

Teaduspreemia keemia ja molekulaarbioloogia alal tööde tsükli „Kudede regeneratsioon ja rakuväline maatriks“ eest.

Viljar Jaks



Foto: Birgit Püvi

KUDEDE REGENERATSIOON JA RAKUVÄLINE MAATRIKS

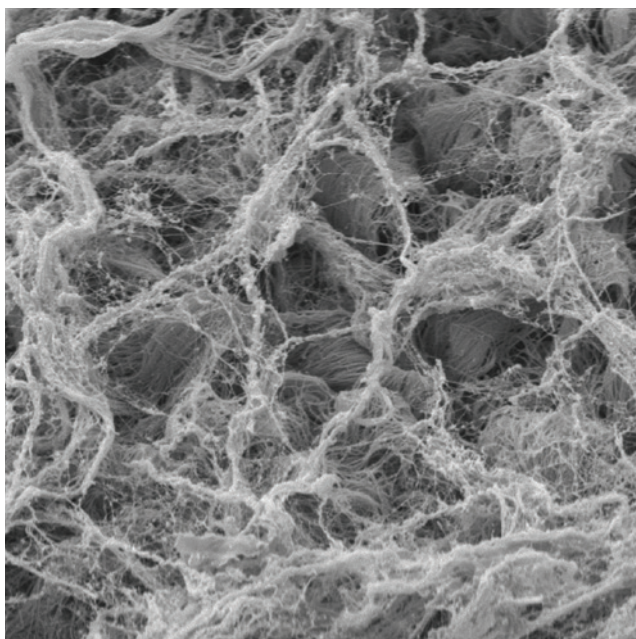
Kujutlege, et te olete rakk. Lihtsalt rakk, üks 3,5 miljardist, kes osaleb organismi talitlemises. Meie organism meenutab arvulises mõttes Maal elavat inimühikonda, kas pole? Sellega sarnasused ei piirdu. Rakkudel ja inimestel on palju ühist. Nad sünnivad, küpsevad, omandades oskused oma edasiste ülesannete täitmiseks, töötavad päeval ja ööl palehigis, et hoida organismi korralikult talitlemas ning lõpuks surevad. Nende maised jäänused pakitakse kaunilt ning suunatakse selleks ettenähtud rakkudes olevatesse ümbertöötlemisjaamadesse, et anda ainest uute rakkude tekkeks. Vahel juhtub ka nii, et välismõjud tekitavad lokaalselt suuremaid ja väiksemaid kahjustusi, organismi tungib mõni väline pahalane või kahjustav aine, kes põhjustab kahju, või tekib algul väikestest talitlushäiretest suurem süsteemne haigus. Kõik need olukorrad meenutavad sõda ja võivad halvemal juhul viia kogu organismi hukkumiseni. Tundub tuttav, eks? Seisab ju ka inimkond aeg-ajalt üsna hukkumise veerel, senini ikka enda ahnuse, rumaluse ja võimujanu tõttu. Tundub, et varsti on kätte jõudmas üks sellistest otsustavatest hetkedest, kus selgub, kas suudame organismina ellu jääda, jätkame raske invaliidina või pühime iseend sootuks maamunalt. Hoiaime põialt, et selge mõistus võidaks.

Aga rakkude juurde tagasi. Sarnasused inimühikonnaga ei piirdu makrotasandiga. Kui minna indiviidi tasemele, siis igal rakul on hubane elamine, mis tagab talle kõik vajaliku igapäevaseks eluks ja tööks. Suurem osa keharakkudest erineb inimestest selle poolest, et nad on üsna paiksed – töötavad nii-öelda kodust. Aga leidub piisavalt ka rakke, mis rändavad kogu oma elu. Suur osa neist on rakud, mis tegelevad transporttöödega, nagu erütrotsüüdid – punaverelibled, mis transpordivad nii vajalikku hapnikku kopsudest teiste rakkudeni. Õieti ei ole need päris rakud, kuna ei sisalda rakutuuma, vaid pigem nutikad pakirobotid, mis võtavad kopsudes kauba – hapniku – peale ning annavad selle ära seal kus vaja – energianäljas paiksetele rakkudele. Sarnased, palju väiksemad, kuid ehk isegi nutikamad pakirobotid on vereliistakud ehk trombotsüüdid. Need kannavad endas rohkelt erinevaid signaalmolekule ning erinevaid valke, mida vabastatakse samuti vajaduse järgi erinevates olukordades, näiteks koekahjustuste – haavade – tekkimisel ja paranemisel.

Teine suurem kategooria rändrakke on politsei ülesandeid täitvad immuunsüsteemi rakud. Osa neist, peamiselt erinevad lümfotsüüdid, mida võib võrrelda politseijõududega, ringleb veres pidevalt, olles valmis vajadusel veresoonest

väljuma ning pahategija isoleerima ja kahjutuks tegema. Osa immuunrakkudest on aga püsivalt vaikselt kudedes, jälgivad olukorda nagu salaagendid ning kahtlase objekti leidmisel siirduvad lähimasse politseijaoskonda – lümfisõlme – oma leidu näitama, et vajadusel kutsuda kohale abiväge sissetungijaga võitlemiseks. Nagu näeme, on tagatud nii varustamine kõige vajalikuga kui ka turvatunne. Just selliseid salamisi toimetavaid immuunrakke – makrofaage – leidsime maksa-koes, mis maksakahjustuse paranemise ajal osalevad muuhulgas rakuvälise aine, millest kohe juttu tuleb, kohandamisel just selliseks, mis toetab maksa taastumist (Klaas jt, 2020).

Igal mitterändaval rakul on oma kodu, mida võib väga hästi võrrelda meie elamisega. Kui vaadelda histoloogilist lõiku (ehk lõiku mis tahes koest – toim) mikroskoobiga, siis tundub, et rakud elavad üsna külge külje kõrval, nii et pigem meenutab raku elamine kitsukest korterit. Struktuuri, mis annab kudedele kuju ning mehhaanilise tugevuse, nimetatakse rakuväliseks aineks ehk rakuväliseks (ekstratsellulaarseks) maatriksiks. Sellel on tugevad, kuid elastsed „seinad“, mis on ehitatud struktuursetest valkudest nagu kollageenid (joonis 1). Samas on rakuvälises maatriksis rohkesti ka mittevalgulisi aineid, proteoglykaane,



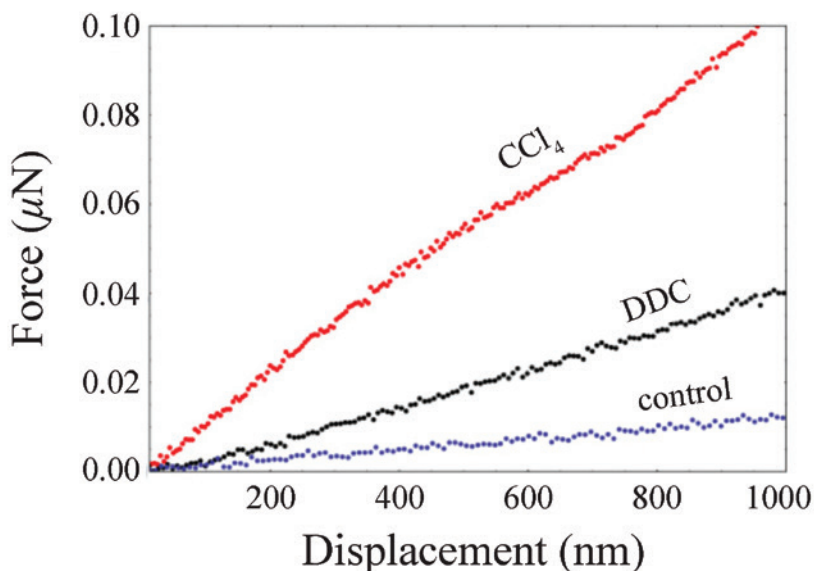
Joonis 1. Hiire maksa normaalne rakuvälise maatriksi. Maksarakud on eemaldatud ning skaneeriva elektronmikroskoobi pildil on näha maksa ekstratsellulaarse maatriksi struktuur, mille moodustavad peamiselt kollageenkiud. Näha on ka rakkude „pesad“ – tühemikud, mille on jätanud eemaldatud maksarakud. Autorid T. Kangur ja M. Järvekülg.

