

University of Groningen

Potential of salivary gland stem cells in regenerative medicine

Maimets, Martti

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2016

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Maimets, M. (2016). *Potential of salivary gland stem cells in regenerative medicine*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

APPENDICES

SUMMARY IN DUTCH
ACKNOWLEDGEMENTS
CURRICULUM VITAE
LIST OF PUBLICATIONS

DUTCH SUMMARY / NEDERLANDSE SAMENVATTING

Hoofd- en hals-kanker is de 6^{de} meest voorkomende kanker wereldwijd, met een geschat jaarlijks aantal aantal nieuwe gevallen van bijna 400.000 (Torre et al., 2015). De meerderheid van deze patiënten wordt behandeld met radiotherapie al dan niet in combinatie met chemotherapie en chirurgie. Ondanks het feit dat de radiotherapeutische behandeling van tumoren de kans op overleving van de patiënt significant verbetert, gaat dit vaak gepaard met neveneffecten door het onvermijdbare bestralen van de normale weefsels die zich rondom de tumor bevinden, zoals onder andere de speekselklieren. Ernstige hyposalivatie, vermindering van de speeksel afgifte, is een veel voorkomend onomkeerbaar neveneffect hetgeen resulteert in een verandering van spraak en smaak, moeilijkheden met kauwen en slikken en een toegenomen risico op het ontwikkelen van infecties in de mondholte en tandcariës (Vissink et al., 2015). Zelfs met de huidige meest moderne Intensiteit geModuleerde RadioTherapie (IMRT) zal noch steeds 40% van de patiënten gaan leiden aan droogheid van de mond, hetgeen de kwaliteit van leven ernstig kan aantasten. Gezien de onbevredigende resultaten van huidige behandelingsmethoden ter vermindering van speekselklierschade, is de aandacht verschoven naar de mogelijkheid van bio-therapeutica zoals stamceltransplantatie.

Straling geïnduceerde hyposalivatie is het gevolg van het slecht functioneren van de speekselklier stamcellen (SKSC) waardoor er onvoldoende volwassen functionele cellen gevormd kunnen worden (van Luijk et al., 2015). Het verzamelen van SKSC vóór bestraling en transplantatie in de klieren ná radiotherapie zou een potentiële therapie kunnen zijn om de secretoire functie van het aangedane weefsel te herstellen. De hoeveelheid biopsiemateriaal die veilig kan worden verkregen van een patiënt voorafgaand aan bestraling is echter beperkt. Daarom is een nauwkeurige karakterisering en gecontroleerde expansie van SKSC cruciaal voor verdere translatie van de methode naar de kliniek. Hoewel een groot aantal studies het bestaan van SKSC in de speekselklier ondersteunt (Bullard et al., 2008; Lombaert et al., 2008; van Luijk et al., 2015; Xiao et al., 2014) is informatie over de lokalisatie en moleculaire interacties met de omgeving van de SKSC schaars. Daarom is het beantwoorden van fundamentele vragen met betrekking tot biologie van de SKSC van groot belang.

Het werk dat beschreven is in dit proefschrift is gericht op het ontrafelen van de identiteit van SKSC binnen hun locatie in de speekselklier, ook wel micro-omgeving genoemd, en op het bevorderen van onze kennis over de moleculaire signalen die het in standhouden van de SKSC reguleren. Deze samenvatting geeft een overzicht van de belangrijkste bevindingen beschreven in dit proefschrift en zet deze in het juiste perspectief.

In **Hoofdstuk 1** wordt, ter introductie, een overzicht van de beschikbare kennis over somatische exocriene klier stamcellen verstrekt. De verschillen en overeenkomsten tussen talg, zweet, prostaat, de melkklieren en speekselklier worden belicht. Vervolgens wordt de potentiële klinische relevantie van het kweken en expanderen van specifieke stamcellen uit klierweefsel in het laboratorium bediscussieerd. De essentiële technieken die gebruikt kunnen worden ter identificatie de unieke eigenschappen van klierweefsel stamcellen zoals het traceren van hun nakomelingen tijdens de ontwikkeling en het in stand houden van volwassen weefsel worden besproken. Ten slotte wordt het belang van het gebruik van nieuwe kweeksystemen, zoals driedimensionale organoiden aangestipt en de mogelijke kansen en problemen die kunnen voortkomen uit het vertalen van deze technieken naar de kliniek worden beschouwd.

