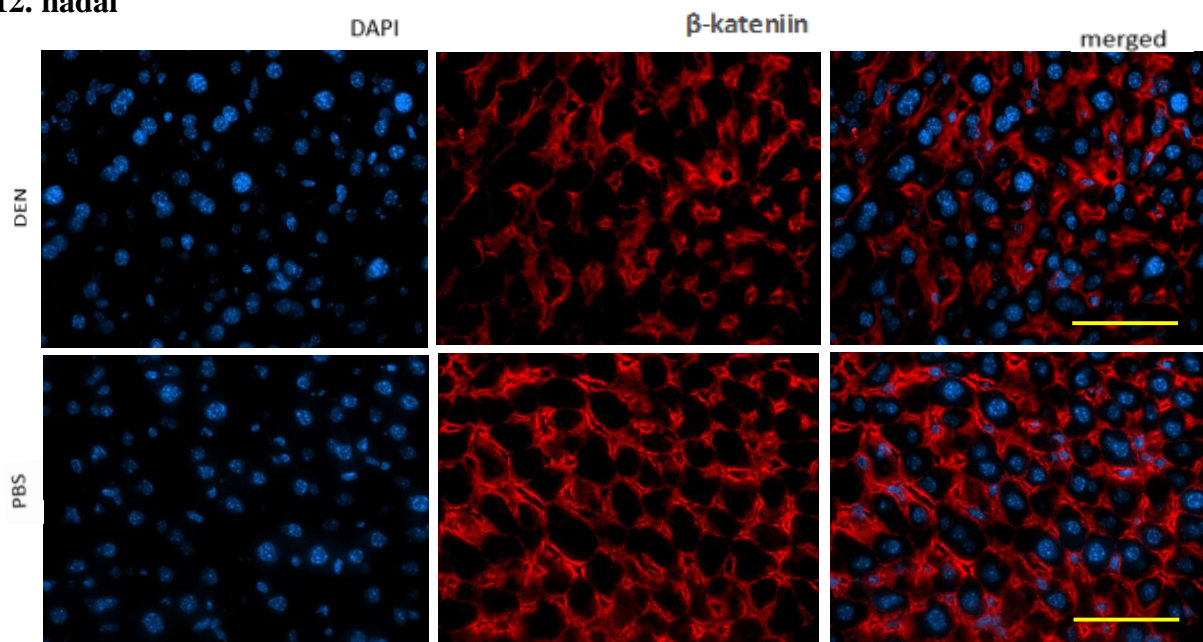
### **2.3.2 $\beta$ -kateniini ekspressioon ja lokaliseerimine DEN indutseeritud hiire maksakasvaja mudelis**

Wnt signaalirajas mängib lisaks *Axin2* ja *Lgr5* geenidele rolli ka  $\beta$ -kateniin, millel on mitmeid funktsioone.  $\beta$ -kateniin reguleerib tuuma lokaliseerudes sihtmärkgeenide transkriptsiooni.  $\beta$ -kateniini ekspressioonitase on olulise tähtsusega, sest valgu üleekspressioonist seostatakse kartsinogeneesiga. Järgnevalt teostati immunofluorestsentsanalüüs, et hinnata  $\beta$ -kateniini lokaliseerimist ja hulka rakkudes (Joonis 7.).

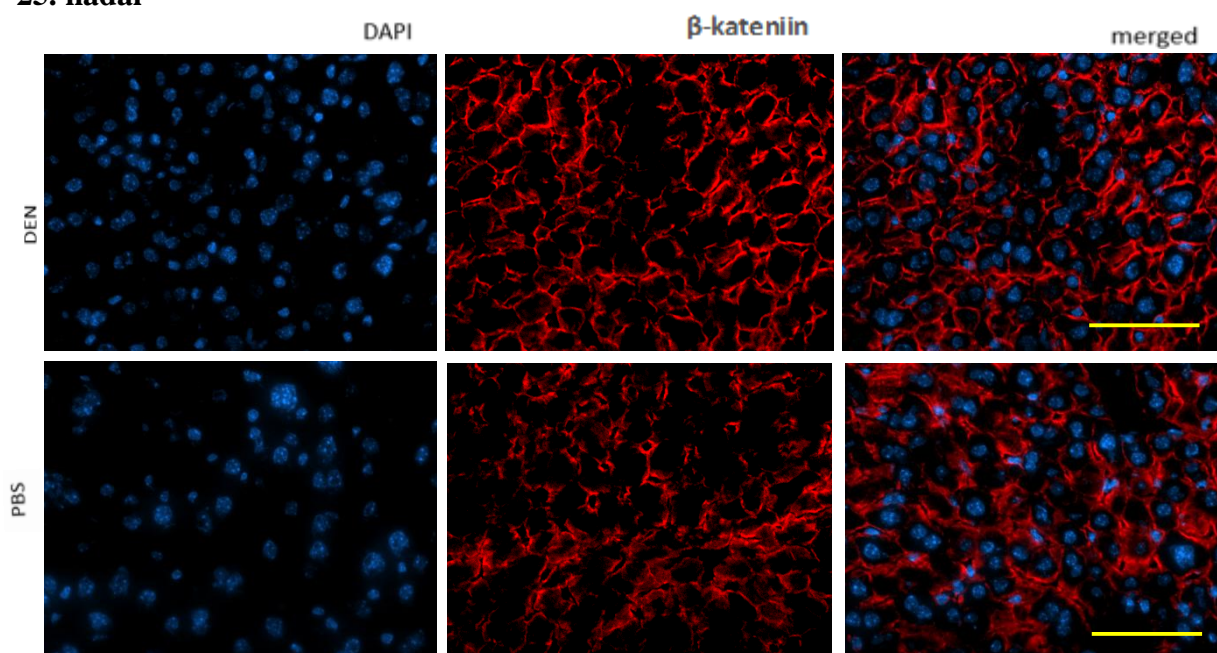
5. nädal



12. nädal



## 25. nädal

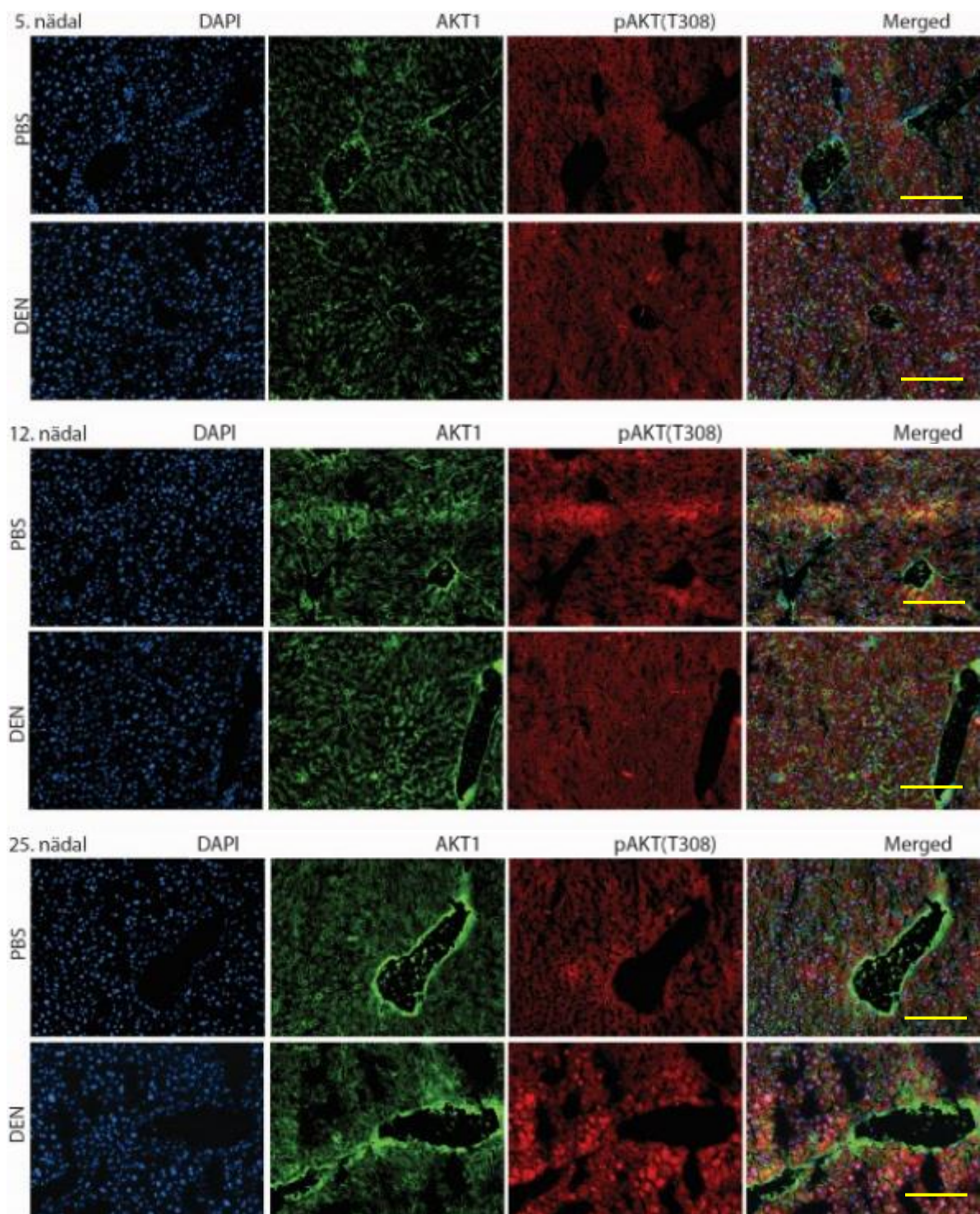


**Joonis 7.  $\beta$ -kateniini lokalisatsioon ja ekspresseerumine.** DAPI-ga on värvitud rakkude tuumad ning  $\beta$ -kateniini antikehaga on välja toodud antud valgu ekspresseerumine ja asukoht rakkudes. *Merged* piltidel saab jälgida  $\beta$ -kateniini lokalisatsiooni võrreldes tuumade asukohaga. DEN real on DEN-indutseeritud kahjustusega hiired ja PBS real kontrollhiired.