mis annavad sellele vett siduvad, pehmendavad omadused. Tänapäeval ehk isegi liiga populaarsetes täitesüstides kasutatav hüaluroonhape on naha rakuvälise maatriksi oluline mittevalguline vettsiduv komponent. Rakuvälise maatriksi sisaldab ka selliseid valke, mis annavad teada nii kohaliku koepiirkonna kui ka kogu organismi seisundist, vahendades ja moduleerides kas lähemalt või kaugemalt tulevaid signaale. Harilikult ei osale need kandvate struktuuride („seinte ja vahelagede“) moodustamisel. Seetõttu nimetatakse selliseid valgulisi rakuvälise maatriksi komponente mittestruktureteks. Ehituslikul tasandil oleks selliste valkude analoogiks näiteks tapeet või isegi mööbel, aga sel juhul oleks see nutikas sisustus, mis elastsust, värvi ja mustrit muutes oskab elanikule

edastada väljastpoolt tulevat infot. Umbes nii, et diivan muutub mõnusast pehmest mööbliesemest kõvaks lavatsiks, andes märku vajadusest püsti tõusta ja intensiivsemalt tööle hakata.

Nii meie kui ka teised oleme näidanud, et kahjustatud maksakoe paranemise ajal muutub maksa maatriks jäigemaks tänu kindlatele muutustele selle valgulises koostises (Klaas jt, 2016) (joonis 2). Sõna „maatriks“ on raku ümbritseva keskkonna kohta üsna kohane, sest nagu kuulsas filmiseerias „The Matrix“ juhib raku elutegevust valdavalt see informatsioon, mis saabub temani maatriksi vahendusel. Näiteks on teada, et kasvufaktorite ja teiste signaalmolekulide toime elavas organismis on sellest, millised maatriksi komponendid ja mil moel neid rakkudele esitlevad. Erinevalt petturlikust tehismaatriksist filmis töötab päris maatriks ainult selle nimel, et anda rakule võimalikult adekvaatset infot väljaspool toimuvast, tagades nõnda, et rakk teeb just seda, mida ühes või teises olukorras kõige rohkem vaja on.

Seega avaldab rakuväline maatriks väga suurt mõju rakkude käitumisele. Heaks näiteks on eriline struktuur – tüvirakunišš –, mis säilitab seal olevad rakud „igavesti noorena“. Igavesti tähendab siin: kohaliku mikrokosmose ehk organismi



Joonis 2. Hiire maksa maatriks muutub kahjustuse korral tunduvalt jäigemaks. Nii-nimetatud atomaarsete jõudude mikroskoopia (*atomic force microscopy*) mõõdab mikrokiu nihet (*displacement*), mida tekitab kindel jõud (*force*). Mida vähem nihet tekitab sama tugev jõud, seda jäigem on objekt ning graafik tõuseb järsemalt. CCL4 ja DDC tähistavad erinevaid maksakahjustuse viise. Autorid M. Antsov ja M. Järvekülg.

eksistentsi lõpuni. Tüvirakunišš asub toitainetega hästi varustatud piirkonnas veresoonte lähedal. Selle moodustavad erilised saaterakud ning erilise koostisega rakuväline maatriks. Selles asuvad rakud säilitavad oma väheküpsenud („noore“) välimuse ja jagunemisvõime kogu organismi eluea vältel, taastades nii oma töö teinud ning surnud rakkudest jäänud tühemikke ja tagades organismi elujõulisuse pikkade aastate vältel. Samuti osalevad need rakud pärast kahjustuste elimineerimist organismi ülesehituses, produtseerides aktiivselt uusi rakke ja taastades kahjustatud kudede teovõime. Tüvirakunišše on leitud erinevatest kudedest. Kõikjal funktsioneerivad need üsna sarnaselt. Vähemalt vereloome tüvirakkude korral on selgelt näidatud, et kontakti kaotamine tüvirakuniši imelise mikrokeskkonnaga tõukab rakud pöördumatult kiirema jagunemise ja paralleelselt ka edasise küpsemise ning vananemise teele. See tekitab tahtmatult paralleele Eedeni aiaga, millest väljaajamise tulemuseks oli inimsoo surelikkus ning vajadus palehigis oma igapäevast leiba teenida, aga ka võime saada lapsi.

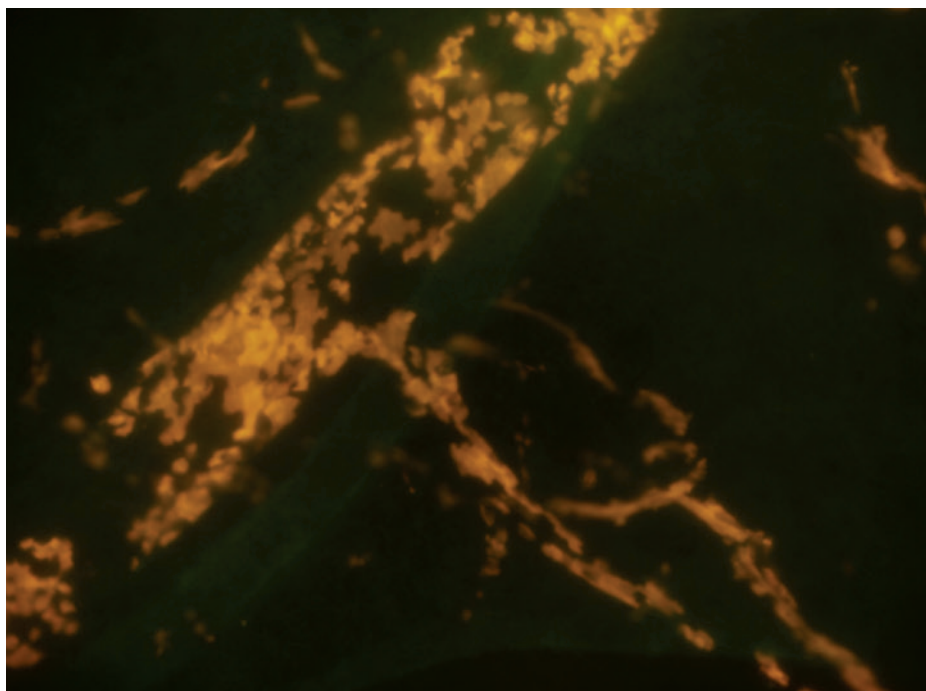
Kui kudet kahjustada, siis muutub rakuväline maatriks kardinaalselt. Kahjustuse paranemise käigus moodustub esmane maatriks, mis osalt tuuakse kohale vereliistakute poolt ja osaliselt sünteesitakse allesjäänud sidekoerakkude poolt. Edasisel paranemisel asendatakse see teisese maatriksiga, mille küpsemisel moodustub tihke struktuur – armkude, mis suures osas koosnebki just maatriksist ning vähemal määral sidekoerakkudest. Iseloomulik on, et arengu käigus hoolikalt üles ehitatud struktuurid kahjustuse paranemise käigus ei taastu ja tekkinud armid jäävad meid saatma kogu elu. Vaid väga üksikud hulkraksed organismid – heaks näiteks on siin Mehhiko sabakonnaline aksolotl – suudavad täielikult taastada oma kahjustatud organeid. Ka nendes protsessides osaleb aktiivselt ekstratsellulaarne maatriks, kuid see on hoopis teine lugu.