In **Hoofdstuk 2**, was het doel om op basis van een eerder in andere volwassen stamcellen geïdentificeerd panel van stamcel markers de karakterisering van de speekselklier stam/voorlopercellen aanwezig in de muizenspeekselklier te verbeteren. Eerst werd de expressie van diverse met stamcel geassocieerde markers in homeostatische speekselklier vastgesteld en bepaald. Er is al eerder gesuggereerd dat cellen die deze markers dragen, zich in het ductale compartiment van de klier bevinden. Vervolgens werd een kwantitatieve vergelijking gemaakt van de fractie van cellen met deze stamcel markers aanwezig in de speekselklier met uit in de vitro SKSC kweek afkomstige salisferen. Inderdaad bleek dat de salisferen verrijkt waren met cellen met stamcel kenmerken. Tenslotte, werd de regeneratieve capaciteit van stamcel merker tot expressie brengende cellen getest in een in vivo transplantatie model. Het bleek dat verschillende cel populaties die uiteenlopende stamcelmerker tot expressie brengen instaat zijn om de speekselklierfunctie te herstellen na bestraling en transplantatie. Echter, het bestaan van de exacte hiërarchie van het stamcel compartiment vereist echter nog verder onderzoek.

Zoals in Hoofdstuk 2 is beschreven en al eerder aangegeven werd door anderen (Denny and Denny, 1999; Man et al., 2001), bevinden de SKSC zich in het ductale compartiment van de speekselklier. Daarom werd in **Hoofdstuk 3** de rol van moleculaire signalen van met name de Wnt/ β -catenine signaal route verkend. Eerste werd EpCAM geïdentificeerd als een universele merker van ductale cellen van de speekselklier. Tegelijkertijd werd voor de expressie van β -catenine als algemene indicator van activering van de Wnt-route in de speekselklier bepaald. Een belangrijke bevinding was dat uitsluitend zeldzame cellen in deze afvoergangen nucleaire expressie van β -catenine, een kenmerk van actieve Wnt-siginaal transductie, lieten zien. Vervolgens werden EpCAM⁺ cellen uit speekselklieren van gezonde volwassen muizen geïsoleerd met behulp van fluorescentie-geactiveerde celsortering (FACS). Deze werden vervolgens ingebed in een driedimensionale (3D) basale extracellulaire matrix (Matrigel) en werd in deze cellen de Wnt signaal route gestimuleerd

APPENDICES

door een combinatie van Wnt3a ligand en Rspo1 toe te voegen bovenop de eerder gebruikte groeifactoren in het kweekmedium. Onder deze omstandigheden, lieten cellen met veel EpCAM op hun oppervlak een hoge mate van zelf-vernieuwing en lange termijn expansie van speekselklier cellen zien. De cellen groeiden als organoïden (of mini-klieren) en behielden hun vermogen tot generatie van gedifferentieerde speekselklier epitheelcellen. Omgekeerd kon met een panel van chemische remmers van de Wnt signaal route worden aangetoond dat stimulatie van de Wnt signaal route essentieel was voor het in stand houden van SKSC kweken. Tenslotte, werd het in vivo regeneratie potentieel van cellen afkomstig uit speekselklier organoïden aangetoond in ons transplantatie model, waardoor blijkt dat deze cellen mogelijk gebruikt kunnen worden als stamceltherapie als behandeling van door straling beschadigde speekselklieren en mogelijk voor andere aandoeningen van de speekselklier.

