

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

**Arüülsüivesinike retseptori ekspressioon inimese embrüonaalsete tüvirakkude
diferentseerumisel ekto-, endo- ning mesodermaalses suunas**

Bakalaureusetöö geenitehnoloogias

12 EAP

Laura Pajusaar

Juhendaja MSc Indrek Teino

TARTU 2018

„Arüülsüivesinike retseptori ekspressioon inimese embrüonaalsete tüvirakkude diferentseerumisel ekto-, endo- ning mesodermaalses suunas“

Inimese embrüonaalsed tüvirakud on pluripotentsed, mis tähendab, et nad on võimelised diferentseeruma kõigi kolme lootelehe rakkudeks. Arüülsüivesinike retseptor (AHR) on transkriptsioonifaktor, mis on enim tuntud keskkonnakemikaalide kahjutustajana, kuid nüüdseks on sellel leitud ka teisi funktsioone erinevates organismides. Varem on näidatud, et inimese embrüonaalsete tüvirakkude H9 rakuliini diferentseerumisel *AHR*-i ekspressioon väheneb. Sellest ajendatuna püstitati antud bakalaureusetöö eesmärgiks uurida *AHR*-i ekspressiooni dünaamikat ajas erinevatesse suundadesse diferentseerimisel.

Saadud tulemustest leiti, et igas suunas reguleeritakse *AHR*-i ekspressioon alla, kuid suunaspetsiifiliste erinevustega. Ektodermaalses suunas reguleeritakse *AHR*-i ekspressioon diferentseerimise lõpuks taas üles, endodermaalse suuna puhul jääb samale tasemele ning mesodermaalses suunas on *AHR*-i ekspressioon vaevu detekteeritav.

Märksõnad: AHR, hES rakud, diferentseerumine, pluripotentsus

CERCS kood: B200 Tsütoloogia, onkoloogia, kantseroloogia; B220 Geneetika, tsütogeneetika

„The expression of aryl hydrocarbon receptor during differentiation of human embryonic stem cells into ecto-, endo- and mesodermal lineages“

Human embryonic stem (hES) cells are pluripotent, meaning that they are able to differentiate into all derivatives of three primary germ layers.

Aryl hydrocarbon receptor (AHR) is known as a transcription factor involved in the regulation of biological responses to environmental chemicals. By now it has been found to have additional functions in different organisms. It has been shown that in the early differentiation of hES cells the expression of *AHR* decreases. Therefore, the purpose of the current thesis was to examine the dynamics of *AHR* expression in the early induced differentiation of the H9 hES cell line into ectoderm, endoderm and mesoderm.

The results of this thesis show a lineage-specific downregulation in the expression of *AHR*. In ectoderm *AHR* expression is initially downregulated, followed by upregulation at later timepoints. In endoderm the downregulation stayed at the same level and in mesoderm *AHR* was barely detectable.