Võrreldes PBS- ja DEN-süstitud hiirte maksadest tehtud lõike on näha, et  $\beta$ -kateniin asub peamiselt rakumembraanis, mitte tuumades. Võrreldes omavahel erinevaid ajapunkte on näha, et ekspressioonitase ja lokalisatsioon ei muutu.

### 2.3.3 AKT valgu aktiivsete vormide tase ja lokalisatsioon DEN-indutseeritud hiire kasvujatekke mudelis

PI3K/AKT signaalirada kontrollib rakkudes erinevaid protsesse nagu rakkude jagunemine, valkude süntees ja glükoosi metabolism. Aktiivne signaalirada tagab rakkude ellujäämise, kuid inaktiveeritud signaalirada põhjustab apoptoosi. AKT-il on 3 isvormi, millest AKT1 vastutab rakkude elulemuse eest. AKT valgu fosforüleerimissaidid Ser-473 ja Thr-308, mida fosforüleerivad PDK1 ja mTORC2, on olulise AKT valgu täielikuks aktiveerumiseks.



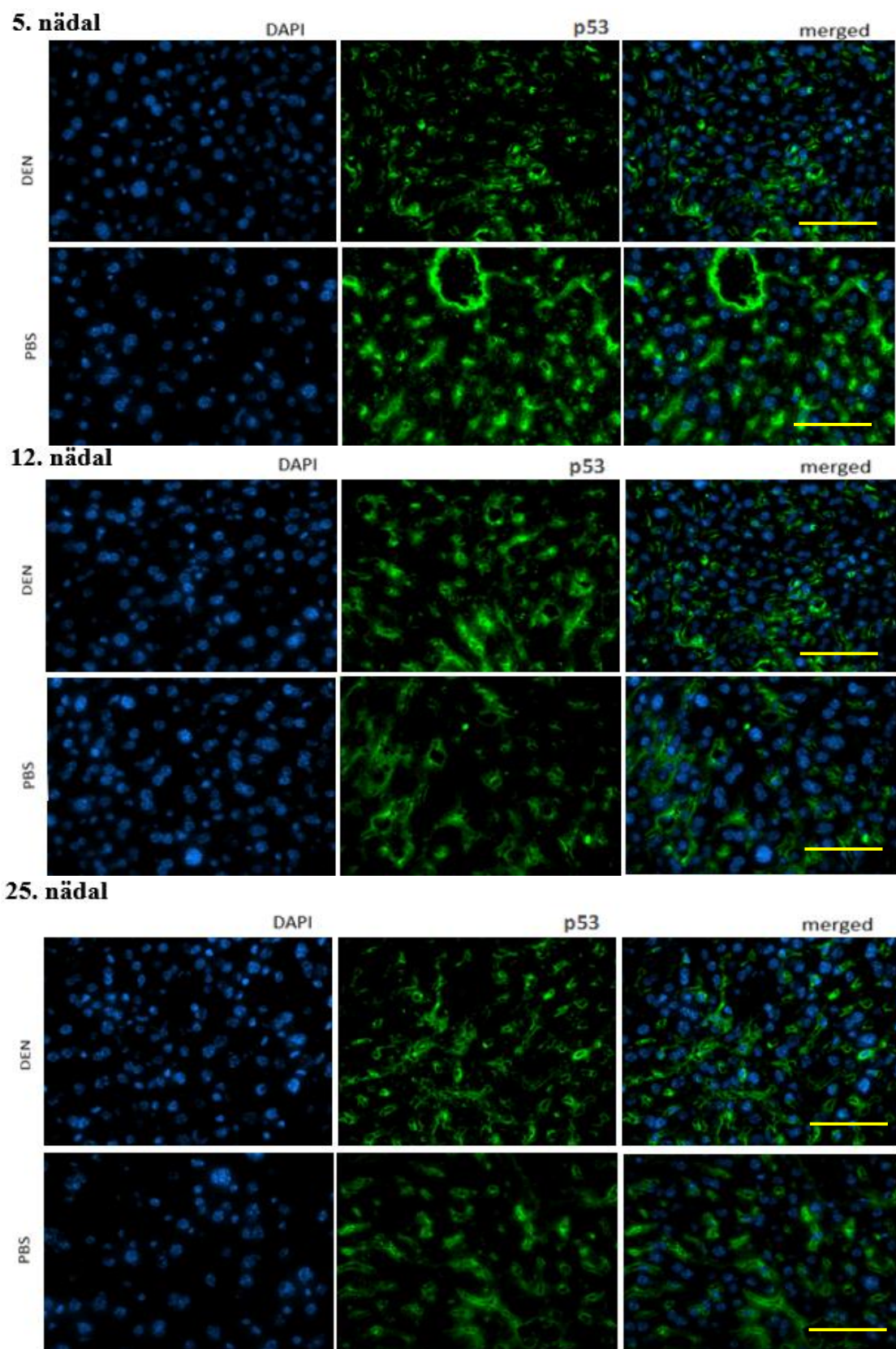
**Joonis 8. pAKT valgu T-308 aktiivsus kahjustatud (DEN) ja kahjustamata (PBS) maksakoes.**

Lõike värviti Akt1 antikehaga, et vaadata basaalses aktivatsiooni ning T-308 (Joonis 8.) ja S-473-ga (Lisa 3., Joonis 2.), et analüüsida aktiivsete vormide taset ja asukohta. Immuunofluorestsentsanalüüs näitab, et 5. ja 12. nädal ei muutu AKT-i ekspressioon, ega lokaliseerimine. 25. nädalal on näha, et fosforüleeritud aktiivne Akt lokaliseerub tuuma, mis

näitab, et 25. nädalaks on Akt signaaliraja aktiivsus tõusnud. PBS real on kontrollhiired ja DEN real kahjustusega hiired.

#### **2.3.4 p53 ekspressioon ja lokalisatsioon DEN indutseeritud hiire maksakasvaja mudelis**

p53 on oluline tuumor-supressor geen. p53 valgu hulka hoiavad rakus madalana erinevad negatiivsed regulaatorid. Rakkudes, mis on mõjutatud paljude stressisignaalide poolt, võib p53 hakata kuhjuma. Sellised muutused võivad viia kartsinogeneesi tekkeni. Katsetulemused on tootud järgneval joonisel (Joonis 9.).



**Joonis 9. p53 valgü ekspressioon ja lokaliseerumine.** Võrreldes PBS- ja DEN-süstitud hiirte maksalõike erinevates ajapunktides, ei saa täheldada p53 valgü ekspressiooni ja lokalisatsiooni muutust. Nii DEN indutseeritud vigastusega, kui ka kontrollhiirte maksalõikudes on valk ekspresseeritud peamiselt rakumembraanis.

## 2.4 Arutelu

Maks on inimorganismi üks kesksemaid organeid ning sellega seotud haigused on tihtipeale raskekujulised. Maksavähki esineb erinevates vormides, kuid kõige enamlevinud vähitüübiks on hepatotsellulaarne kartsinoom, mis moodustab 90% kõikidest maksavähi juhtudest. Vähk võib alguse saada nii eelneva kahjustusega maksast nagu näiteks maksatsirroosist, kui ka tervest ilma kahjustuseta maksast. HCC kujunemises ja tekkes on oluline erinevate signaaliradade aktivatsioon. Sellest lähtvalt püstitati käesoleva uurimistöo eksperimentaalses osas eesmärk uurida kas ja kuidas muutub DEN indutseeritud hiire maksakasvaja mudelis Wnt, Hedgehog ja Notch signaaliradade ning p53 ja AKT valgu aktiivsus kasvaja arengu käigus.