Het ontwikkelen van een geoptimaliseerde in vitro organoïde kweekstelsel voor de expansie van SKSCs zoals beschreven in Hoofdstuk 3, heeft geleid tot nieuwe mogelijkheden om kandidaat stamcellen uit de speekselklier te testen op basis van fenotypische en functionele kenmerken. Daarom is in **Hoofdstuk 4** geprobeerd de SKSCs te identificeren op basis van een andere universele met stamcel-geassocieerde functionele eigenschap, namelijk het gegeven dat deze cellen vaak in rust zijn. Een cel stadium onafhankelijke H2B-GFP-stimulatie-vervolg systeem werd toegepast om de mogelijke in rust zijnde SKSC populatie te karakteriseren. De hypothese was dat de meeste stamcel activiteit optreedt tijdens de embryonale ontwikkeling van de speekselklier waarna progenitor en gedifferentieerde cellen voornamelijk verantwoordelijk zijn voor het in stand houden van de postnatale weefselstructuur. Het H2B-GFP label werd geïnduceerd in zwangere moeders tot aan de geboorte van de pups, waarna het verlies van label als gevolg van celdeling werd vervolgd in de tijd. Op het moment dat de muizen volwassen waren, werden de cellen die het label behouden hadden (LRCS) voornamelijk in grotere excretie kanalen gevonden en niet in de acini met de volwassen functionele secreterende cellen. Interessant is dat na fenotypische profilering van de LRCS met bekende speekselklier merkers, co-lokalisatie werd waargenomen met $K8^+$ ductale lumale of $Vimentin^+$ mesenchymale cellen, maar niet met $CK5^+$ of $CK14^+$ potentiële stamcellen. Vervolgens, werd de regeneratieve capaciteit van LRCS bepaald door deze cellen in het organoïde kweek model te laten groeien en hun lange termijn zelfvernieuwing en differentiatie potentieel in vitro te testen. Het bleek dat LRCS niet in staat waren om organoïden te genereren, terwijl een deel van de niet-LRCS cellen dit juist wel konden. Tezamen suggereren deze gegevens dat tijdens de hele postnatale ontwikkeling, SKSCs die verantwoordelijk zijn voor het weefsel re-modellering en onderhoud een actief delende populatie van cellen is.

Veel ouderen hebben last van een gebrekkig functionerende speekselklier met als gevolg een droge-mond syndroom (xerostomie), die gewoonlijk resulteert in een verminderde orale gezondheid met, bijvoorbeeld, een verhoogde kans op aspiratie pneumonie. Het is echter onduidelijk of een aan veroudering-gerelateerde daling van de speekselklierfunctionaliteit kan worden toegeschreven aan een verminderde gevoeligheid voor prikkels tot proliferatie van de SKSC. Daarom werden in **Hoofdstuk 5** de eerder ontwikkelde technieken (Hoofdstuk 3 en (Nanduri et al., 2014)) toegepast om fenotypische en functionele eigenschappen van SGSCs geïsoleerd uit jonge en oude muizen te bestuderen. Aldus werd in oude muizen een verhoogd aantal CD24^{hi}/CD29^{hi} tot expressie brengende potentiële SKSCs waargenomen. Na isolatie bleken deze populatie cellen uit oude speekselklieren in vergelijking met jonge klieren een verminderde functionele potentie te bezitten: ze waren minder goed in staat om organoiden te vormen. Niettemin bleek na herhaald kweken dat de overgebleven oude SKSCs een vergelijkbare intrinsieke potentie hadden om te expanderen en een vergelijkbare regeneratief vermogen hadden na transplantatie als hun jonge collega's. Dus lijkt het erop dat de leeftijdsafhankelijke daling van het regeneratieve potentieel van de speekselklier zou kunnen worden veroorzaakt door een leeftijd gerelateerde veranderingen in de micro-omgeving, welke mogelijk omkeerbaar is wanneer blootgesteld aan de juiste extrinsieke factoren.

In **Hoofdstuk 6** is onderzocht of onze eerdere bevindingen met betrekking tot de muizen speekselklieren vertaald zouden kunnen worden naar een klinische toepassing. Hiertoe werd de aanwezigheid en het regeneratieve potentieel van humane speekselklier stamcellen (hSKSCs) geïsoleerd uit biopsieën van gezonde patiënten onderzocht. Eerst werd aan de hand van eerder gepubliceerde kweek methode (Feng et al., 2009) aangetoond dat ook humane saliferen gekweekt uit de bipten, stam- en progenitor-cellen bevatten welke in staat zijn tot in vitro zelfvernieuwing en differentiatie in verschillende cel types. Vervolgens werd het regeneratieve potentieel van deze cellen onderzocht na transplantatie in bestraalde immune-onderdrukte muizen. Het bleek dat deze cellen na xeno-transplantatie inderdaad het vermogen tot proliferatie behielden en functionele herstel induceerden terwijl ze zich langdurig en functioneel innestelden in een bestraalde speekselklier. Vooral een klein aantal van c-Kit⁺ subset van cellen verkregen uit humane saliferen bleken zeer potent in het induceren van functioneel herstel in vergelijking met c-Kit negatieve cellen. Echter bleek dat in overeenkomst met dat wat werd beschreven in hoofdstuk 5 dat de frequentie van c-Kit⁺ cellen in primaire kweken afneemt met de leeftijd, hetgeen suggereert dat de kweek methode voor gecontroleerde expansie van hSKSCs nodig zou zijn voor optimale functionaliteit van hSKSG en daardoor van grote therapeutische waarde is. Bovendien werd ontdekt dat regeneratieve signalen geïnduceerd door de combinatie van het nestelen van de menselijke cellen en regeneratieve signalen van de overlevende cellen in de ontvangende muizen speekselklier bijdragen aan het functionele