Keywords: AHR, hES cells, differentiation, pluripotency

CERCS code: B200 Cytology, oncology, cancerology; B220 Genetics, cytogenetics

SISUKORD	
SISUKORD	3
KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1.1. Inimese embrüonaalsed tüvirakud	7
1.1.1. OCT4	8
1.1.2. SOX2	9
1.1.3. NANOG.....	9
1.2. Rakkude diferentseerumine	10
1.2.1. Ektodermaalne diferentseerumine	10
1.2.2. Endodermaalne diferentseerumine	11
1.2.3. Mesodermaalne diferentseerumine.....	12
1.3. Arüüsüsivesinike retseptor	12
1.3.1. Arüüsüsivesinike retseptori signaalirada.....	14
1.3.2. Arüüsüsivesinike retseptori roll organismis	15
1.3.3. AHR-i roll tüvirakkudes	16
2. EKSPERIMENTAALOSA	18
2.1. Töö eesmärgid	18
2.2. Materjal ja meetodika	18
2.2.1. Kasutatud rakuliin, söötmed ja kemikaalid	18
2.2.2. Rakkude kasvatamine ja diferentseerimine	18
2.2.3. RNA eraldamine	20
2.2.4. DNAasI töötlus ja cDNA süntees	20
2.2.5. Kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon (qPCR)	21
2.2.6. SDS-PAGE ja Western blot.....	21
2.2.7. Andmete statistiline analüüs.....	22
2.3. Tulemused	23
2.3.1. AHR-i ekspressioon neuraalsel diferentseerimisel	23
2.3.2. AHR-i ekspressioon endodermaalsel diferentseerimisel.....	26
2.3.3. AHR-i ekspressioon mesodermaalsel diferentseerimisel.....	29
2.4. Arutelu	32
KOKKUVÕTE	35
SUMMARY	36
TÄNUSÕNAD	37
KIRJANDUSE LOETELU	38
KASUTATUD VEEBIAADRESSID	45
LISAD	46
LISA 1. Kvantitatiivses PCR-is kasutatud oligonukleotiidid	46

KASUTATUD LÜHENDID

- AHR – arüülsüivesinike retseptor (*aryl hydrocarbon receptor*)
- AHRR – AHR repressor (*AHR repressor*)
- ARNT – arüülsüivesinike retseptori tuumalokalisaator (*aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*)
- bHLH – heeliks-ling-heeliks (*basic helix-loop-helix*)
- BMP – luu morfogeneetiline valk (*bone morphogenetic protein*)
- BRA – geeni nimetus inglise keeles (*brachyury*)
- DMEM – söötme nimetus inglise keeles (*dulbecco's modified eagle meedium*)
- GATA4 – geeni nimetus inglise keeles (*GATA binding protein 4*)
- GDC reagent – rakkude dissotsiatsiooni reagent (*gentle cell dissociation reagent*)
- HAH – halogeenitud aromaadne süivesinik (*halogenated aromatic hydrocarbon*)
- HAND1 – geeni nimetus inglise keeles (*heart and neural crest derivatives expressed 1*)
- hES rakud – inimese embrüonaalsed tüvirakud (*human embryonic stem cells*)
- HSP90 – kuumašoki valk 90 (*heat shock protein 90*)
- ICM – sisemine raku mass (*inner cell mass*)
- mES rakud – hiire embrüonaalsed tüvirakud (*mouse embryonic stem cells*)
- NLS – tuuma lokaliseerimise signaal (*nuclear localization signal*)
- OCT4 – oktameeri siduv transkriptsioonifaktor 4 (*octamer-binding transcription factor 4*)
- OTX2 – geeni nimetus inglise keeles (*orthodenticle homeobox 2*)
- PAH – polütsükline aromaadne süivesinik (*polycyclic aromatic hydrocarbon*)
- PAS A/B – PER-ARNT-SIM domeen A/B
- PAX6 – geeni nimetus inglise keeles (*paired box 6*)
- PVDF – polüvinülideen difluoriid (*polyvinylidene difluoride*)
- RT-qPCR – pöördtranskriptsioon kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon (*reverse transcription quantitative polymerase chain reaction*)
- ROCK – rho-sõltuv kinaas (*rho-associated protein kinase*)
- SDS-PAGE – naatriumdodetsüülsulfaat-polüakrüülamiid-geelelektroforees (*sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis*)
- SOX2 – geeni nimetus inglise keeles [*SRY (sex determining region Y)-box2*]
- SOX17 – geeni nimetus inglise keeles [*SRY (sex determining region Y)-box2*]
- TCDD – 2,3,7,8-tetraklorodibenso-para-dioksiin (*2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-para-dioxin*)
- XAP2 – hepatiit B viirus X-seotud valk (*HBV X-associated protein*)
- XRE – ksenobiootiline vastuselement (*xenobiotic response element*)

SISSEJUHATUS

Inimese embrüonaalsed tüvirakud on pluripotentsed rakud, mis on eraldatud blastotsüsti sisemisest rakumassist ning suutelised arenema mistahes rakuks embrüos. Embrüonaalsete tüvirakkude pluripotentsuse säilitamisel on tähtsad mitmed faktorid, olulisemad neist transkriptsioonifaktorid OCT4, NANOG ning SOX2, mida kasutatakse ka pluripotentsusmarkeritena rakkude iseloomustamiseks.