Esmalt süstiti hiiri DEN-ga, et indutseerida hepatotsellulaarse kartsinoomi teket. Dietüülnitrosamiin on kartsinogeen, mis tekitab mutatsioone DNAs ja kasvajaid, näiteks maksas ja seedeelundkonnas. (Parka *et al.*, 2009; Varna *et al.*, 1996) Kontrollgrupi hiiri süstiti PBS-ga. Proove koguti 5., 12. ja 25. nädala vanustelt hiirtelt, kelle maksadest eraldatud RNAsid analüüsiti RT-qPCR meetodiga. Kõiki katseid korrati kolm korda ning tulemustest arutati aritmeetiline keskmine. PCR-ga saadud tulemusi analüüsides võrreldi kuidas muutub Notch, Hedgehog ja Wnt signaaliradade aktiivsus DEN indutseeritud kahjustusega kasvajamudelis ja PBS-ga süstitud kontrollgrupis. Kokku uuriti nendes signaaliradades 13 geeni, mille aktiivsust või aktiivsuse vähenemist on täheldatud kasvaja arengus. Hedgehog signaalirajas uuriti gene *Shh*, mis kodeerib kõige enam ekspresseeritud ligandi Shh, mis avaldub ainult vähikoldes, mitte ümbritsevas koes. (Echelard *et al.*, 1993; Johnson *et al.*, 1994; Riddle *et al.*, 1993) Lisaks uuriti gene *Ptch1*, *Gli1* ja *Gli2*. *Gli* geeniperekonna geenid on olulised sihtmärkgeenide ekspressioonis. (Carney ja Ingham, 2013) Sarnaselt Shh-le on *Gli1* ekspresseeritud vähikoldes. (Ruppert *et al.*, 1991) PTCH1 valk, mida kodeerib *Ptch1* geen, on Hedgehog signaalirajas retseptor. (Ingham, 1998; Ingham *et al.*, 1991) Wnt signaalirajas uuriti tüvirakumarkerit ja märklaudgeeni *Lgr5* ning *Axin2*, mis on olulne  $\beta$ -kateniini taseme kontrollis. Aksiini geeni funktsiooni kadumine põhjustab  $\beta$ -kateniini valgu kuhjumist, mis indutseerib kasvajate teket. (Liu *et al.*, 2000) Notch signaalirajas vaadeldi *Notch1* ja *Notch3* gene, mis kodeerivad retseptoreid ning sihtmärkgeene *Hey1*, *Hes1*, *Trib2*, *Ccnd1* ja *Tbp1*. Uuritavate geenide mRNA tase normaliseeriti koduhoidja geeni *Gapdh* suhtes. Analüüsides RT-qPCR tulemusi (Lisa 2, joonis 1.) on näha, et üheski uuritud geen ei esine statistilist olulisust PBS-ga süstitud kontrollhiirte ja DEN indutseeritud kahjustusega hiirte vahel. Ekspressioonitasemetes esineb erinevusi, kuid kuna katsetulemuste veapiirid langevad kokku ei saa tuua välja olulisi muutusi. See lubab oletada, et 25. nädalaks ei ole hepatotsellulaarne kartsinoom jõudnud välja kujuneda.

Lisaks vaadeldi töös p53 ekspressiooni, AKT valgu fosforüleeritust positsioonides S-473 ja T-308 ning  $\beta$ -kateniini lokalisatsiooni. Selleks analüüsiti hiiremaksadest valmistatud külmutatud koelõigud immunofluorestsents analüüsi meetodil.

p53 valku vaadeldi seepärast, kuna eelnev kirjandus hepatotsellulaarses kartsinoomis esinevate mutatsioonide, onkogeenide ja tuumorsupressorite kohta näitab, et ühes kõige sagedamini muteerunud geeniks on *TP53*. (Moeini *et al.*, 2012) *TP53* aktiveerub kui ekspressioon lokaliseerub membraanist tuuma. Analüüsidest tulemusi (Joonis 9.) on näha, et tuuma lokaliseerumist ei toimu. Tervete maksade (PBS-ga süstitud hiired) puhul on selline tulemus oodatav, kuid kahjustusega hiirtes mitte, sest DEN tekitab rakkudele kahjustuse. Seega saab taaskord eeldada, et 25. nädalane ajapunkt on valitud liiga varajane, et jõuaks välja kujuneda hepatotsellulaarne kartsinoom või on vähi areng liiga varajases staadiumis.

$\beta$ -kateniin on Wnt signaalirajas oluline valk ning see on tihedalt seotud *Axin2* geeni ekspressioonitasemega.  $\beta$ -kateniini stabiilsuse regulatsioonis on oluline AXIN2 valk, mille funktsiooni kadumine toob endaga kaasa  $\beta$ -kateniini kuhjumise. See võib põhjustada soolestiku kasvajat teket.  $\beta$ -kateniin mutatsioone on sagedasti leitud erinevatest kasvajatest aga eelkõige HCC-st. (Liu *et al.*, 2000) Kui  $\beta$ -kateniini kuhjumine oleks käesoleva kasvajakasvatuse põhjuseks, peaks selle ekspressioonitase hilisemates ajapunktides kasvama ning signaal peaks lokaliseeruma membraanist tuuma. Kuna antud töös saadud tulemustes ei ole  $\beta$ -kateniini lokaliseerumist DEN-süstitud hiirte maksades võrreldes kontrollhiirtega muutunud, siis pole tõenäoliselt Wnt signaalirada oluline käesoleva kasvajakasvatuse tekkimises.

PI3K/AKT signaaliraja ebanormaalsel aktivatsiooni on kirjeldatud soolestiku- ja maksakasvajate tekkes. (Taniguchi *et al.*, 2010) Fosforüleerimissaidi S-473 aktiivsust ei saa täheldada. (Lisa 3., joonis 2.) Katsetulemused pAKT-S308 antikehaga (Joonis 8.) näitavad, et 25. nädal on DEN indutseeritud kahjustusega lõikudel fosforüleeritud aktiivne Akt liikunud tuuma. See näitab, et PI3K/AKT signaaliraja aktiivsus on tõusnud.

Analüüsidest tulemusi ning toetudes eelnevale kirjandusele saab väita, et valitud ajapunktid olid liiga varajased, et saaks täheldada väljakujunenud hepatotsellulaarset kasvajat. Katsed 33. nädala vanusest CBA hiirest eraldatud primaarse maksakasvaja rakuliini K07074-ga näitavad, et tõusnud on aktiivsus Notch, Hedgehog, AKT ja Wnt signaalirajas. (Mäemets-Allas *et al.*, 2016).

Nendest tulemustest võib järeldada, et hetkel on selgusetu, mis on käesolevas uurimistöös kasutatud kasvajakasvatuse tekkepõhjuseks. Katseid tuleks korrata hilisemates ajapunktides.



## KOKKUVÕTE

Maksal on organismis tähtis roll, mistõttu on selle organiga seotud haigused raskekujulised või letaalsed. Surmaga lõppevatest haigustest on maksavähk on maailmas kolmandal kohal. Olenevalt vähi tüübist võivad kartsinogeneesi põhjused olla erinevad. Täpsed kartsinogeneesi molekulaarsed mehhanismid on teadmata, kuid on näidatud erinevate signaaliradade, näiteks Hedgehog, Notch ja Wnt, aktivatsiooni vähi tekkes ja kujunemises. Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida kas ja kuidas muutub DEN-indutseeritud hiire maksakasvaja mudelis Wnt, Hedgehog ja Notch signaaliradade ning p53 ja AKT valgu aktiivsus kasvaja arengu käigus.

Esmalt süstiti isaseid CBA hiiri DEN-ga, et induktsioneerida hepatotsellulaarse kartsinoomi teke. Maksaproove koguti 5, 12 ja 25 nädala vanustelt hiirtelt. Maksadest eraldati RNA ning sooritati RT-qPCR, et analüüsida Hedgehog, Wnt ja Notch signaalirajas oluliste geenide aktivatsiooni. Igas ajapunktis analüüsiti vähemalt 3 DEN induktsioneeritud ja 3 PBS-ga süstitud kontrollhiirt. Kõiki katseid sooritati kolmes korduses. Võrreldes omavahel signaaliradade geenide ekspressiooni PBS ja DEN süstitud hiirtel erinevates ajapunktides, ei saa öelda, et tulemuste erinevused oleksid statistiliselt olulised, sest katsetulemuste veapiiridel esineb kokkulangevus. Seega võib väita, et antud signaalirajad ei mängi uuritud kasvaja mudeli kartsinogeneesis olulist rolli. Põhjuseks võivad olla muud signaalirajad või oleks pidanud koguma proove hilisematelt ajapunktidelt kui 25 nädalat.