Tulles tagasi põhiteema juurde, siis mind on rakkude ja hiljem ka kudede taastumisvõime huvitanud alates minu teadlaskarjääri algusest, kui ma 1994. aasta oktoobris astusin üle professor Toivo Maimetsa labori läve Tartus Riia tänav 23 asuvas Tartu ülikooli molekulaar- ja rakubioloogia instituudis. Tollal huvitas teadlaskonda pigem see, kuidas rakusisesed mehhanismid reguleerivad rakkude jagunemist, jagunemise seiskumist ning rakusurma ja seda eelkõige meie aja suure katku – vähktõve – võtmes.

Esimest korda puutusin normaalsete rakkude ja nende jagunemist puudutavate küsimustega kokku Rootsis Karolinska instituudis, kus ma professor Rune Toftgårdi grupis asusin uurima naha tüvirakke. Just siis kogesin fenomeni, kus rakkude käitumine olenes nende asukohast organis. Nägime, et karvanääpsu tüvirakkude jagunemisvõime olenes sellest, missuguses karvanääpsu struktuuris nad asuvad. Meie leid, et ka kiiremini jagunevad tüvirakud on samaväärsed tüvirakunišis asuvate väga aeglaselt jagunevate tüvirakkudega, oli tol ajal üsna sensatsiooniline (Jaks jt, 2008).

Ekstratsellulaarsele maatriksile hakkasime rohkem tähelepanu pöörama pärast Eestisse naasmist tehtud keerulisi, kuid edutuid katseid leidmaks maksa tüvirakke. Nagu meie ja paralleelselt ka teiste gruppide tööst ilmnes, ei olegi maksas selliseid tüvirakke nagu paljudes teistes organites. Selle asemel, et väike, multipotentne (mitmeid rakutüüpe moodustada suutev) tüvirakupopulatsioon aktiveerub ja moodustab eri tüüpe rakke, funktsioneerivad maksa küpsed rakud ise nagu tüvirakud. Nad on suutelised oma küpsusastet veidi vähendama ja vajadusel omandama jagunemisvõime, taastades üsna kiiresti maksa massi. Seda oli ju ka varem arvatud, aga nüüd sai see keeruliste geneetiliselt modifitseeritud hiiri ja erinevaid kuvamismeetodeid kasutades ka puust ja punaselt ette näidatud (Viil jt, 2017) (joonis 3).

Huvitaval kombel on maksa hämmastavat taastumisvõimet kirjeldatud juba eelajaloolises legendis aheldatud Prometheusest, kelle maks „kasvas tagasi“ igal ööl pärast seda, kui suur kotkas oli seda päeval nokkimas käinud. Kuidas vanad kreeklased sellised teadmised omandasid, pole senini lõplikult selge. Arvata võib, et nende teadmised meditsiinist ja keha funktsioneerimisest olid palju põhjalikumad, kui me arvame. Seda titaani on siinkohal kindlasti paslik meenutada.



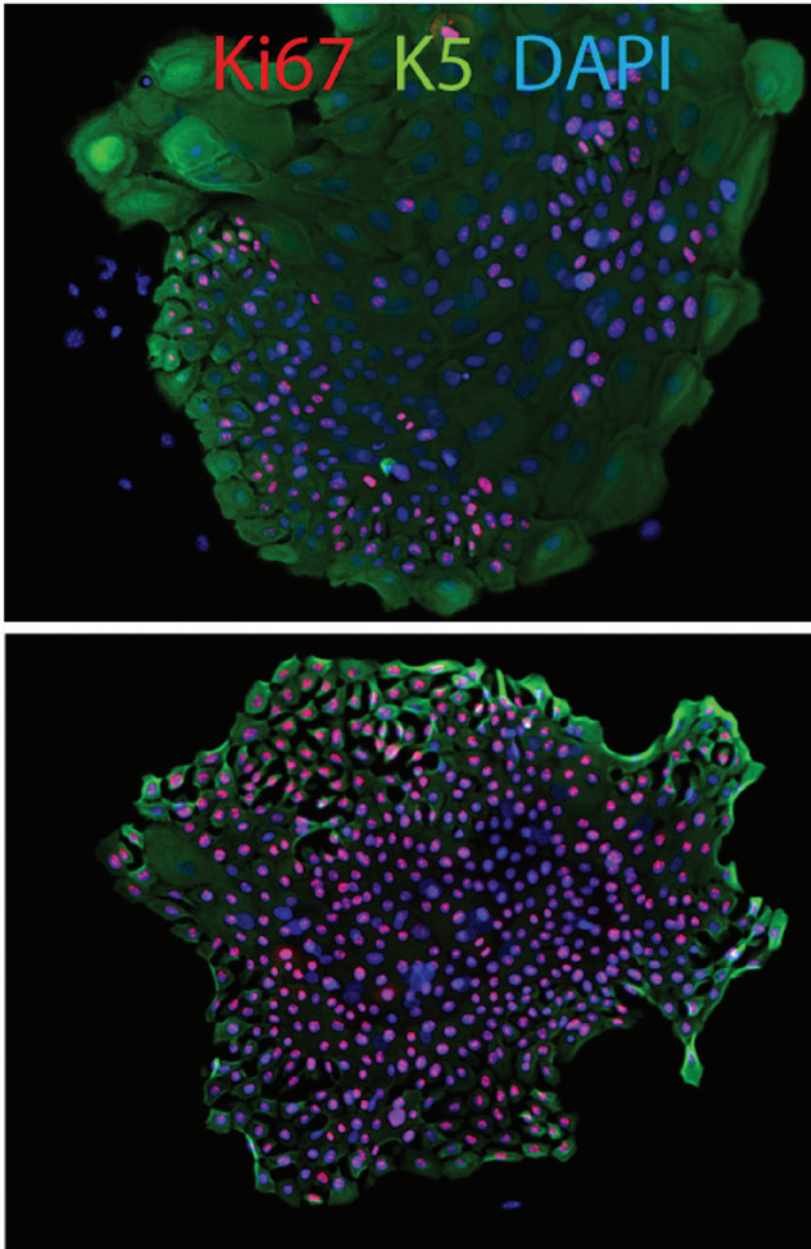
Joonis 3. Hiire maksas moodustavad sapiteede rakud ainult uusi sapiteede rakke ega panusta teiste rakutüüpide moodustamisele. Transgeense hiire maksas on märgitud punase helendava valguga väike osa rakke ning jälgitud nende järglaskonda, mis on samuti märgitud sama valguga. On näha, et järglased moodustavad vaid uusi sapiteid. Autor J. Viil.

Just tema on teadlastele omistatud uuendus- ja mässumeelsuse võrdkuju ning oma armastusega väetite külmetavate inimeste vastu vast ka esimene humanist. Tõi ta ju inimestele tule nii füüsilises kui ka vaimses mõttes. Väidetavasti on inimsugu just temalt saanud otsiva vaimu, püüde tegelda teaduse ja tehnoloogia arendamisega ning, mis seal salata, mõned ka sügava vastumeelsuse juhmi ja silmakirjaliku autoritaarsuse vastu.