Inimese embrüonaalsed tüvirakud (hES rakud) on võimelised diferentseeruma kõigi kolme lootelehe rakkudeks. *In vitro* on võimalik hES rakkude diferentseerimist ektodermi, endodermi ning mesodermi indutseerida spetsiifilisi kemikaale ning kommertsiaalseid söötmeid kasutades.

Arüülsüivesinike retseptor (AHR) on ligand-sõltuv transkriptsioonifaktor, mida on suutelised aktiveerima mitmesugused ksenobiootilised ning endogeensed ligandid. AHR on enim tuntud keskkonnakemikaalide kahjutustajana, aktiveerides mitmete ensüümide geene, mis vastutavad kemikaalide metaboolse lagundamise eest. Nüüdseks on näidatud, et AHR omab ka mitmeid teisi füsioloogilisi funktsioone erinevates organismides.

Käesoleva bakalaureusetöö kirjanduse ülevaates kirjeldatakse inimese embrüonaalseid tüvirakke ning nende omadusi, seejuures ka tähtsamaid pluripotentsusmarkereid. Lisaks antakse ülevaade embrüonaalsete tüvirakkude diferentseerumisest ekto-, endo- ning mesodermaalses suunas. Samuti kirjeldatakse arüülsüivesinike retseptori funktsiooni inimese ning hiire rakkudes ja molekulaarset mehhanismi, mille kaudu ta mõjutab oma sihtmärkgeene. Praktilise osa eesmärgiks oli uurida arüülsüivesinike retseptori ekspressiooni muutust ajas inimese embrüonaalsetes tüvirakkudes ning nende diferentseerumisel ekto-, endo- ning mesodermaalses suunas.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Inimese embrüonaalsed tüvirakud

Embrüonaalsed tüvirakud (ES rakud) pärinevad varajase embrüo totipotentsetest rakkudest ning on võimelised piiramatult diferentseerumata jagunema *in vitro*. Inimese preimplantatsiooni embrüos peetakse blastomeere totipotentseks kuni 4-raku staadiumini, sest nad suudavad *in vitro* areneda blastotsüstideks, mis sisaldavad nii sisemise rakumassi (ICM – *inner cell mass*) kui ka trofektodermi rakke (Van De Velde et al., 2008). Totipotentsus on raku võime areneda igaks rakutüübiks kehas, sealhulgas ekstraembrüonaalsete kudede rakkudeks, mis on vajalikud implantatsiooniks ning embrüo normaalseks arenguks emakas (Selwood ja Johnson, 2006). 16-raku staadiumis rakkude potentsus väheneb ning tekib kaks rakkude rühma – embrüo välimise osa rakkudest moodustuvad trofoblasti rakud ning blastomeeri sisemistest rakkudest moodustuvad pluripotentsed ICM rakud. ICM annab aluse tulevasele embrüole, mille rakud diferentseeruvad kolme lootelehe – mesodermi, ektodermi ja endodermi – rakkudeks (Thomson et al., 1998). ES rakud on pluripotentsed rakud, mis on suutelised embrüos arenema mistahes rakuks, kuid ei ole võimelised diferentseeruma ekstraembrüonaalseteks kudedeks *in vivo*.