Immuunfluorestsents analüüsiga uuriti p53 ja AKT valgu ekspressiooni ja lokaliseerumist. Mutatsioonid p53 signaalirajas viivad p53 valgu kuhjumiseni, mis omakorda võib põhjustada kasvaja teket. Aktiivne PI3K/AKT signaalirada on oluline rakkude ellujäämiseks, kusjuures inaktiivne signaalirada tekitab apoptoosi. Maksa- ja soolestikukasvajate puhul on kirjeldatud AKT signaaliraja ebanormaalset aktivatsiooni. p53, AKT1 ja  $\beta$ -kateniin olid nii PBS- kui ka DEN-süstitud hiirte koelõikudel ekspresseeritud rakumembraanis. Et saaks täheldada antud geenide aktivatsiooni peab signaal lokaliseeruma tuuma. Vaadeldes T-308 antikehadega töödeldud lõike, on 25. nädalal näha, et fosforüleeritud aktiivne Akt lokaliseerub tuuma, mis näitab, et 25. nädalaks on AKT signaaliraja aktiivsus tõusnud.

Uurimistöös analüüsiti kõige tõenäolisemaid maksakasvajate põhjustavaid signaaliradasid, kuid täheldada sai vaid PI3K/AKT signaaliraja T-308 aktivatsiooni. Sellest väljendub, et antud töös kasutatud kasvaja mudeli tekkepõhjuseks on muud signaalirajad. Samuti võisid olla valitud liiga varajased ajapunktid ning statistilisi erinevusi geeniekspressioonis ei ole jõudnud veel tekkida.

# **Characterization of tumor-specific signaling pathways in DEN-induced liver tumor model**

Anett-Hildegard Laarmann

## **SUMMARY**

Liver is one of the biggest glandular organ that carries vital role regulating the metabolism. In addition, it functions as immunogenic organ, as endocrine organs, excreting the bile, and as phagocytic organ, breaking down toxins. Liver cancer is the third largest cause of fatal cases worldwide. Depending on the type of cancer, causes of carcinogenesis may be different. Exact molecular mechanisms are unknown, but activation of different signaling pathways has been shown. For example, Hedgehog, Notch, Wnt and PI3K/AKT signaling pathways play important role in carcinogenesis. p53 acts as a tumor-suppressor. Mutations in this gene could cause accumulation of p53 protein- that could lead to development of cancer. The aim of the current study was to examine whether and how does Wnt, Hedgehog and Notch signaling pathways and also p53 and AKT protein activity change in DEN induced mouse liver cancer model.

First, male CBA mice were injected with DEN, in purpose to cause development of hepatocellular carcinoma. Samples were collected on 5<sup>th</sup>, 12<sup>th</sup> and 25<sup>th</sup> week. RNA was isolated and RT-qPCR was performed to analyse gene expression in Wnt, Hedgehog and Notch pathways. Comparing results in DEN and in PBS injected control mice, no statistically important difference was detected. It indicates, that studied signaling pathways were not the cause of cancer in DEN induced tumor development model.

Next, mouse liver derived cryo sections were stained with p53,  $\beta$ -catenin, T-308, S-473 and AKT1 antibodies. Observing tissue samples stained with T-308, on 25<sup>th</sup> week phosphorylated active Akt localises into nucleus. It shows that activity of PI3K/AKT pathway has been up-regulated. Samples stained with p53,  $\beta$ -catenin, T-473 and AKT1 antibodies shows gene expression only in cell membranes.

To conclude, this study analysed activation of signaling pathways that could cause hepatocellular carcinoma. According to the results, only T-308 expression in PI3K/AKT pathway was shown to be activated. It indicates, that other signaling pathways researched in this study were not the cause of developing cancer model used in this thesis or we collected samples too early and statistical difference in gene expression has not happened yet.

## KASUTATUD KIRJANDUS

- Abdel-Misih, S. R. Z., Bloomston, M. (2010). Liver Anatomy. *Surgical Clinics of North America* 90 (4): 643-53
- Al-Hajj, M., F Clarke, M. F. (2004). Self-renewal and solid tumor stem cells. *Oncogene* 23, 7274–7282.
- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M. D., Lake, R. J. (1999). Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science*. 284(5415):770-6
- Belitškin, D. (2013). Regulation of adult stem cells in mouse liver tumorigenesis. Magistritöö. Tartu Ülikool. Molekulaar- ja rakubioloogia instituut. Lk. 15-17
- Belloni, E. *et al.* (1996). Identification of Sonic hedgehog as a candidate gene responsible for holoprosencephaly. *Nature Genet* 14(3): 353-6
- Bitgood, M. J., McMahon, A. P. (1995). Hedgehog and Bmp genes are coexpressed at many diverse sites of cell-cell interaction in the mouse embryo. *Dev Biol*. 172(1):126-38
- Bitgood, M. J., Shen, L., McMahon, A. P. (1996). Sertoli cell signaling by Desert hedgehog regulates the male germline. *Curr. Biol*. 6: 298-304.
- Bloch, E.H. (1970). The termination of hepatic arterioles and the functional unit of liver as determined by microscopy of the living organ. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 170: 78-87
- Blumgart, L. H., Belghiti, J. (2007). Surgery of the liver, biliary tract, and pancreas, 3<sup>rd</sup> ed. *Elsevier*. Philadelphia. Lk. 3-30
- Bonnet, D., Dick, J. E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*. 3(7):730-7
- Brou, C. *et al.* (2000). A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Mol Cell*. 5(2):207-16
- Bucher, N. L. R. (1967). Experimental Aspects of Hepatic Regeneration. *New Eng. J. Med*. 227:686. 738
- Busuttil, R. W., Klintmalm, G. B. (2014). Transplantation of the liver, 3<sup>rd</sup> ed. *Elsevier*. USA. Lk. 25-29

- Carney, T. J., Ingham, P. W. (2013). Drugging Hedgehog: signaling the pathway to translation. *BMC Biology*. 201311:37
- Cheung, M., Testa, J. R. (2013). Diverse mechanisms of AKT pathway activation in human malignancy. *Curr Cancer Drug Targets*. 13(3):234-44
- Chew, B. S., Siew, W. L., Xiao, B., Lehming, N. (2010). Transcriptional activation requires protection of the TATA-binding protein Tbp1 by the ubiquitin-specific protease Ubp3. *Biochemical Journal*. 431(3). 391-402
- Clement, V. *et al.* (2007). HEDGEHOG-GLI1 signaling regulates human glioma growth, cancer stem cell self-renewal, and tumorigenicity. *Curr Biol*. 17(2):165-72
- Craig, J. R. *et al.* (1980). Fibrolamellar Carcinoma of the Liver: A Tumor of Adolescents and Young Adults with Distinctive Clinico-pathologic Features. *Cancer*. 46:372-379
- Dang, T. P. *et al.* (2000). Chromosome 19 translocation, overexpression of Notch3, and human lung cancer. *J Natl Cancer Inst*. 92(16):1355-7
- Davidoff, A. M., Humphrey, P. A., Iglehart, D., Marks, J. R. (1991). Genetic basis for p53 overexpression in human breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci*. Vol. 88. 5006-5010
- de Lau W. *et al.* (2011). Lgr5 homologues associate with Wnt receptors and mediate R-spondin signalling. *Nature*. 476: 293-297
- Diehl, N., Schaal, H. (2013). Make Yourself at Home: Viral Hijacking of the PI3K/Akt Signaling Pathway. *Viruses* 5(12). 3192-3212
- Downward, J. (2004). PI3-kinase, Akt and cell survival. *Semin Cell Dev Biol*. 15(2):177-82
- Echelard, Y. *et al.* (1993). Sonic Hedgehog, a Member of a Family of Putative Signaling Molecules, Is Implicated in the Regulation of CNS Polarity. *Cell*. Vol. 75, 1417-1430
- Eggert, T., McGlynn, K. A., Duffy, A., Manns, M.P. , Greten, T.F., Altekruse, S. F. (2013). Fibrolamellar hepatocellular carcinoma in the USA, 2000–2010: A detailed report on frequency, treatment and outcome based on the surveillance, epidemiology, and end results database. *United European Gastroenterol J*. 1:351–357
- Ehtesham, M. *et al.* (2007). Ligand-dependent activation of the hedgehog pathway in glioma progenitor cells. *Oncogene*. 26(39): 5752-61
- Ellisen, L. W. *et al.* (1991). TAN-1, the human homolog of the *Drosophila* notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell*. 66(4):649-61