APPENDICES

herstel. Deze waarneming werd verder onderzocht door het vergelijken van de genomisch mRNA expressie van speekselklieren na bestraling met en zonder getransplanteerde cellen. Deze expressie analyse toonde verhogingen aan van mRNA van extracellulaire matrix eiwitten, en op regulatie van verscheidene stamcel-geassocieerde signaaltransductie routes. Interessant genoeg werd in overeenstemming met de waargenomen afhankelijkheid van SKSC voor Wnt signaal transductie route (hoofdstuk 3), werd een rol van het Wnt/ β -catenine systeem in het initiëren van functioneel herstel van speekselklieren door van humane-salisfeer afkomstige cellen gevonden. Samenvattend, laten de resultaten beschreven in dit proefschrift de grote potentie van adulte stamceltherapie ter vermindering van straling geïnduceerde speekselklier schade zien.

REFERENTIES

- Bullard, T., Koek, L., Roztocil, E., Kingsley, P.D., Mirels, L., and Ovitt, C.E. (2008). Ascl3 expression marks a progenitor population of both acinar and ductal cells in mouse salivary glands. *Dev Biol* 320, 72-78.
- Denny, P.C., and Denny, P.A. (1999). Dynamics of parenchymal cell division, differentiation, and apoptosis in the young adult female mouse submandibular gland. *Anat Rec* 254, 408-417.
- Feng, J., van der Zwaag, M., Stokman, M.A., van Os, R., and Coppes, R.P. (2009). Isolation and characterization of human salivary gland cells for stem cell transplantation to reduce radiation-induced hyposalivation. *Radiother Oncol* 92, 466-471.
- Lombaert, I.M., Brunsting, J.F., Wierenga, P.K., Faber, H., Stokman, M.A., Kok, T., Visser, W.H., Kampinga, H.H., de Haan, G., and Coppes, R.P. (2008). Rescue of salivary gland function after stem cell transplantation in irradiated glands. *PLoS One* 3, e2063.
- Man, Y.G., Ball, W.D., Marchetti, L., and Hand, A.R. (2001). Contributions of intercalated duct cells to the normal parenchyma of submandibular glands of adult rats. *Anat Rec* 263, 202-214.
- Nanduri, L.S., Baanstra, M., Faber, H., Rocchi, C., Zwart, E., de Haan, G., van Os, R., and Coppes, R.P. (2014). Purification and ex vivo expansion of fully functional salivary gland stem cells. *Stem Cell Reports* 3, 957-964.
- Torre, L.A., Bray, F., Siegel, R.L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., and Jemal, A. (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 65, 87-108.
- van Luijk, P., Pringle, S., Deasy, J.O., Moiseenko, V.V., Faber, H., Hovan, A., Baanstra, M., van der Laan, H.P., Kierkels, R.G., van der Schaaf, A., *et al.* (2015). Sparing the region of the salivary gland containing stem cells preserves saliva production after radiotherapy for head and neck cancer. *Sci Transl Med* 7, 305ra147.
- Vissink, A., van Luijk, P., Langendijk, J.A., and Coppes, R.P. (2015). Current ideas to reduce or salvage radiation damage to salivary glands. *Oral Dis* 21, e1-10.
- Xiao, N., Lin, Y., Cao, H., Sirjani, D., Giaccia, A.J., Koong, A.C., Kong, C.S., Diehn, M., and Le, Q.T. (2014). Neurotrophic factor GDNF promotes survival of salivary stem cells. *J Clin Invest* 124, 3364-3377.

ACKNOWLEDGEMENTS

This dissertation has taken a long time to finish and therefore has been a collaborative effort of many people. Here, I would like to take the opportunity to thank the most important of them.

First of all, my deepest gratitude goes to my primary supervisor **Prof. Robert Coppes**, co-promoter **Dr. Ronald van Os** and second promoter **Prof. Gerald de Haan**. I've had a truly unique opportunity to receive supervision from all of you since your approaches in guidance are complementary to each other.