Hiire embrüonaalsed tüvirakud (mES rakud – *mouse embryonic stem cells*) isoleeriti 1981. aastal hiire blastotsüstist (Evans ja Kaufman, 1981) ning 1998. aastal õnnestus esmakordselt inimese embrüonaalsete tüvirakkude (hES rakud – *human embryonic stem cells*) isoleerimine. Saadi viis rakuliini, millest H9 säilitas normaalse XX karüotüübi ka pärast 6 kuud koekultuuris kasvamist. Inimese ES rakud omavad kõrget telomeraasset aktiivsust, mis on oluline telomeeride pikkuse säilitamisel, tagades nende piiramatu jagunemisevõime. Lisaks on hES rakkudel võime jaguneda kõigi kolme lootelehe rakkudeks. Algselt kasvatati hES rakke hiire embrüonaalsete fibroblastide toiterakkude kihil, vältimaks nende diferentseerumist ning pluripotentsuse kaotamist. (Thomson et al., 1998) Nüüdseks on näidatud, et hES rakke on võimalik kasvatada ka teistel tingimustel, nagu näiteks Matrigelil keemiliselt defineeritud mTeSR1 söötmes (Ludwig et al., 2006). Lisaks on praeguseks välja töötatud palju erinevaid söötmeid ning maatrikseid, mis aitavad rakkude pluripotentsust hoida või suunavad neid kindlas suunas diferentseeruma.

Inimese embrüonaalsed tüvirakud ekspresseerivad pinnamarkereid, mille hulka kuuluvad SSEA-3 (*stage-specific embryonic antigen*), SSEA-4, TRA-1-60 (*tumor-related antigen*), TRA-1-81 ning aluseline fosfataas (Thomson et al., 1998). ES rakud on ainulaadsed ning neid saab iseloomustada valguliste transkriptsioonifaktoritega, mida ekspresseeritakse

pluripotentses rakkudes. Pluripotentsuse indutseerimisel ja säilitamisel on olulised kolm põhilist transkriptsioonifaktorit, milleks on OCT4, SOX2 ja NANOG, mis reguleerivad nii teineteise kui ka iseenda ekspresiooni. On välja pakutud, et need kolm põhilist transkriptsioonifaktorit reguleerivad ka hES rakkude diferentseerumist spetsiifilistesse suundadesse. SOX2 juhib hES rakkude diferentseerumist neuroektodermi, muutused OCT4 ja NANOG-i ekspresioonis suunavad rakud diferentseeruma mesendodermi, mis on mesodermi ja definitiivse endodermi ühine prekursor (Thomson et al., 2011; Zhao et al., 2004)

1.1.1. OCT4

POU5F1 geeni poolt kodeeritav valk OCT4 ehk oktameeri siduv transkriptsioonifaktor 4 on POU (Pit-Oct-Unc) perekonda kuuluv valk, mis on oluline embrüonaalses arengus ja ES rakkude pluripotentsuse säilitamisel. Täiskasvanu rakkudes on muutuseid OCT4 ekspresioonis seostatud ka tumorigeneesiga (NCBI a).

OCT4 on tähtis ES rakkude pluripotentsuse säilitamisel. Seejuures on oluline, et OCT4 ekspressioon säiliks kindlal tasemel. Kõrgenenud OCT4 ekspressioon suunab ES rakud arenema ekstraembrüonaalsesse mesodermi või endodermi, OCT4 repressioon kaotavad rakud pluripotentsuse ning diferentseeruvad. Tänapäevaks on teada, et OCT4 on ES rakkude pluripotentsuse ja diferentseerumise võtmeregulaator (Niwa et al., 2000).