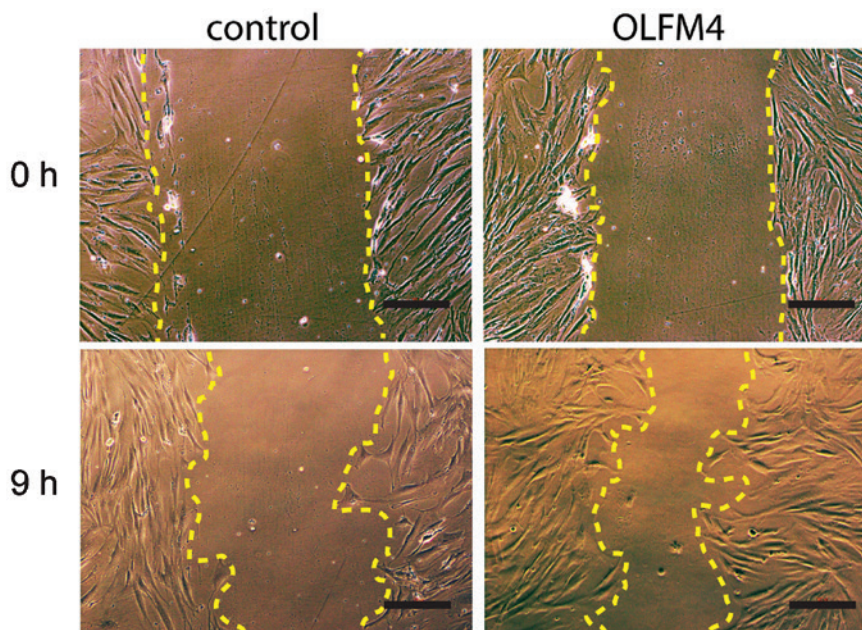
Kuna maksas on peale rakkude rohkelt rakuvälisest maatriksist, mida on suhteliselt kerge eraldada, siis pöörasime oma tähelepanu sellele. Küsisime lihtsalt, missugused muutused toimuvad kahjustatud maksa rakuvälises maatriksis. Eraldasime normaalsest ja kahjustatud hiiremaksast ainult rakuvälise maatriksi – geelja meduusaolise hõljuva olluse. Rakud viskasime piltlikult öeldes minema ning viisime meduusi vesilahusesse. Kõlab lihtsalt, aga selleks, et tõesti kogu rakuvälisest maatriksist ära lahustada, pidime ära proovima üsna mitu erinevat meetodit.

Järgnevalt analüüsisime saadud lahust, kasutades proteoomikat. Kõlab sarnaselt genoomikaga ja töötab selles mõttes samamoodi, et saame analüüsida korraka kõiki valke, mis lahuses leiduvad. Kasutades keerulisi masinaid – massispektromeetreid, mis määravad lahuses olevate valgufragmentide molekulmassi ja muid parameetreid –, saame valgufragmentide mustrite analüüsil teada, missugused valgud ja mis koguses antud lahuses leidusid. See omakorda lubab meil analüüsida valkude sisalduse erinevusi proovide vahel. Kahjustatud ja normaalse maksa rakuvälisest maatriksist vahelisi erinevusi oli mitmeid. Suurem osa nende valkude ülesannetest oli juba varem kirjeldatud ja seetõttu meile erilist huvi ei pakkunud. Tähelepanu kõitsid hoopis kaks mittestruktuurset valku, millest varem oli väga vähe teada. Nendeks olid olfaktomeediin 4 (OLFM4) ja trombospondiin 4 (THBS4) (Klaas jt, 2016). Esimene olfaktomeidiinide valguperekonna liige avastati härgkonna haistmisepiteelist, millele viitab ka valgu nimi. Selles perekonnas on liikmeid rohkem, kuid keskendugem edaspidi OLFM4-le.

Oli teada, et imetajates leidub OLFM4 mitmetes kudedes, nagu näiteks maos, peensooles, jämesooles ning eesnäärmes. Üsna rohkelt leidub OLFM4 just soole tüvirakunišis, mis asub soolekrüptide põhjas. Lisaks normaalsetele kudedele leidub rohkelt OLFM4 erinevates kasvajates, eriti neis, mis pärinevad sooletraktest. Kuigi selle valgu täpne funktsioon ei olnud üheselt kirjeldatud, oli siiski teada, et OLFM4 omab rolli rakkude kontaktides ekstratsellulaarse maatriksiga, reguleerides nende liikumist (migratsiooni) mööda rakuväliseid struktuure. Seetõttu oli üsna loogiline küsida, kas OLFM4 mõjutab normaalsete maksa- ja naharakkude käitumist. Tõesti, OLFM4-ga rikastatud sõõde stimuleeris maksarakkude ning naha keratinotsüütide (naha pindmise kihi rakud, mis annavad nahale selle kaitsefunktsiooni) jagunemist rakukultuuris (Klaas jt, 2022) (joonis 4). Huvitaval kombel ei mõjutanud see aga naha teise tähtsa rakutüübi – sidekoe-rakkude ehk fibroblastide – jagunemise kiirust.



Joonis 4. Inimese normaalsed keratinotsüüdid kasvasid kas standardses söötmes (ülemine paneel) või OLFM4-ga rikastatud söötmes (alumine paneel). OLFM4 rikkas keskkonnas oli kolooniates palju rohkem jagunevaid rakke, mida näitab Ki67 markeri positiivsus (punased rakutuomad). Lisaks on OLFM4 juuresolekul kasvanud rakud väiksemad ja tihedamalt pakitud, meenutades rohkem tüvirakke. Normaalses söötmes kasvanud rakud vananevad, muutudes suuremaks ning rohkem positiivseks keratinotsüütide küpsemismakeri K5 (keratiin 5 – roheline) suhtes. Sinine värv märgib rakutuumi. Autorid K. Mäemets-Allas ja M. Klaas.



Joonis 5. Nahast eraldatud sidekoerakud – fibroblastid – liiguvad OLFM4 juuresolekul palju kiiremini. Ajahetkel 0 tekitati rakukultuuridesse ühesuguse laiusega defektid – „haavad“ (ülemised paneelid). Üheksa tunni pärast (9 h, alumised paneelid) olid OLFM4 poolt stimuleeritud rakud liikunud umbes 1,5 korda kaugemale kui kontrolltingimustel kasvatatud rakud (*control*). Autorid K. Mäemets-Allas ja M. Klaas.

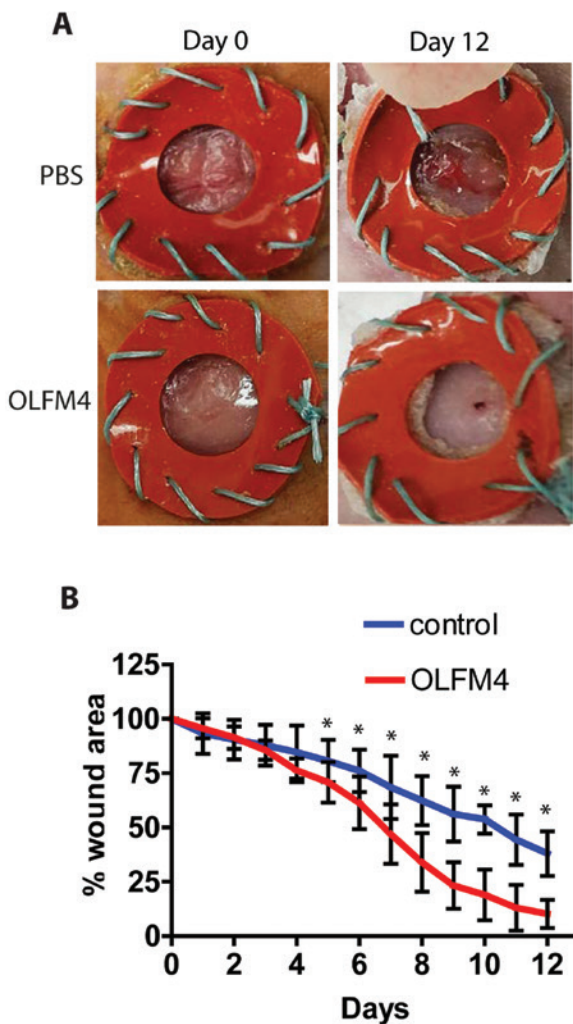
Kahjustuste paranemisel on oluline rakkude koordineeritud liikumine kahjustatud kohta. Seetõttu mõõtsime OLFM4 võimet reguleerida rakkude migratsiooni. Selleks kasvasime rakud kultuuris üsna tihedaks ning tekitasime rakkude kihti kahjustuse – eemaldasime rakud kultuuri keskosast kindla laiusega ribalt. Kui mõõtsime aega, mille jooksul rakud täitsid tekkinud kunstliku koedefekti, siis leidsime, et OLFM4 lisamine stimuleeris mõlema naha rakulise komponendi liikumiskiirust umbes 1,5 korda (joonis 5). Sama tulemuse saime, kui kasutasime hoopis keerukamat katsesüsteemi, kus naha sidekoerakud pidid läbi pugema juba kolmemõõtmelisest kunstlikust rakuvälisest maatriksist.