Rob, thank you for giving me the opportunity to be a part of your team. I have always been inspired by your enthusiasm towards science, your ability to see opportunities where others might see limitations and your skill to make others excited about research. I sincerely hope I will be able to adapt these qualities into my own scientific career. I am also grateful for the time and freedom you gave me to identify and focus on the important questions, while taking risks to explore uncharted frontiers. You have been a true mentor and key in my growth as a scientist.

Ronald, I am very grateful for your positive yet critical perspective that helped me strive towards improvement. Your experience and expertise regarding the field of stem cells has been crucial for the scientific development of this project and also, me. That expensive bottle of Chianti Classico in a *trattoria* in the center of Firenze gave me valuable insight to what it means to pursue a career in academia. I will always value your opinion and I thank you for the time you've invested in me.

Gerald, thank you for always having an open door whenever I was in need to discuss data, receive comments on a manuscript or just talk about the future in science. In Hydra summer school it was you who taught me that asking questions means becoming a part of the conversation. I feel that this has been one of the most important lessons I've grasped during my studies. Importantly, I would like to thank you for introducing me to my new group leader Dr. Kim Bak Jensen.

Next, I would like to thank the members of the assessment committee: **Prof. Peter Lansdorp**, **Prof. Christine Mummery** and **Prof. Marc Vooijs**, for taking the time to read and comment on this thesis. I highly respect your work and it has been an honor to have you approve my dissertation.

I am thankful for **Peter Nagle** and **Dr. Sarah Pringle** to have accepted the task of being my paranymphs. Dear **Peter**, it's not always easy to find true friends when travelling around for work. However, with you I have always thought we somehow clicked from the very beginning. Maybe it's because Estonians and Irish both like potatoes. Maybe it's because they both like its liquid derivative. Either way, I have been very lucky to share my professional and personal space during these past years with you. Thank you for all the discussions and advice you have given me whether in

APPENDICES

Moneglia or in the autoclave room. You have a kind heart and golden hands – I'm certain that these two qualities will get you wherever you want to in the future. Dear Postdoc (**Sarah**), thank you for showing me the ropes not just in the lab but also in Groningen. I know I probably annoyed the living hell out of you with my continuous questions while sitting next to you. Therefore, thanks for not secretly setting fires under my desk. I hope I compensated the annoyance in the lab with being a little more fun outside. I'll always chuckle when I think of that summer morning in the park at 7 am after visiting every establishment that Groningen had to offer us. Good times. I hope you will find great success in setting up the Pringle lab and wish you and **Eev** all the best in the future.

Working in the Coppes group has given me a wonderful opportunity to meet many talented and inspiring people, all of them whom have made their mark also on this thesis. **Cecilia**, you are determined and dedicated scientist and a very good friend. I'm really grateful for all of your help regarding the chapters in this thesis. I'm sure that there is a great career ahead of you whichever path you may choose. **Nynke**, I feel lucky to have shared an office with you. Your support on the project and help with administration in Dutch has been paramount for the completion of this dissertation. I wish you, **Jurjen** and **Myrthe** all the best in your new home. **Paola**, after your successful finish of the Top Master program I was very happy to hear that you decided to choose Rob's lab to continue as a PhD student. I hope that the Notch project will take off to unexpected heights and you'll be successful in all of your different endeavors. I would also like to express my gratitude towards the more recent additions to Rob's group **Andries**, **Daisy** and **Julie** for a nice scientific environment and wish the best of luck with all of your projects. Additionally, I would like to thank the previous members of the Coppes group **Yamini**, **Ghazale** and **Sonja** for enjoyable time and scientific discussions.

On the 5th floor I had the opportunity to work with a fantastic team of technicians who have all to a greater or lesser extent contributed to this dissertation: **Reinier**, **Hette**, **Marianne**, **Mirjam**, **Jeanette**, **Djoke**, and **Anne**. You all do solid work and you are the true pillars of our research.

I would like to express my sincere gratitude to **Prof. Harrie Kampinga** and **Prof. Ody Sibon** and the members of their groups for critical comments, suggestions and discussions during our numerous meetings. Especially, I would like to thank **Vaishali** (and **Pranav**), **Melanie** (and **Peter**), **Melania** (and **Federico**), **Wondwossen**, **Despina** (and **Kostas**), **Matteo** (and **Isabella**), **Gabriel**, **Eduardo**, **Francesco** and **Els** for their friendship and making life outside work great.