On teostatud katseid CRISPR (*clustered regularly interspaced, short palindromic repeat*)-Cas (*CRISPR-associated*) meetodika abil, kus sihtmärgiks oli diploidses inimese sügootis OCT4 kodeeriv geen ehk *POU5F1*. Leiti, et blastotsüsti areng oli häiritud OCT4 puudumise tõttu, mille tulemusel oli diferentseerumine negatiivselt mõjutatud. Blastotsüst moodustus, kuid sisemine raku mass (ICM) kujunes puudulikult ning hiljem embrüod hävinesid. Katsetest selgus, et *POU5F1*-puudulikes rakkudes polnud allareguleeritud ainult ekstraembrüonaalsed trofektodermi geenid, nagu *CDX2*, vaid ka pluripotentsuse epiblasti regulaatorid, kaasaarvatud *NANOG*. Inimese blastotsüstis põhjustavad mutatsioonid *POU5F1* geenis ka preimplantatsiooniga seotud geenide allareguleerimist, nende seas *NANOG* (epiblast), *GATA2* (trofektoderm) ja *GATA4* (primitiivne endoderm). See omakorda viitab OCT4 funktsionaalsele rollile inimese varajases arengus. Seevastu on hiire *Pou5f1*-puudulike embrüote puhul näidatud, et need säilitasid ortoloogiliste geenide, nagu näiteks *Nanog*, ekspresiooni ICM-s ning blastotsüsti areng toimus (Fogarty et al., 2017), kuid ICM rakud ei olnud pluripotentsed (Nichols et al., 1998). Sellest järeldub Oct4 vajalikkus pluripotentsuse säilitamiseks ka hiire rakkudes.

1.1.2. SOX2

SOX2 geenilt kodeeritakse transkriptsioonifaktorit SOX2 ehk [*SRY (sex determining region Y)-box 2*]. SOX2 kuulub SOX perekonna transkriptsioonifaktorite hulka, millel on oluline roll mitmetes imetajate arengustaadiumites. SOX2 transkriptsioonifaktor on vajalik diferentseerumata embrüonaalsete tüvirakkude pluripotentsuse hoidmisel ning neuraalsete tüvirakkude omaduste säilitamisel (NCBI b).

Embrüonaalse arengu käigus on SOX2 konstitutiivselt ekspresseeritud. Algselt on see transkriptsioonifaktor ekspresseeritud implanteerumata embrüo epiblastis ning pärast gastrulatsiooni valdavalt kesknärvisüsteemis, mis viitab SOX2 olulisusele neuraalses arengusuunas (Wegner ja Stolt, 2005). SOX2 on allareguleeritud diferentseerunud post-mitootilistes neuronaalsetes ning gliiarakkudes ja kõrgelt ekspresseeritud prolifereeruvates neuraalsetes eellasrakkudes. SOX2 ekspressiooni allaregulatsioon neuraalsetes eellasrakkudes vähendab nende rakkude uuenemisvõimet ning proliferatsiooni, soodustades varasemat väljumist rakutsüklist ning terminaalset diferentseerumist (Graham et al., 2003).

Vähenenud *SOX2* ekspressioon hES rakkudes põhjustab rakkude morfoloogia muutust, tüvirakuliste markerite ekspressiooni kadumist ning trofektodermi markerite ekspressiooni tõusu. Lisaks on hiire puhul näidatud, et *Sox2*-puudulikes embrüotes ei arene pluripotentsed embrüonaalsed tüvirakud ning rakud diferentseeruvad trofektodermi (Avilion et al., 2003). Samuti põhjustab *SOX2* ekspressiooni vähenemine ka transkriptsioonifaktorite *OCT4* ja *NANOG* ekspressiooni vähenemist, mis näitab, et nende kolme faktori harmoonia on oluline pluripotentsuse säilitamisel. (Fong et al., 2008)

1.1.3. NANOG

NANOG geeni poolt kodeeritud samanimeline valk on DNA *homeoboxile* seonduv transkriptsioonifaktor, mis on kaasatud ES rakkude proliferatsioonis, rakkude ise-uuenemises ja pluripotentsuse säilitamisel. NANOG on võimeline blokeerima ES rakkude diferentseerumist ning suudab iseenda ekspressiooni autorepresseerida diferentseeruvates rakkudes. Sellele geenile on leitud kaks transkripti varianti, mis kodeerivad erinevaid isovorme. (NCBI c)

Hiire embrüos on Nanog ekspresseeritud vaid ICM rakkudes ning selle puudumisel epiblasti ei moodustu (Chambers et al., 2003). *Nanogi* ekspressiooni vähenemine põhjustab hiire ES rakkude pluripotentsuse kadumist, rakkude proliferatsiooni ning diferentseerumist ekstraembrüonaalsesse endodermi. Nanog käitub kui transkriptsiooniline repressor valkudele, mis soodustavad diferentseerumist, nagu näiteks *Gata4* ja *Gata6* (Mitsui et al., 2003).