Tegelikult on sellised kultuuris läbi viidavad katsed üsna kunstlikud ja päris kindlasti ei käitu rakud alati organismis sarnaselt sellega, kuidas nad käituvad kultuuris. On ju talitlevas koos meeletult palju rohkem erinevaid rakkude käitumist suunavaid stiimuleid kui üsna lihtsakoelises rakukultuuris. Seetõttu otsustasime testida OLFM4 võimeid päris haava parandamisel. Selleks kasutasime normaalseid laborihiiri, kelle seljale tekitasime 6 mm läbimõõduga ümmargused haavad. Loomade, kaasa arvatud meie halli majakaaslase nahas on eriline lihaskiht, mis inimese nahas puudub. Seal asuvad lihaskiud tõmbuvad haava tekkides kokku, vähendades sellega haava läbimõõtu ja kiirendades

paranemist. Inimese nahas selline tore funktsioon puudub. Kuna hiire haavad paranevad väga kiirelt, siis selleks, et paremini jälgida, kuidas paranemine toimub, ning muuta hiire haava paranemine veidigi sarnasemaks inimese naha paranemisega, kleepisime hiire nahahaavade äärde plastirõngad, mis takistasid haavade kokkutõmbumist. Nüüd mitte enam väga üllatuslik, kuid seda rõõmsustavam oli tõdemus, et OLFM4 suudab niigi kiiret hiire nahahaava paranemist veelgi kiirendada (joonis 6).

Uurisime ka histoloogilisi preparaate paranevatest inimese nahahaavadest ning nahatükikesi, mis olid saadud selliste levinud nahahaiguste haiguskohtedest nagu psoriaas ja atoopiline dermatiit. Mõlema haiguse korral toimub pideva nahapõletiku tõttu kiirendatud naharakkude jagunemine. Oodatult oli ka kõigis neis OLFM4 tase suurenenud. Seega, kus on naharakkude kiirem jagunemine, seal on ka OLFM4.

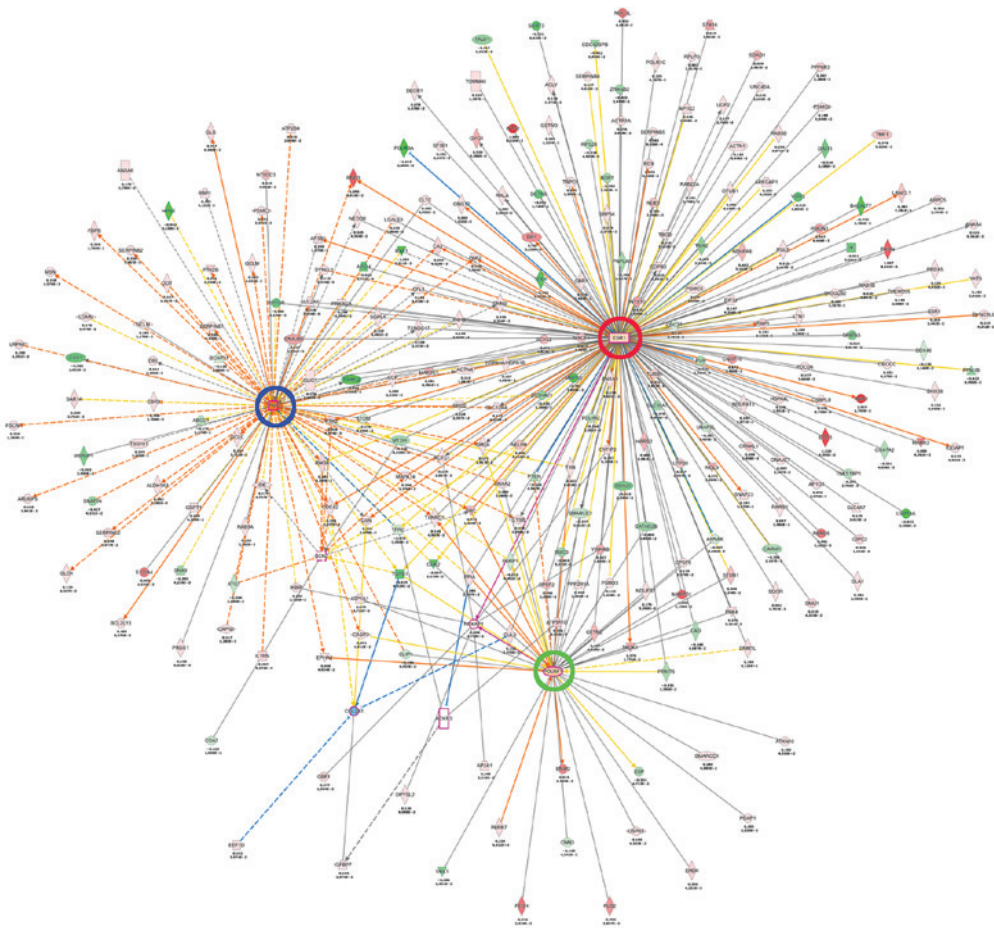
Nüüd järgnes põhiküsimus, kuidas OLFM4 kõike seda ikkagi teeb. On ju rakkudes tuhandeid signaaliradasid, kuid missuguseid neist OLFM4 mõjutab selleks, et kiirendada rakkude jagunemist ja liikumist ning lõpuks ka haavade paranemist? Et seda teada saada, võrdlesime OLFM4 valguga stimuleeritud keratinotsüütide rakusiseste signaaliradade aktiivsust mittestimuleeritud rakkude signaaliradade aktiivsusega. Nii lihtne ja samas nii keeruline. Üks kõige levinumaid viise seda teha on võrrelda erinevate rakkude *messenger*- ehk eesti keeles virgats-RNA-de (mRNA) spektrit. Teiste sõnadega, teha transkriptomikat, nagu me kõnekeeles ütleme. Kui geenid on üles tähendatud DNA-s, mis on oma-



Joonis 6. Katseloomade nahal olevad haavad kasvavad kiiremini kinni, kui lisada OLFM4. **A.** Hiirte seljal olevad silikoonrõngastega laiendatud haavad kasvasid OLFM4 lisamisel täielikult kinni 12 päevaga (alumised paneelid). Ainult puhvri (PBS) kasutamisel haavad kinni ei kasvanud. **B.** Haava pindala vähenemine ajas. Autorid K. Mäemets-Allas ja M. Klaas.

moodi rakkude valkudest kokkupaneku ja käimashoidmise juhend, siis selleks, et juhendis olevaid tegevusi ellu viia, peab esiteks DNA järjestuse järgi valmis meisterdama mRNA. Selles sisaldub info vaid ühe kindla valgulise rakukomponendi kohta, mille järgi ribosoomid, väikesed valgusünteesimasinad panevad kokku just antud hetkel vajaliku valgu, mis pärast valmimist siirdub oma ülesandeid täitma.