I would also like to thank the previous and current members of team de Haan: **Evgenia**, **Višnja**, **Karin**, **Johannes**, **Mirjam**, **Edyta**, **Seka**, **Mathilde**, **Bertien**, **Martha**, **Erik** and **Ellen** for all the scientific discussions during our work meetings. Dear **Leonid**, I highly respect your work and your unique ideas.

Thank you for always finding time to discuss data, critical controls, general science or future in academia.

Working between two departments involves a lot of bureaucracy. I feel very lucky that I had the opportunity to ask help from **Gerry, Greetje** and **Lies** whenever in need.

A large part of this work has been completed in the outstanding core facilities that UMCG has to offer. I would like to thank **Dr. Ben Giepmans, Jeroen Kuipers** and **Klaas Sjollema** for a fruitful collaboration and their trust in me while working with microscopes. Dear **Klaas**, I appreciate your continuous positivity and your immense capability for troubleshooting whenever I was stuck with imaging or reconstructing these images. Also, thanks for always answering my phone calls even though from time to time they were not even close to regular working hours.

Next, I would like to extend my gratitude to the members of the FACS facility: **Hank, Geert** and **Roelof-Jan**. I appreciate your help and flexibility when it came to sorting late in the evenings and I'm grateful for your expertise and professionalism.

All of the work presented in this thesis revolves around mice. For this, I would like to thank the people working in the Animal Facility (CDP): **Annemieke, Michel, Andre, Maurice, Yvonne, Alex, Arie, Catriene, Miriam, Juul** and **Minke**. Thank you for your continuous help. Specifically, I would like to acknowledge the work of **Natascha**. Thank you for always being available and flexible in planning the next experiment. You are an excellent team player and you made difficult situations seem like a walk in the park.

I would like to express my gratitude to **Prof. Peter Lansdorp** and **Dr. Diana Spierings** for our collaboration on strand-sequencing the salivary gland organoid material. Thanks to this, I had the opportunity to learn crucial new techniques and it is my sincere hope that we will be able to sum our observations into a manuscript.

I would also like to thank the excellent people in ERIBA whom I had the pleasure of sharing a life with in- and outside the lab: **Clémence, Jakub** (and **Kinga**), **Stijn** and **David**. Thanks for all the great times and good luck with finishing your projects.

I am greatly indebted to a collective known as OK Jutukas. Dear **Martin, Mihkel** and **Sandra**, thank you for your encouragement and support throughout this journey. It is my sincere hope that we will finally manage to put together our calendar. Moreover, I would like to thank **Maris** for giving this book a physical form. I would also like to acknowledge my co-scientists **Mart** and **Tanel**. Our continuous discussions about science, life and future have been excellent and I hope that we will never stop. Additionally, I would like to thank **Hannes, Tanel, Silver, Ott, Indrek, Eero, Alvar, Jaan, Juhan** and their partners for always showing me how to have great time.

APPENDICES

The last proposition of this dissertation is dedicated to the hard working people of the Neurology Department in Martini Ziekenhuis and UMCG Centrum voor Revalidatie Beatrixoord whom I am greatly indebted to for having my own firm handshake: **Dr. Berghuis, Abraham, Dr. Roels, Ferry, Jan-Erik**, all the therapists and nurses. You all are doing an outstanding motivational and physical work in getting people on their feet again. Additionally, I would like to express my gratitude to **Arjan** and **Finette**. I think together we did a great job in supporting each other. I would also like to thank father **Rolf Wagenaar** for his continuous support.

This accomplishment would not have been possible without the support of my family: my mother **Siiri**, father **Toivo**, sister **Kaire** and brother **Andri and Markko**. Thank you for always being the wind at my back, for helping me through difficult times and rejoicing with me during moments of success. Additionally, I would like to thank my Italian family **Peppe, Milli** and **Marco** together with all the *zie* and *zii* for accepting me in their midst and their endless positivity and laughter.

Lastly and most importantly I owe my eternal gratitude to my brilliant wife **Sara** whom this dissertation is dedicated to. We have had an amazing journey and I have enjoyed every single day of it. I can't wait for the next chapter of our lives to start in Copenhagen. I would like to finish by repeating the words I uttered almost a year ago in front of all my family and friends on the magnificent island of Capri: I would not be here without you, ti amo, tu sei la mia vita.

Martti, Pistoia, May 2016.