NANOG on inimese embrüos ekspresseeritud blastotsüsti staadiumi sisemise rakumassi rakkudes ülesandega säilitada rakkude pluripotentsust ning takistada rakkude diferentseerumist ekstraembrüonaalse endodermi ning trofektodermi rakkudeks. Seejuures NANOG-i allaregulatsioon inimese ES rakkudes indutseerib nii varajase trofektodermi markerite, nagu *CDX2* ja *GATA2* kui ka hilisemate markerite, nagu *hCG- α* ja *hCG- β* ekspressiooni, mis suunab rakud diferentseeruma trofektodermi (Hyslop et al., 2005).

1.2. Rakkude diferentseerumine

Embrüonaalse arengu käigus muutub sisemine rakumass enne blastotsüsti implantatsiooni mosaiikseks ning sisaldab kahte tüüpi rakke. Ühed rakud ekspresseerivad transkriptsioonifaktorit Nanog ning teised *Gata6* (Chazaud et al., 2006). Rakud jagunevad pärast implantatsiooni vastavalt epiblastiks ning primitiivseks endodermiks ehk hüpoblastiks. Hüpoblastist areneb rebukott ning embrüonaalse epiblasti rakud annavad aluse kogu embrüole, sest nendest rakkudest arenevad välja kõigi kolme lootelehe – ektodermi, endodermi ning mesodermi – rakud. (Gilbert, 2010)

Ka *in vitro* on võimalik hES rakke kõigi kolme lootelehe suunas diferentseerida. Esmalt näidati *in vitro* diferentseerumist, kui rakke kasvatati hiire embrüonaalsete fibroblastide juuresolekuta ning spetsiifilise maatriksita (Thomson et al., 1998). Rakud hakkavad moodustama kolmedimensionaalseid agregate, mida nimetatakse embrüonaalseteks kehadeks ning nad sisaldavad nii ekto-, endo- kui ka mesodermi rakke (Höpfl et al., 2004). Nüüdseks on välja töötatud mitmesuguseid protokolle ning kommertsiaalsed söötmed, mis suunavad hES rakud diferentseeruma soovitud suunas. Inimese ES rakkude diferentseerimine *in vitro* võimaldab uurida geenide ekspressiooni ning rakkude diferentseerumisega seotud protsesse varajastel arenguetappidel, mida *in vivo* on embrüot kahjustamata võimatu uurida. Lisaks võib hES rakkude kindlas suunas diferentseerimine aidata tuvastada sihtmärkgeene uute ravimite välja töötamisel ning transplantatsiooniga seotud probleemide lahendamisel. (Thomson et al., 1998)

1.2.1. Ektodermaalne diferentseerumine

Imetaja arengu käigus moodustuvad ektodermist neuraalhari, neuraaloru ning epidermis. Neuraalhari paneb aluse näiteks pea- ja näopiirkonna kõhrelistele struktuuridele, pigmenti sünteesivatele melanotsüütidele ning erinevatele ganglionidele. Neuraalorust arenevad seljakeelik ning erinevad ajupiirkonnad. (Gilbert, 2010)