Sageli on teatud kindla mRNA taseme muutus vastavuses temale vastava valgu tasemega ja peegeldab selle signaaliraja või rakufunktsiooni aktiivsust. Aga mitte alati. Mõnede oluliste valkude taset reguleeritakse selle mRNA tasemest sõltumatult ja seetõttu on alati kasulik määrata ka vastava valgu tase. Veel parem



Joonis 7. Näide erinevate -oomikate, antud juhul transkript- ja proteoomika kombinatsioonanalüüsil välja selgitatud signaalivõrgustikest. OLFM4-ga stimuleeritud kultuuris kasvatatud inimese keratinotsüütides on signaalide kesketeks regulaatoriteks TNF α (sinine ring), östrogeeni retseptor 1 (ESR1, punane ring) ning tüviraku faktor POU5F1 (roheline ring). Autor E. Kankuri.

on määrata kõigi rakus olevate valkude tase. Seda teeb juba tuttav proteoomika. Viisime läbi nii transkriptoomika kui ka proteoomika analüüsid. Kasutades keerukaid algoritme ja kolleegide abi Helsingi ülikoolist, saime keerulise kaardi erinevate valkude tasemetega ja nende vaheliste teadaolevate seoste kohta (joonis 7).

Leidsime, et rakuvälise OLFM4 poolt tekitatavaid efekte juhivad naha keratinotsüütides vähemalt rakukultuuri tingimustes kolm peamist lülitit. Need on naissuguhormoonide retseptor 1 (ESR1), põletikku dirigeeriv tuumori nekroosifaktor (TNF) ning tüvirakufunktsioone koordineeriv faktor POUF1. Nende kolme faktori koosmõju tingibki keerukate rakusiseste signaalivõrgustike aktiveerumise, mille mõjul rakkude paljunemine aktiveerub ning need muutuvad palju liikuvamaks – ühesõnaga noorenevad, muutuvad tüvirakkudele sarnasemaks. On ju tüvirakud küpsete rakkude „noored“ ja aktiivsed eellased. Aktiivsust läheb koekahjustusel vaja. Samuti on kasvajad väga aktiivsed ja liiguvad, kahjuks. On teada, et POU5F1 osaleb ka mõnede kasvajarakkude talitlemisel. Kasvajate eripära on selles, et need ei allu organismi käskudele, vaid teevad, mida heaks arvavad, hukutades lõpuks kogu organismi – kui neid otsustavalt välja ei juuri.

Et täpsemalt aru saada ühe või teise rakukomponendi funktsioonidest, on huvitav jälgida, mis juhtub siis, kui selle tootmine välja lülitada või vähemalt alla suruda. Selleks on välja töötatud samuti Nobeli preemia vääriliseks hinnatud RNA interferentsi tehnoloogia.²¹ Põhimõte on sellel üsna lihtne. Kui rakku viia allasurutava valgu mRNA-le seonduv, kuid palju lühem RNA molekul, siis takistab see valgu sünteesi ja selle tase langeb või kaob valk sootuks. Kuna niisugust katset on organismi tingimustes väga raske läbi viia, siis kasutasime immortaliseeritud ehk eriliste tehnikatega lõpmatult kultuuris jagunevaks muudetud inimese keratinotsüütide laadseid rakke. Leidsime oodatult, et juhtub täpselt vastupidine. Kui OLFM4 sünteesi rakkudes alla suruda, siis väheneb nende võime jaguneda ning nad muutuvad tunduvalt aeglasemaks (Cárdenas-León jt, 2022). Ja jälle küsimus: kuidas OLFM4 seda teeb? Missugused signaalirajad neid mõjusid vahendavad?

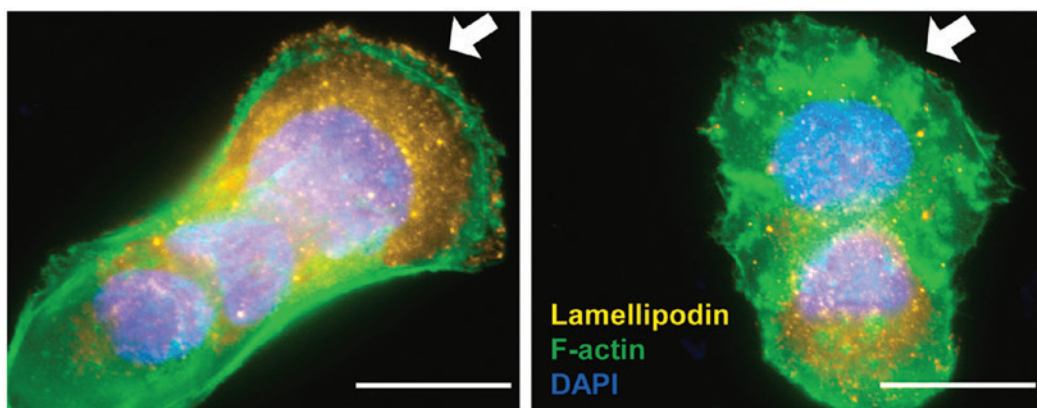
Et neile küsimustele vastata, analüüsisime jälle proteoomika abil rakkudes leiduvate valkude spektrit, kuid nüüd lisasime uue mõõtme, nimelt vaatasime ka seda, kas valkudel on küljes fosfaatrühm. Sellist analüüsi, mis mõõdab paljude eri valkude fosfaatrühmade sisaldust, nimetatakse fosfoproteoomikaks. Suur osa rakusisestest signaale antakse edasi mitte valkude hulga muutuste, vaid nende küljes olevate erinevate modifikatsioonide muutuste kaudu. Fosfaatrühma lisamine või äravõtmine on üks selline modifikatsioon, mida kasutavad väga paljud signaalirajad. Fosfaatrühma olemasolu või puudumine muudab paljude valkude aktiivsust ja muutunud fosfaatrühma sisaldus kindlates radades osaleva-

²¹ Vt selle raamatu kirjutist: Veromann, E. 2024. Innovaatilise RNAi tehnoloogia arendamine ja looduse hüvede rakendamine jätkusuutlikus põllumajanduses, lk 197–204.

tes valkudes võib paljastada selliseid muutusi, mis transkriptoomika ja hariliku proteoomikaga jäävad märkamata.

Kasutades proteoomika ja fosfoproteoomika kombinatsiooni, mille tulemus nägi laias laastus välja samasugune kui joonisel 7, leidsime, et OLFM4 sünteesi allasurumine vähendas valgu CDK7 aktiivsust. CDK7 on üks olulisemaid ja universaalsemaid rakkude jagunemise regulaatoreid. OLFM4 allasurumine vähendas ka valgu nimega GIT1 taset ja aktiivsust. See suur valk on üks niinimetatud tellingvalkudest (*scaffold protein*), mille külge nagu tellingutele koondatakse ühes signaalirajas osalevaid valke selleks, et signaal jõuaks kindlasti ühest olulisest punktist teise ega läheks rakusiseses saginas kaduma. Võite ette kujutada, et GIT1 on nagu roheline Lego alusplaat, millele kinnitatakse üksteise lähedale värvilistest klotsidest ehitatud väga erineva kujuga valke. GIT1 pinnal pannakse kokku just rakkude migratsiooni reguleerimises olulisi signaaliradu. Madala OLFM4 tasemega rakkudes oli selgelt rikutud rakujalakeste ehk lamellipoodide moodustumine (joonis 8). Nagu nimigi ütleb – kui pole lamellipoodide, siis rakk ei liigu või teeb seda väga kohmakalt.

Fibroblastides toimusid samuti OLFM4 toimel muutused, kuid need olid hoopis teistsugused kui keratinotsüütides leitud ja seostusid naha tugistruktuuride formeerumise ning põletiku regulatsiooniga, milles lisaks immuunrakkudele on ka fibroblastidel oluline osa.