- El-Serag, H. B. (2011). Hepatocellular Carcinoma. *N Engl J Med.* 365:1118-27
- Espinoza, I., Miele, L. (2013). Notch inhibitors for cancer treatment. *Pharmacol Ther.* 139(2):95-110
- Eyler, C. E., Rich, J. N. (2008). Survival of the Fittest: Cancer Stem Cells in Therapeutic Resistance and Angiogenesis. *J Clin Oncol.* 10; 26(17): 2839–2845
- Fearon, E. R., Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 61(5):759-67
- Forner, A., Llovet, J. M., Bruix, J. (2012). Hepatocellular carcinoma. *Elsevier Ltd.* 379(9822):1245-55.
- Fresno Vara, J. A. *et al.* (2004). PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev.* 30(2):193-204.
- Gonzalez, E., McGraw, T. E. (2009). The Akt kinases: isoform specificity in metabolism and cancer. *Cell Cycle.* 15; 8(16): 2502–2508
- Haegebarth, A., Clevers, H. (2009). Wnt Signaling, Lgr5, and Stem Cells in the Intestine and Skin. *Am J Pathol.* 174(3): 715–721
- Hanahan, D., Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer Review. *Cell*, Vol. 100. 57–70
- Harris, S. L., Levine, A. J. (2005). The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene* 24, 2899–2908
- Honeyman, J. N. *et al.* (2014). Detection of a recurrent DNAJB1-PRKACA chimeric transcript in fibroblast-like hepatocellular carcinoma. *Science.* 343:1010–1014
- Ingham, P. W. (1998) Transducing Hedgehog: the story so far. *EMBO J.* 17(13):3505-11
- Ingham, P. W., McMahon, A. P. (2001). Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev.* 15: 3059-3087
- Ingham, P. W., McMahon, A. P. (2001). Hedgehog signalling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev.* 15, 3059–3087
- Ingham, P. W., Taylor, A. M., Nakano, Y. (1991). Role of *Drosophila* patched gene in positional signaling. *Nature.* 353, 184–187

- Johnson, R. L., Riddle, R. D., Laufer, E., Tabin, C. (1994). Sonic hedgehog: a key mediator of anterior-posterior patterning of the limb and dorso-ventral patterning of axial embryonic structures. *Biochem Soc Trans.* 22(3):569-74
- Jung, J., Frump, D., Su, J., Wang, W., Mozaffar, T., Gupta, R. (2015). Desert hedgehog is a mediator of demyelination in compression neuropathies. *Exp Neurol.* 271:84-94.
- Kazanskaya, O., Glinka, A., del Barco Barrantes, I., Stannek, P., Niehrs, C., Wu, W. (2004). R-Spondin2 is a secreted activator of Wnt/b-catenin signaling and is required for Xenopus myogenesis. *Dev. Cell.* 7: 525–534
- Keeshan, K. *et al.* (2006). Tribbles homolog 2 inactivates C/EBPalpha and causes acute myelogenous leukemia. *Cancer Cell.* 10(5):401-11
- Kessler, T., Hache, H., Wierling, C. (2013). Integrative analysis of cancer-related signaling pathways. *Front Physiol.* 4:124
- Kraus, C., Liehr, T., Hülsken, J., Behrens, J., Birchmeier, W., Grzeschik, K. H., Ballhausen, W. G. (1994). Localization of the human beta-catenin gene (CTNNB1) to 3p21: a region implicated in tumor development. *Genomics.* 23 (1): 272–4
- Krebs, L. T. *et al.* (2000). Notch signaling is essential for vascular morphogenesis in mice. *Genes Dev.* 1; 14(11):1343-52
- Kume, T. (2009). Novel insights into the differential functions of Notch ligands in vascular formation. *J Angiogenes Res.* 1: 8. doi: 10.1186/2040-2384-1-8
- Levi, J. U., Zeppa, R. (1971). Source of the Humoral Factor That Initiates Hepatic Regeneration. *Annals of Surgery.* 174:3. 364-370
- Levine, A. J. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88, 323–331
- Liu, J., Zhang, C., Hu, W., Feng, Z. (2015). Tumor suppressor p53 and its mutants in cancer metabolism. *Cancer Lett.* 28;356(2 Pt A):197-203
- Liu, Z. J. *et al.* (2003). Regulation of Notch1 and Dll4 by vascular endothelial growth factor in arterial endothelial cells: implications for modulating arteriogenesis and angiogenesis. *Mol Cell Biol.* 23(1):14-25
- Liu, W. *et al.* (2000). Mutations in AXIN2 cause colorectal cancer with defective mismatch repair by activating beta-catenin/TCF signalling. *Nat Genet.* 26(2):146-7
- Llovet, J. M. *et al.* (2016). Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Primers.* 14;2:16018.

- Mescher, A.L. 2009. Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas, 12<sup>th</sup> ed. *McGraw-Hill Medical*. USA. Lk. 289
- Michalopoulos, G. K., DeFrances, M. C. (1997) Liver regeneration. *Science*. 4; 276 (5309): 60-6
- Miyajima, A., Tanaka, M., Itoh, T. (2014). Stem/progenitor cells in liver development, homeostasis, regeneration, and reprogramming. *Cell Stem Cell*. 14(5):561–574
- Moeini, A., Helena Cornellà, H., Villanueva, A. (2012). Emerging Signaling Pathways in Hepatocellular Carcinoma. *Liver Cancer*. 1(2): 83–93
- Morin, P. J. (1999). Beta-catenin signaling and cancer. *BioEssays* 21 (12): 1021–30
- Motokura, T. *et al.* (1991). A novel cyclin encoded by a *bcl1*-linked candidate oncogene. *Nature*. 350(6318):512-5
- Mu, X. *et al.* (2015). Hepatocellular carcinoma originates from hepatocytes and not from the progenitor/biliary compartment. *J Clin Invest*. doi:10.1172/JCI77995.
- Murthy, S. S., Tosolini, A., Taguchi, T., Testa, J.R. (2000). Mapping of AKT3, encoding a member of the Akt/protein kinase B family, to human and rodent chromosomes by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 88:38–40
- Mäemets-Allas, K., Belitskin, D., Jaks, V. (2016). The inhibition of Akt-Pdk1 interaction efficiently suppresses the growth of murine primary liver tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 20;474(1):118-25
- Nakanishi, K. *et al.* (2005). Akt phosphorylation is a risk factor for early disease recurrence and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Cancer*. 103(2):307-12
- Nakata, S., Phillips, E., Goidts, V. (2014) Emerging role for leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptors LGR5 and LGR4 in cancer stem cells. *Cancer Manag Res*. 2014; 6: 171–180.
- Nienstedt, W. *et al.* 2005. Inimese füsioloogia ja anatoomia, 2. trükk. *Medicina*. Tallinn. Lk-316-323
- Nusse, R., Varmus, H. E. (1982). Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell*. 31. 99–109
- Nüsslein-Volhard, C., Wieschaus, E. (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287: 795-801

- Park, J. T. *et al.* (2006). Notch3 gene amplification in ovarian cancer. *Cancer Res.* 66(12):6312-8
- Parka, D-H. *et al.* (2009). Diethylnitrosamine (DEN) induces irreversible hepatocellular carcinogenesis through overexpression of G1/S-phase regulatory proteins in rat. *Toxicol Lett* 191 (2009) 321–326
- Peifer, M., Polakis, P. (2000). Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis-a look outside the nucleus. *Science* 287: 1606-1609
- Peifer, M., Rauskolb, C., Williams, M., Riggleman, B., Wieschaus, E. (1991). The segment polarity gene armadillo interacts with the wingless signaling pathway in both embryonic and adult pattern formation. *Development* 111 (4): 1029–1043
- Peters, R. L. (1976) in: Okuda, K. Peters K. L. (Eds.) Pathology of hepatocellular carcinoma. *Wiley*. New York. USA: 107–168
- Petitjean, A. , Achatz, M. I., Borresen-Dale, A. L., Hainaut, P., Olivier, M. (2007). TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. *Oncogene* 26. 2157–2165
- Pocock, G., Richards, C. D., Richards, D. A. 2012. Human physiology, 4<sup>th</sup> ed. *Oxford University Press*. United Kingdom. Lk. 627-640
- Pommier, Y. *et al.* (2004). Apoptosis defects and chemotherapy resistance: molecular interaction maps and networks. *Oncogene* 23(16):2934-49
- Reyal, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., Weissman, I. L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414. 105-111.
- Riddle, R. D., Johnson, R. L., Laufer, E., Tabin, C. (1993). Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell*.75(7): 1401-16
- Riggle, K. M., Turnham, R., Scott, J. D., Yeung R. S., Riehle, K. J. (2016). Fibrolamellar Hepatocellular Carcinoma: Mechanistic Distinction From Adult Hepatocellular Carcinoma. *Pediatr Blood Cancer*. doi: 10.1002/ pbc. 25970
- Riley, T., Sontag, E., Chen, P., Levine, A. (2008). Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 402–412
- Ruppert, J. M., Vogelstein, B., Kinzler, K. W. (1991). The zinc finger protein GLI transforms primary cells in cooperation with adenovirus E1A. *Mol. Cell. Biol.* 11, 1724-1728