Normaalse arengu tagamiseks on ektodermaalsel diferentseerumisel oluline roll mitmetel signaalmolekulidel. Neuraaloru sulgumine on imetajate arengus väga oluline, sõltudes geneetiliste ning keskkonnafaktorite keerukast vastasmõjust. Geenidest on neuraaloru

sulgumisel väga olulised *Pax3* ning *sonic hedgehog*, kuid on näidatud ka kolesterooli ja foolhappe olulisust. Sonic hedgehog osaleb dorsaal-ventraalse telje kujunemisel koos TGF- β perekonna valkudega (Gilbert, 2010). *Otx2* (*orthodenticle homeobox 2*) olulisust aju varajasel arengul on näidatud nii hiirel kui ka inimesel (Larsen et al., 2010). Ühtlasi on *Otx2* üks varasemaid geene, mis neuroektodermis ekspresseeritud (Rhinn et al., 1998), seega seda saab kasutada neuraalse suuna markerina. Lisaks saab neuraalse suuna markerina kasutada veel *Pax6*, mis on väga oluline imetajate silmade arengus (Gilbert, 2010).

Hiire embrüonaalsete tüvirakkude puhul on näidatud, et *in vitro* on võimalik nende diferentseerumist neuraalses suunas indutseerida retinoolhappega. Rakud olid pärast retinoolhappega töötlemist fenotüübilt sarnased neuronitega ning ekspresseerisid neuraalse suunaga seotud geneetilisi markereid. (Bain et al., 1995)

1.2.2. Endodermaalne diferentseerumine

Endodermil on kaks peamist ülesannet – see indutseerib mitmete mesodermaalsete organite moodustumist ning paneb aluse ka seede- ja hingamiselundkonna moodustumisele, formeerides nende epiteliaalse voodri. Sooltoru on algne seede- ning hingamiselundkonna prekursor, mis jaguneb ees-, kesk- ja tagasooleks. Eessool moodustab lateraalses osas neelu- ehk lõpustaskud, mida imetajatel on neli paari. Lõpustaskutest kujunevad välja kuulmetõrved, kurgumandlid, tüümus, kõrvalkilpnäärme sagarad ning kilpnääre. Eessoole tagaosast sopistub välja bronhiaaljätke, millest lõpuks arenevad kopsud. Kesksoolest arenevad jätketena välja maks ning pankreas. Tagasoolest sopistub välja allantois ehk loote kusekott. (Gilbert, 2010)

Varajases embrüogeneesis on oluline *Grb2* (*growth factor receptor-bound protein 2*), mis on vajalik osade ICM rakkude diferentseerumisel primitiivsesse endodermi, et embrüo saaks implanteeruda. *Grb2*-puudulike hiirte puhul on näidatud, et rakud ei ole võimelised diferentseeruma parietaalsesse ega vistseraalsesse endodermi ning embrüo areng seiskub (Cheng et al., 1998). Primitiivse endodermi moodustumisel on väga olulised ka *Gata4* ning *Gata6*, mille ekspressioon on indutseeritud *Grb2*-sõltuvate signaalide kaudu (Chazaud et al., 2006). Definiitivse endodermi moodustumisel ning säilitamisel on oluline roll transkriptsioonifaktoril *Sox17* [*SRY (sex determining region Y)-box17*] (Kanai-Azuma et al., 2002), mida kasutatakse ka endodermaalse suuna spetsiifilise markerina.

In vitro on diferentseeritud erinevaid endodermaalseid rakupopulatsioone. On näidatud, et hES rakkude suunatud diferentseerumisel on võimalik saada maksa rakke, millel on küpse hepatotsüüdi omadused (Cai et al., 2007). Samuti on saadud pankrease saarekestele omaste tunnustega rakke, mis on võimelised insuliini sünteesima (D'Amour et al., 2006). Näidatud on

ka kopsu (Dye et al., 2015) ning loote soolestiku organoidide moodustamist (Spence et al., 2011).