Joonis 8. OLFM4 allasurumine vähendab rakujalakeste – lamellipoodide – teket ja rakkude liikumisvõimet. Vasakul pildil on normaalne rakk, mis liigub jõudsalt edasi ning tema eesmise serva lähedal on näha viirgu kollakaid väikesi väljasopistusi – lamellipoodide. Need sisaldavad sobiva nimega valku – lamellipodiini, mida ongi kasutatud nende visualiseerimiseks. Paremalt pildil on rakk, kus OLFM4 on alla surutud ning rakujalakesed praktiliselt puuduvad. Sinised on rakutuomad ja roheline värv näitab, mis osa ruumist rakk enda alla haarab, sest see märgib raku skeleti põhikomponenti F-aktiini. Autor C. G. Cárdenas-León.

Aga THBS4? See rakuvälise maatriksi mittestruktuurne komponent arvatakse samuti mängivat olulist rolli rakkude omavahelistes kontaktides ning raku kontaktides ümbritseva keskkonnaga. Samuti oli varem teada, et THBS4 leidub normaalselt täiskasvanud kudedes üsna vähe, kuid tema tase on kõrge arenevates ja kahjustatud kudedes. Üheks erandiks on närvikude, kus on THBS4 mõõdetavas koguses ka täiskasvanud organismides. Nagu OLFM4, nii leidub ka THBS4 rohkelt kasvajates. Analoogselt OLFM4-ga leidsime, et ka THBS4 tase on tunduvalt tõusnud nahahaavade paranemisel, psoriaasi ja atoopilise dermatiidi kolletes ning et THBS4 stimuleerib nahahaavade paranemist (Klaas jt, 2021a). Kuna THBS4 leidub peamiselt naha sidekoelises osas – dermises –, siis esmalt uurisime selle toimet just selles nahaosas leiduvatele sidekoerakkudele ehk fibroblastidele. Huvitaval kombel suurendas THBS4 nende rakkude liikumiskiirust ligi kaks korda, kuid ei omanud mingit efekti nende jagunemisele. Samas oli keratinotsüütides THBS4 mõju suisa vastupidine – stimuleeris nende jagunemist, kuid mitte nende migratsiooni. Nagu OLFM4 puhul, kasutasime THBS4 poolt mõjutatud rakusiseste radade kaardistamiseks kombinatsiooni proteoomikast ja transkriptoomikast. Leidsime, et tekkinud muutuste keskmes on juba varasemalt tuntud Wnt signaalirada,²² mis koordineerib organite arenguid, juhib koekahjustuse paranemist, hoiab tüvirakkudele iseloomulikke omadusi ja paljusid teisi protsesse mitte ainult imetajate, vaid ka näiteks lüljaljalgsete organismis.

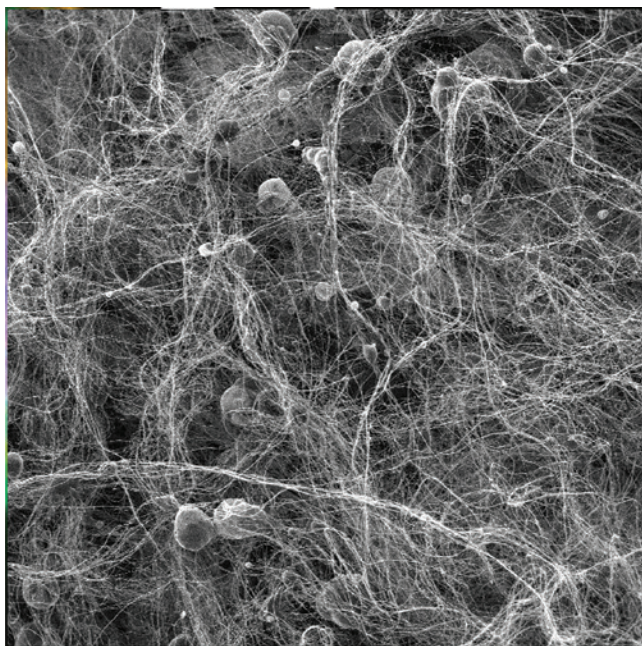
THBS4-ga stimuleeritud keratinotsüütide proteotranskriptoomika analüüs viitas võimalusele, et antud valk võib mängida olulist rolli just atoopilise dermatiidi patogeneesis, kuna mitmeid selle haigusega seotud valke, nagu sügelust tekitav TSLP ning keratinotsüütide küpsemist reguleeriv PPAR γ , on neis rohkem kui stimuleerimata rakkudes (Mäemets-Allas jt, 2023).

Et kogutud teadmised ei jääks riulile tolmu koguma, oleme kontakteerunud potentsiaalsete partneritega, kes oskavad valmistada haavageele. Loodame välja töötada senisest efektiivsema haavageeli, mis sisaldaks mõlemat meie poolt tundma õpitud valku ja mida kasutades paranevad laialdased nahakahjustused kiiremini. Hiirtel see juba toimis, nüüd on järg inimeste käes. Kindlasti oleks sellest suur kasu praegu käimasolevas sõjas. Varasemate andmete kohaselt on umbes 6% sõjaväljal saadud vigastustest põletused. Haiglaressursist võtavad need aga palju suurema osa, kuna paranemine on aeglane ja ohvrite seisund raske. Jääme lootma, et tulevikus läheb haavageeli vaja vaid rahuaja tarbeks.

Mõeldes sellele, et vaid üks valk aktiveerib rakkudes kõige vähem diferentseerunud rakkudele iseloomulikke signaale, tekib küsimus, kas ainult rakuvälisest maatriksist piisab, et pöörata tagasi rakkude vananemist – ja ehk isegi kogu

²² Lühend Wnt on moodustatud terminitest Wingless ja Int-1. Sellega tähistatakse signaaliradu, mis algavad proteiinidest ja viivad signaali rakukesta retseptorite kaudu raku sisse – toim.

organismi vananemist? Kui see peaks võimalikuks osutama, siis on ilmselt vaja keerukat ja hästikomponeeritud ekstratsellulaarsete signaalide orkestrit ja soolost või duetist ei piisa. Seda nägime hästi oma töödes, kus püüdsime inimese primaarseid rasvkoerakke hoida paljunemisevõimelisena nii kaua kui võimalik (Cárdenas-León jt, 2020a; 2020b). Rakukultuuris vananevad inimese rakud üsna kiiresti. Klassikaliselt arvati, et rakk võib jaguneda kultuuris 40–50 korda ja siis peatub. Seda nimetatakse Hayflicki piiriks. Leidsime, et kui kasutada just eelnevalt mainitud täiesti küpsemata embrüonaalsete tüvirakkude jaoks mõeldud kasvutingimusi, kombineerides mitmeid tugevatoimelisi kasvufaktoreid ja erilist rakuvälist maatriksit, siis saame pikendada inimese rasvarakkude eluiga 13 jagunemise võrra, aga mitte rohkem. Seega, noorus on midagi, mis antakse meile kaasa sünnil ning mis aegamisi kaob. Me saame vananemist aeglustada, elades tervislikult, kuid mitte selle eest ära joosta. Rakkude puhul tuleb kõne alla nii ülalpool mainitud immortaliseerimine, mis aga toob kaasa paljude küpsetele rakkudele omaste funktsioonide kao, kui ka ümberprogrammeerimine kõige algsemasse embrüonaalsesse olekusse, mille eest 2012. aastal pälvis Shinju Yamanaka Nobeli preemia. Inimeste puhul neid meetodeid kasutada ei saa ja ehk parem ongi.