- Schoenberg Fejzo, M., Slamon, DJ. (2001). Frozen tumor tissue microarray technology for analysis of tumor RNA, DNA, and proteins. *Am J Pathol* 159 (5): 1645–50
- Sherman, M. (2010). Hepatocellular carcinoma: epidemiology, surveillance, and diagnosis. *Semin Liver Dis.* 30(1):3-16.
- Sirica, A. E. (2005). Cholangiocarcinoma: molecular targeting strategies for chemoprevention and therapy. *Hepatology.* 41(1):5-15
- Spangrude, G. J., Heimfeld, S., Weissman, I. L. (1988). Purification and Characterization of Mouse Hematopoietic Stem Cells. *Science.* 241, 58–62
- Staal, S. P. (1987). Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci.* 84:5034–7
- Stäubli, W., Hess, R. ja Weibel, E. R. (1969). Correlated morphometric and biochemical studies on the liver cell. II. Effects of phenobarbital on rat hepatocytes. *J Cell Biol.* 42: 92-112
- Surget, S., Khoury, M. P., Bourdon, J. C. (2013). Uncovering the role of p53 splice variants in human malignancy: a clinical perspective. *Oncotargets Ther.* 7:57-68
- Taipale, J., Cooper, M. K., Maiti, T., Beachy, P. A. (2002). Patched acts catalytically to suppress the activity of Smoothened. *Nature.* 418(6900):892-7
- Taniguchi, C. M. *et al.* (2010). The phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit p85alpha can exert tumor suppressor properties through negative regulation of growth factor signaling. *Cancer Res.* 1;70(13):5305-15
- Terraz, S., Becker, C. (2005). Cholangiocellular Carcinoma. Focal Liver Lesions Medical Radiology. Part 5. 219-238
- Valenti, L. *et al.* (2013). Hepatic Notch Signaling Correlates With Insulin Resistance and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Diabetes.* 2013 Dec; 62(12): 4052–4062
- Van Camp, J. K., Beckers, S., Zegers D., Van Hul, W. (2013). Wnt Signaling and the Control of Human Stem Cell Fate. *Stem Cell Rev.* 10: 207-229
- Varjosalo, M., Taipale, J. (2008). Hedgehog: functions and mechanisms. *Genes Dev.* 22: 2454-2472

- Verna, L., Whysner, J., Williams, G. M. (1996). N-Nitrosodiethylamine Mechanistic Data and Risk Assessment: Bioactivation, DNA-Adduct Formation, Mutagenicity, and Tumor Initiation. *Pharmacol. Ther.* 71, 57–81
- Villanueva, A. *et al.* (2007). Genomics and signaling pathways in hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis* 27(1):55-76
- Villanueva, A. *et al.* (2012). Notch Signaling is Activated in Human Hepatocellular Carcinoma and Induces Tumor Formation in Mice. *Gastroenterology*. 143(6): 1660–1669
- Wodarz, A., Nusse, R. (1998). Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14, 59–88
- Vogelstein, B., Kinzler, K. W. (1992). p53 function and dysfunction. *Cell*. 70(4):523-6
- Woodward, W. A. *et al.* (2007). WNT/beta-catenin mediates radiation resistance of mouse mammary progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci*. 104(2):618-23
- Xu, H. S., Rosenlof, L. K., Jones, R.S. (1993). Bile secretion and liver regeneration in partially hepatectomized rats. *Annals of surgery*. 218: 176-82
- Xu, L. *et al.* (2015). Genomic analysis of fibrolamellar hepatocellular carcinoma. *Hum Mol Genet*. 24:50–63
- Xu, X. *et al.* (2006). Induction of intrahepatic cholangiocellular carcinoma by liver-specific disruption of Smad4 and Pten in mice. *J Clin Invest*. 116(7):1843–1852. doi:10.1172/JCI27282.
- Yonish-Rouach, E. *et al.* (1991). Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* 352, 345–347

**LISAD**

**Lisa 1. Loomkatsete luba**

 **TARTU ÜLIKOOL**  
ARSTITEADUSKOND

**CERTIFICATE**

**Kristina Mäemets**

has participated in the scientist competence course on

**LABORATORY ANIMAL SCIENCE:  
C-category competence course**

University of Tartu, Estonia

22 January – 8 February, 2007

This course fulfils the European requirements to achieve scientist competence to carry out animal experiments.

The course followed FELASA curriculum and included 50 hours of lectures on basic and applied laboratory animal science, 10 hours of practical work and demonstrations, 10 hours of interactive group work and group presentations and 10 hours of self-guided studying and a written examination.

The course was designed according to European guidelines under the auspices of University of Tartu and the Estonian University of Life Sciences. The course is registered at University of Tartu by code ARFS.01.067.



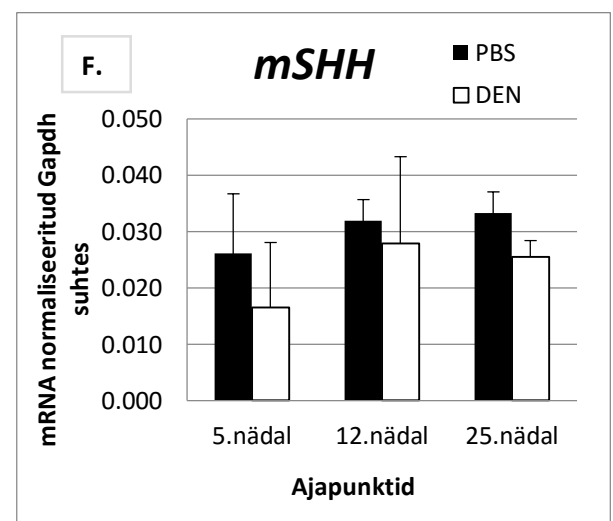
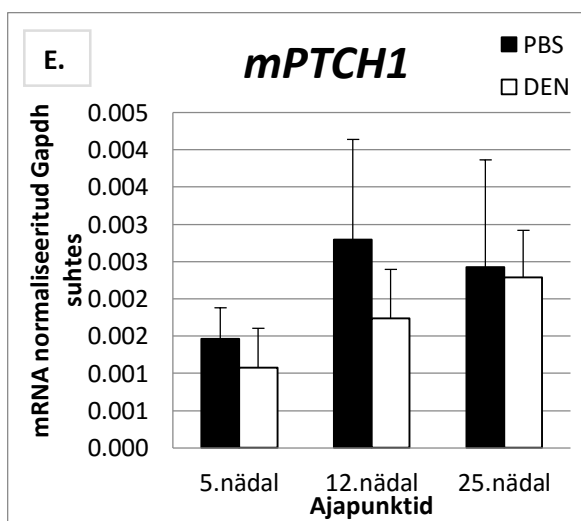
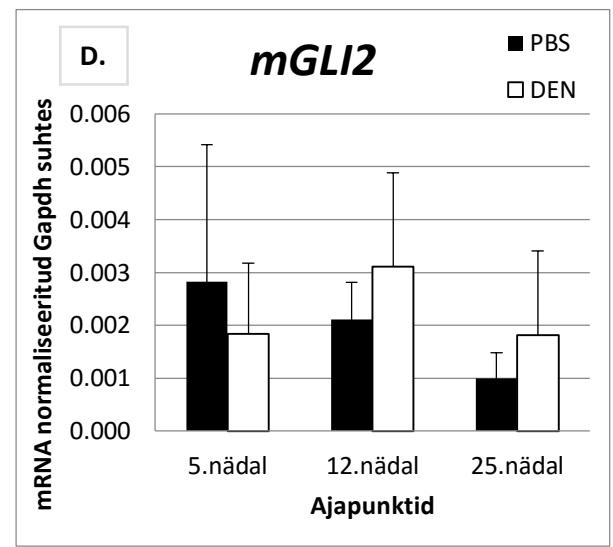
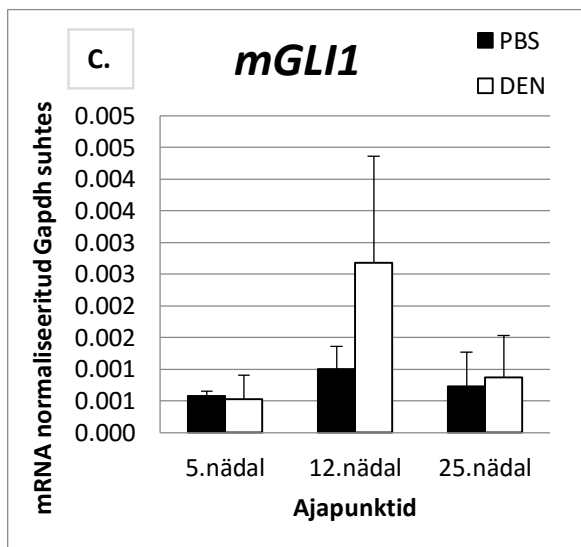
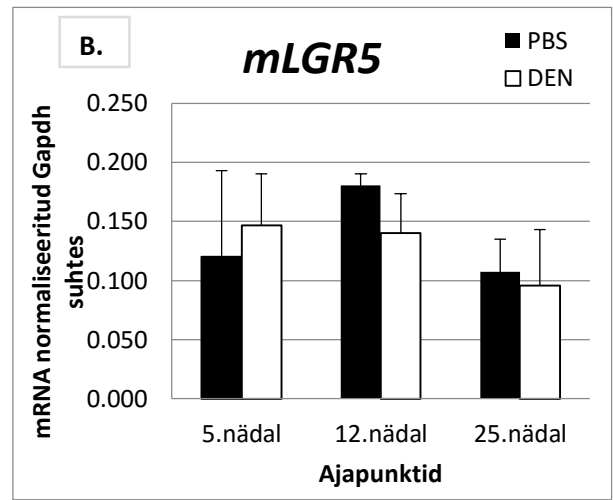
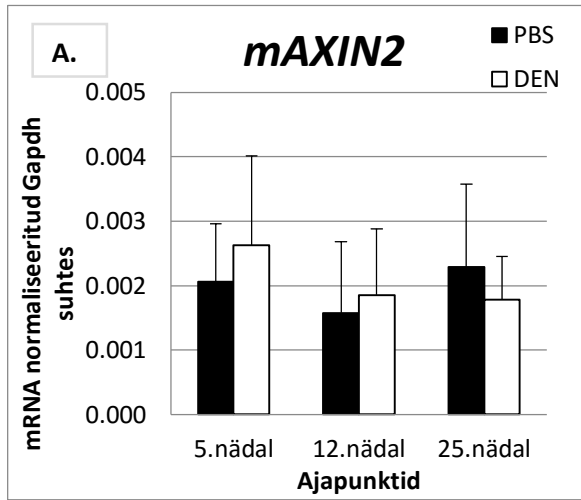
Aavo Lang, MD, PhD  
course organiser