CURRICULUM VITAE

MARTTI MAIMETS**Education**

- 09/2007 – 06/2009** M.Sc. in Natural Sciences (biotechnology and biomedicine)
University of Tartu, Tartu, Estonia
Title: Effects of lovastatin on the cell cycle and expression of pluripotency markers in stem cells
- 09/2004 – 06/2007** B.Sc. in Natural Sciences (gene technology)
University of Tartu, Tartu, Estonia
Title: The regulation of the interaction of tumor-suppressor protein p53 and oncoprotein Mdm2

Research Positions

- 07/2016 – ...** **Postdoctoral fellow**
Laboratory of Dr. Kim Jensen, Biotech Research and Innovation Center, University of Copenhagen, Denmark
- 09/2010 – 09/2016** **Doctoral candidate**
Laboratory of Prof. Rob Coppes, Departments of Radiation Oncology and Cell Biology, University Medical Centre Groningen, Groningen, the Netherlands
- 06/2009 – 09/2010** **Researcher**
Institute of Molecular and Cell Biology (IMCB), University of Tartu, Tartu, Estonia
- 09/2007 – 06/2009** **Master student**
Laboratory of Prof. Toivo Maimets, Institute of Molecular and Cell Biology (IMCB), University of Tartu, Tartu, Estonia
Project: Regulation of cell cycle within human embryonic stem cells and its relation to cancer stem cells
- 09/2005 - 09/2007** **Undergraduate Student**
Laboratory of Prof. Arnold Kristjuhan, Institute of Molecular and Cell Biology (IMCB), University of Tartu, Tartu, Estonia
Project 1: Investigation of RNA polymerase II-dependent transcription elongation mechanisms
Project 2: Regulation of the interaction of tumor-suppressor protein p53 and oncoprotein Mdm2

APPENDICES

Honors and awards

2015	Student of the Year award, Department of Cell Biology, UMC Groningen
2014	Best Presenter Award, „6th Dutch Society for Stem Cell Research meeting“
2014	Best Presenter Award and Klaas Breur travel award, „Annual meeting for the Dutch Society for Radiation Biology“
2012	Fellowship for Hydra VIII: European Summer School on Stem Cells and Regenerative Medicine
2011 – 2014	Estonian national scholarship program <i>Kristjan Jaagu doktorantuur välismaal</i>
2011	Klaas Breur travel Award, „Annual meeting for the Dutch Society for Radiation Biology
2009	ESF DoRa Travel Grant for „ISSCR 7th Annual Meeting“, Barcelona, Spain

LIST OF PUBLICATIONS

Pringle, S., **Maimets, M.**, van der Zwaag, M., Stokman, M., van Gosliga, D., Zwart, E., Witjes, M., de Haan, G., van Os, R.P., Coppes, R.P (2016). Human salivary gland stem cells functionally restore radiation damaged salivary glands. *Stem Cells*. 2016 Mar;34(3):640-52. doi: 10.1002/stem.2278.

Maimets, M., Rocchi, C., Bron, R., Pringle, S., Kuipers, J., Giepmans, B.N.G., Vries, R.G.J., Clevers, H., de Haan, G., van Os, R.P., Coppes, R.P (2015). Long-term in vitro expansion of salivary gland stem cells driven by Wnt signals. *Stem Cell Reports*. 2016 Jan 12;6(1):150-162. doi: 10.1016/j.stemcr.2015.11.009.

Maimets, M. and Coppes, RP. (2015). Overcoming aging-caused difficulties in salivary gland. Published online in atlasofscience.org (<http://atlasofscience.org/overcoming-aging-caused/>).

Maimets, M., Bron, R., de Haan, G., van Os, R., & Coppes, R. P. (2015). Similar ex vivo expansion and post-irradiation regenerative potential of juvenile and aged salivary gland stem cells. *Radiother Oncol*. doi: 10.1016/j.radonc.2015.06.022

Nanduri, L. S. *, **Maimets, M.** *, Pringle, S. A., van der Zwaag, M., van Os, R. P., & Coppes, R. P. (2011). Regeneration of irradiated salivary glands with stem cell marker expressing cells. *Radiother Oncol*, 99(3), 367-372. doi: 10.1016/j.radonc.2011.05.085 *Equal contribution

Kallas, A., Pook, M., **Maimets, M.**, Zimmermann, K., & Maimets, T. (2011). Nocodazole treatment decreases expression of pluripotency markers Nanog and Oct4 in human embryonic stem cells. *PLoS One*, 6(4), e19114. doi: 10.1371/journal.pone.0019114