Joonis 9. Kunstlik kollageenmaatriks maksarakkude kasvatamiseks. Olemegi jõudnud ringiga algusesse. Võrdle pilti joonisega 1. On ju üsna sarnane? Siin nähtavad kuulikesed ei ole rakud, vaid tehnoloogilisest protsessist tulenevad valguagregaadid. Autorid T. Kangur ja M. Järvekülg.

Koduseinad toetavad. Nii inimest kui ka maksarakku. Kui oled harjunud elama mitmemõõtmelises ruumis, siis ühe mõõtme miinimumini vähendamine tundub väga ahistav. Just nii tunnevad ennast maksarakud, kui neid kasvatada kahemõõtmelisel tavalisel rakukultuuri tassil, olgu need kaks mõõdet nii mugavalt viimistletud kui tahes (nt kaetud erilise ekstratsellulaarse maatriksi preparaadi – matrigeeliga). Koostöös Tartu ülikooli materjaliteadlastega, kes valmistasid meile tehnilikud kolmemõõtmelised kollageenvõrgustikud – nagu üks korralik ekstratsellulaarne maatriks välja nägema peab (joonis 9) –, näitasime, et isegi nii-öelda viimistlemata kolmemõõtmelises toas, mis koosnes ainult struktuursest

maatriksi valgust – kollageenist –, tundsid maksarakud ennast märgatavalt koduselt kui hästi polsterdatud kahemõõtmelises kitsikuses (Klaas jt, 2021b). Kuna normaalsed maksarakud ei paljune kultuuris, siis kasutatakse maksafunktsioonide uurimiseks doonormaksadest saadud rakuisolaate. Seetõttu on ülioluline, et nad säilitaksid oma esialgsed omadused nii kaua kui võimalik. Meie väljatöötatud kultuur oli selgelt samm edasi maksarakkude kultiveerimisel ning võimaldaks teha nii teaduslikke uuringuid kui ka suuremahulisi ravimkandidaatide testimist, kasutades katsete läbiviimiseks roboteid.

Kokkuvõtteks. Nii nagu rakkude, nii ka inimeste puhul on see, mis meid ümbritseb, oluline. Meie ümbruskond muudab meid. Mitte meie põhiolemust, kuid mõjutab kindlasti seda, kuidas me käitume ja milliseid otsuseid vastu võtame. Seega, hoolitsedes oma ümbruse, oma naabrite ja meid ümbritseva looduse eest, hoolitseme ka iseenda eest ja hoiame vähemalt selle osa suurest inimkonnast ja laiemalt ka kogu keskkonnast paremini toimivana.

VIITED

Cárdenas-León, C. G., Klaas, M., Mäemets-Allas, K., Arak, T., Eller, M., Jaks, V. 2022. Olfactomedin 4 regulates migration and proliferation of immortalized non-transformed keratinocytes through modulation of the cell cycle machinery and actin cytoskeleton remodeling. *Experimental Cell Research*, 415(1), 113111, <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2022.113111>

Cárdenas-León, C. G., Montoya-Contreras, A., Mäemets-Allas, K., Jaks, V., Salazar-Olivo, L. A. 2020b. A human preadipocyte cell strain with multipotent differentiation capability as an in vitro model for adipogenesis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal*, 56(5), 399–411, <https://doi.org/10.1007/s11626-020-00468-z>

Cárdenas-León, C. G., Mäemets-Allas, K., Kuuse, K., Salazar-Olivo, L. A., Jaks, V. 2020a. Enhanced proliferative capacity of human preadipocytes achieved by an optimized cultivating method that induces transient activity of hTERT. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 529(2), 455–461, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.06.019>

Jaks, V., Barker, N., Kasper, M., van Es, J. H., Snippert, H. J., Clevers, H., Toftgård, R. 2008. Lgr5 marks cycling, yet long-lived, hair follicle stem cells. *Nature Genetics*, 40(11), 1291–1299, <https://doi.org/10.1038/ng.239>

Klaas, M., Kangur, T., Viil, J., Mäemets-Allas, K., Minajeva, A., Vadi, K., Antsov, M., Lapidus, N., Järvekülg, M., Jaks, V. 2016. The alterations in the extracellular matrix composition guide the repair of damaged liver tissue. *Scientific Reports*, 6, 27398, <https://doi.org/10.1038/srep27398>

Klaas, M., Mäemets-Allas, K., Heinmäe, E., Lagus, H., Arak, T., Eller, M., Kingo, K., Kankuri, E., Jaks, V. 2022. Olfactomedin-4 improves cutaneous wound healing by promoting skin cell proliferation and migration through POU5F1/OCT4 and ESR1 signalling cascades. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 79(3), 157, <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04202-8>

Klaas, M., Mäemets-Allas, K., Heinmäe, E., Lagus, H., Cárdenas-León, C. G., Arak, T., Eller, M., Kingo, K., Kankuri, E., Jaks, V. 2021a. Thrombospondin-4 Is a Soluble Dermal Inflammatory Signal That Selectively Promotes Fibroblast Migration and Keratinocyte Proliferation for Skin Regeneration and Wound Healing. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 745637, <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.745637>

Klaas, M., Mäemets-Allas, K., Lõhmussaar, K., Tooming, M., Viil, J., Jaks, V. 2020. Endogenous beta-galactosidase activity marks a TREM2-expressing Kupffer cell population in injured livers of Lgr5-LacZ and wild-type mice. *FEBS Letters*, 594(5), 958–970, <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13669>

Klaas, M., Möll, K., Mäemets-Allas, K., Loog, M., Järvekülg, M., Jaks, V. 2021b. Long-term maintenance of functional primary human hepatocytes in 3D gelatin matrices produced by solution blow spinning. *Scientific Reports*, 11(1), 20165, <https://doi.org/10.1038/s41598-021-99659-1>

Mäemets-Allas, K., Klaas, M., Cárdenas-León, C. G., Arak, T., Kankuri, E., Jaks, V. 2023. Stimulation with THBS4 activates pathways that regulate proliferation, migration and inflammation in primary human keratinocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 642, 97–106, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.12.052>

Viil, J., Klaas, M., Valter, K., Belitškin, D., Ilmjärv, S., Jaks, V. 2017. A label-retaining but unipotent cell population resides in biliary compartment of mammalian liver. *Scientific Reports*, 7, 40322, <https://doi.org/10.1038/srep40322>

Viljar Jaks

Sündinud 5. detsembril 1967 Tartus

- 1986 Tartu Miina Härma nimeline 2. keskkool
- 1993 Tartu ülikool, arstiteaduskond, ravi eriala
- 1996 Tartu ülikool, biotehnoloogia ja biomeditsiin (BSc)
- 1998 Tartu ülikool, rakubioloogia (MSc)
- 2003 Tartu ülikool, rakubioloogia (PhD)
- 2010 Karolinska instituut, järeldoktorantuur
- 2014 Tartu ülikool, arstiteadus (MD)
- 2017 Tartu ülikool, allergoloogia ja immunoloogia residentuur
- 2020 Tartu ülikool, dermatoveneroloogia residentuur (dermatoveneroloog)

Töökäik

- 1994–2004 Tartu ülikool, laborispetsialist
- 2004–2010 Karolinska instituut, teadur
- 2011–2020 Tartu ülikool, vanemteadur
- 2020–... Tartu ülikooli kliinikum, dermatoveneroloog
- 2021–... Tartu ülikooli molekulaar- ja rakubioloogia instituut, kaasprofessor
- 2022–... Tartu ülikooli kliinikum, nahahaiguste kliiniku juht

Teadustegevuse peamised uurimisvaldkonnad

Kudede, peamiselt naha regeneratsiooni mehhanismide uurimine. Tehiskoed. Multioomika meetodite rakendamine norm ja patoloogiliste protsesside analüüsimisel inimese kudedes. Uudsed haavandite ravi meetodid.