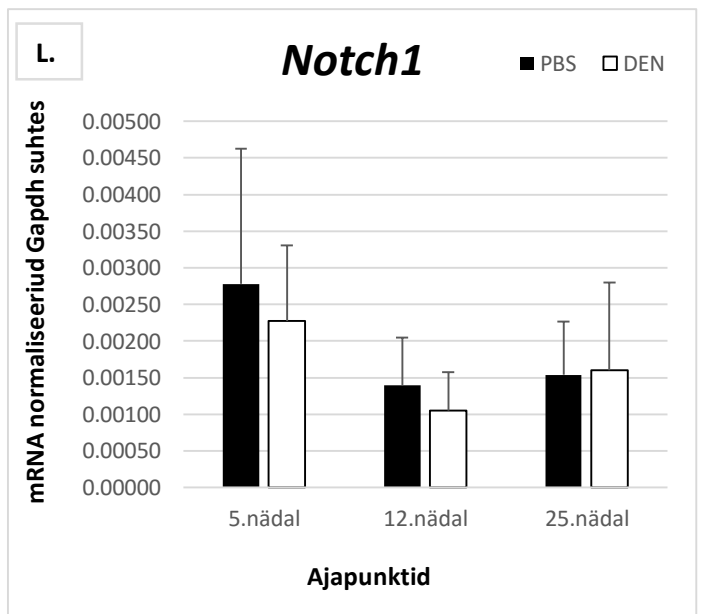
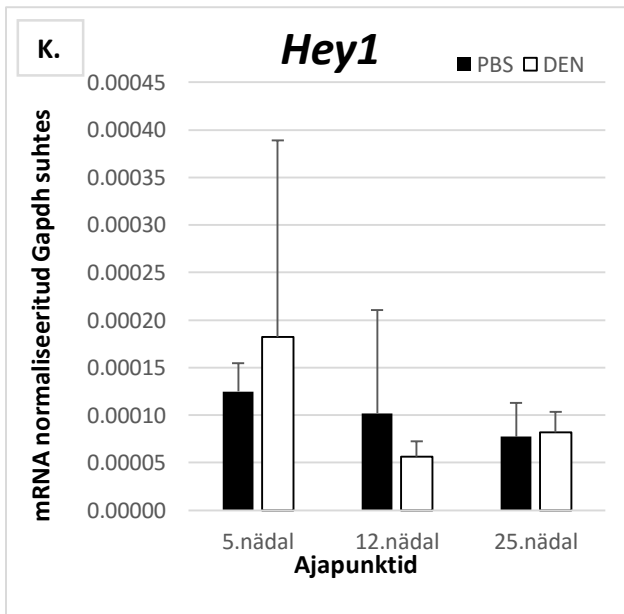
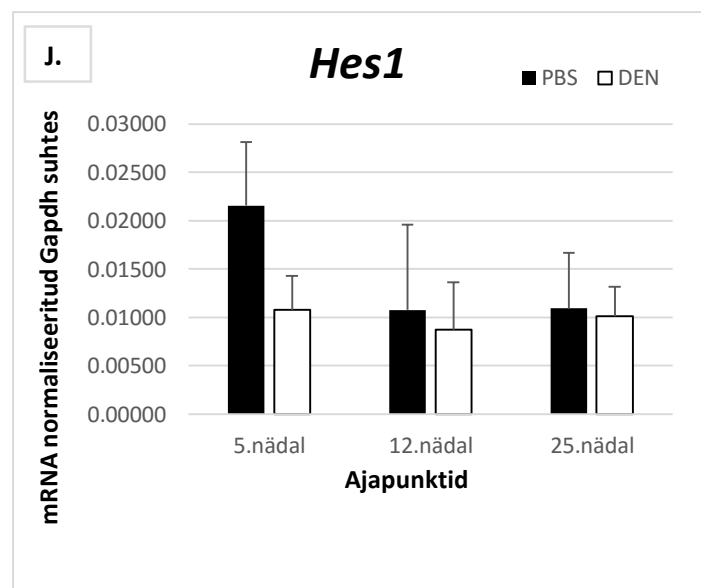
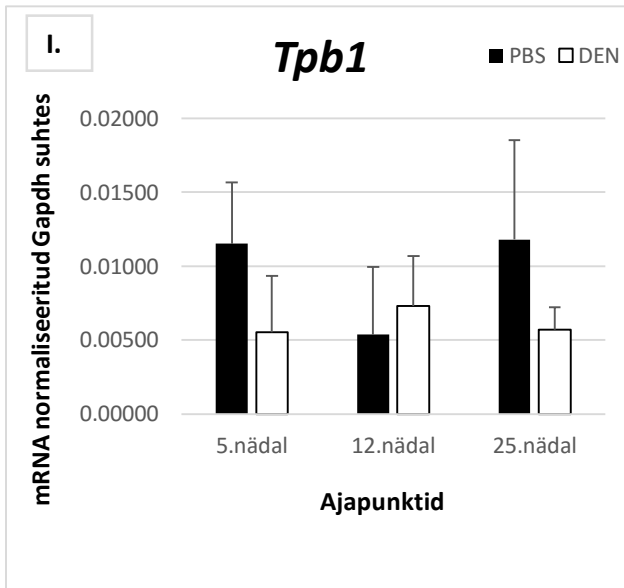
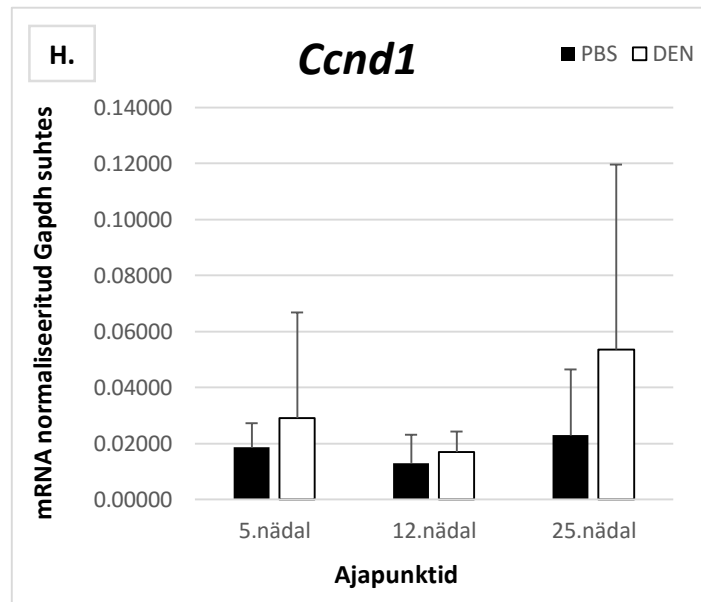
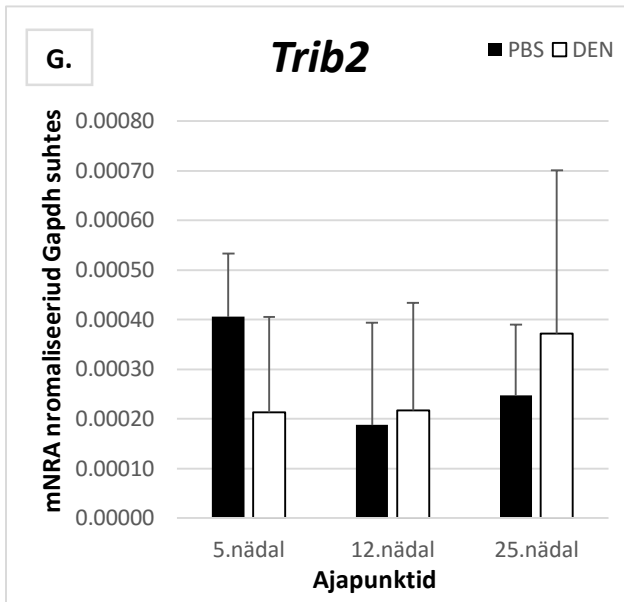
---

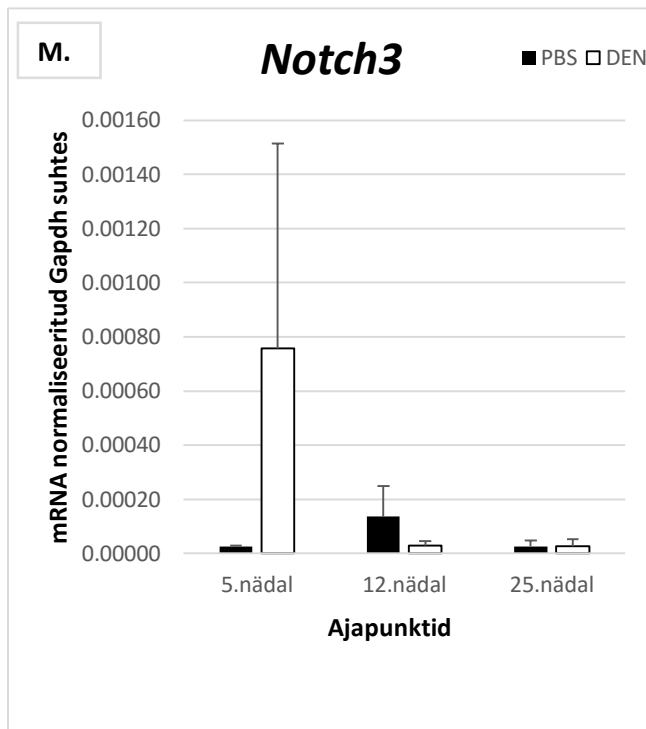
University of Tartu  
FACULTY OF MEDICINE  
Ravila 19, 50411 Tartu  
ESTONIA

tel +372 737 5326  
+372 737 5328  
faks +372 737 5320  
e-post arst@ut.ee  
www.med.ut.ee  
reg kood 74001073

Lisa 2.



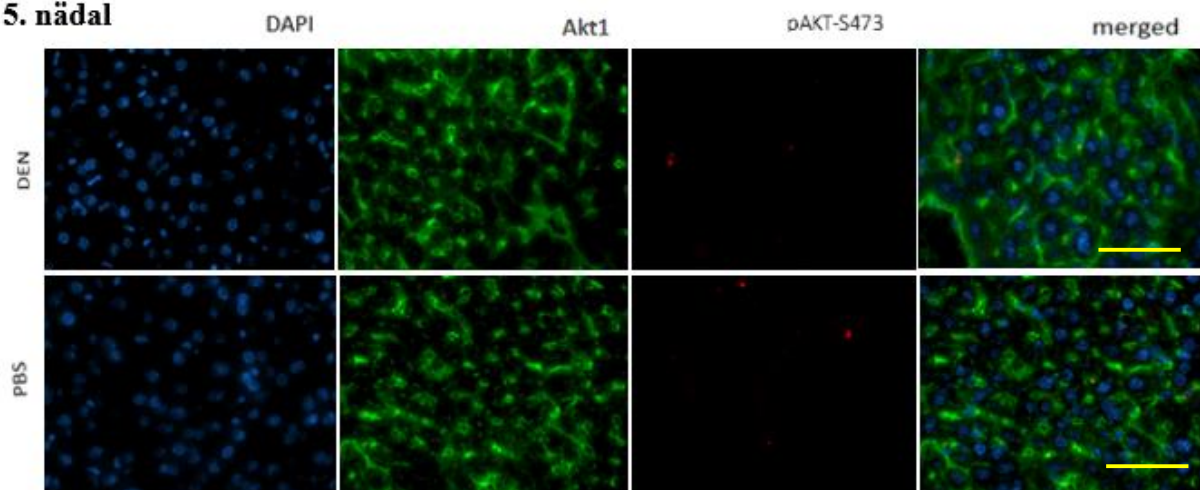




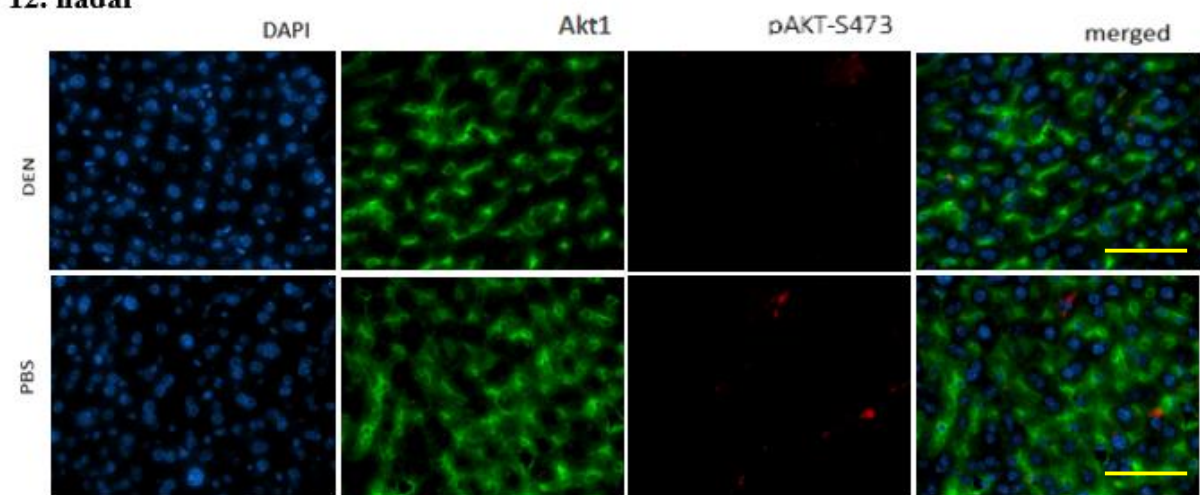
**Joonis 1. mRNA hulk, mis on normaliseeritud referentsgeeni *Gapdh* suhtes.** X-teljel on tootud uuritud ajapunkt ja Y-teljel normaliseerimiseks kasutatud referentstüvi. Graafikutel on katsete keskmised tulemused koos standardveaga.

### Lisa 3.

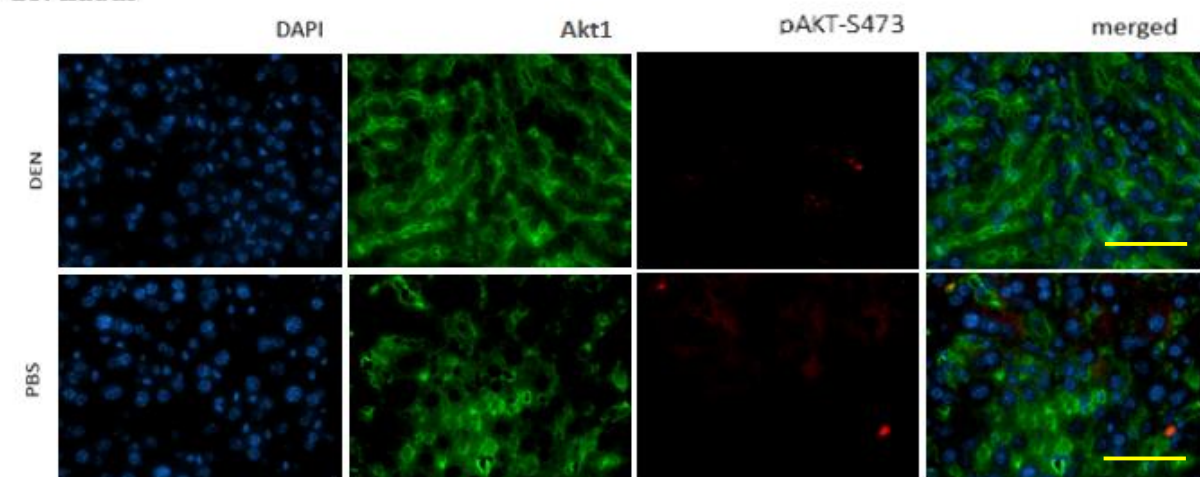
#### 5. nädal



#### 12. nädal



#### 25. nädal



Joonis 2. pAKT-S473 ja AKT1 valgu ekspressioon DEN-kahjustusega ja kontrollmaksas.

AKT1 valk on aktiveeritud rakumembraanis, fosforüleerimissaidi S473 aktivatsiooni ei saa täheldada.

## **LIHTLITSENTS**

### **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, Anett-Hildegard Laarmann (26.05.1994)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Kasvajaspetsiifiliste signaaliradade iseloomustamine DEN indutseeritud maksakasvaja mudelis“, mille juhendajad on Kristina Mäemets-Allas ja Viljar Jaks

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

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

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

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

Tartus, 22.08.2016