1.2.3. Mesodermaalne diferentseerumine

Neurula staadiumis jaguneb mesoderm viieks regiooniks: kordomesoderm, paraksiaalne ehk somiitide dorsaalne mesoderm, vaheline ehk intermediaarne mesoderm, külglaatide mesoderm ning pea mesoderm. Kordomesoderm moodustab seljakeeliku, mis määrab kogu organismi anterioorse-posterioorse telje ning indutseerib neuraaloru arengut. Somiitide dorsaalse mesodermi rakud moodustavad neuraaloru mõlemale poole somiidid, millest edasise arengu käigus moodustuvad mitmed seljapiirkonnas asuvad lihased, luud, kõhred ning dermis. Intermediaarsest mesodermist areneb välja urogenitaalsüsteem, moodustades neerud, gonaadid ning nendega seotud juhad. Külglaatide mesodermist arenevad välja süda, veresooned ja -rakud, kõhu- ning rinnaõõnsuste sisevooder ja jäsemete mesodermaalsed komponendid, v.a. lihased. Pea mesodermist arenevad näo sidekoed ning muskulatuur. (Gilbert, 2010)

Mesodermaalsel diferentseerumisel on olulised mitmed signaalmolekulid. BMP-4 (*bone morphogenetic protein*) on kaasatud mesodermi moodustumisel ning arengusuundade jagunemisel nii enne kui ka pärast gastrulatsiooni. On näidatud, et lühiajaline (24h) hES rakkude töötlus BMP-4 suunab rakud *in vitro* varajasse mesodermi (Zhang et al., 2008). BMP poolt indutseeritud diferentseerumist vahendavad transkriptsioonifaktorid BRACHYURY (BRA) ning CDX2 (Bernardo et al., 2011). Hiirtel on näidatud, et Bmp-4 puudumisel mesodermi ei moodustu ning embrüod surevad. (Winnier et al., 1995) BRA on oluline varajasel mesodermaalsel arengul, mistõttu saab seda kasutada mesodermaalse suuna markerina rakkude diferentseerumise kontrollimisel. Hiire embrüod, kus puudub normaalne *Bra* ekspressioon, ei suuda moodustada seljakeelikut, posterioorset regiooni ega allantoiisi ning surevad umbes kümnendal päeval (Herrmann et al., 1990). HAND1 on oluline südame moodustumisel ning seda saab samuti mesodermaalse markerina kasutada (Togi et al., 2004).

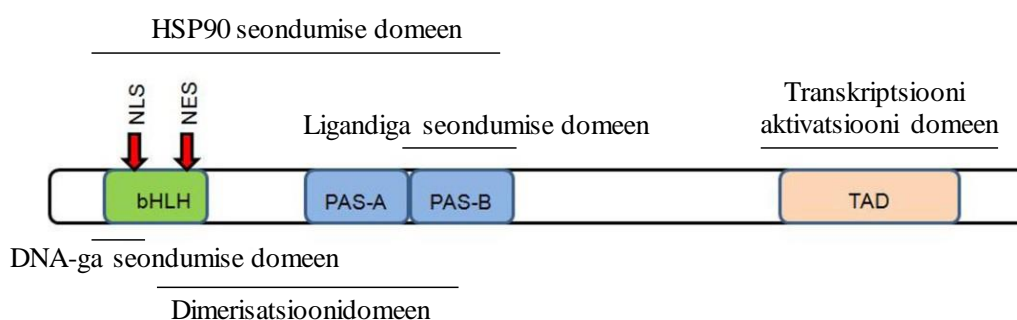
ES rakkude mesodermaalsel diferentseerumisel *in vitro* on palju näidatud. Kõige paremini on kirjeldatud hematopoeetilist arengut nii hiire kui ka inimese ES rakkude puhul (Keller, 2005). Samuti on näidatud, et hES rakud on võimelised *in vitro* kardiomyotsüütideks diferentseeruma (Graichen et al., 2008).

1.3. Arüüsüsivesinike retseptor

Arüüsüsivesinike retseptor ehk AHR on samanimelise geeni poolt kodeeritud ligand-aktiveeritav valk, mis kuulub aluseliste heeliks-ling-heeliks (bHLH – *basic helix-loop-helix*) transkriptsioonifaktorite perekonda (NCBI d). AHR on enim tuntud kui keskkonnakemikaalide

kahjutustaja organismis, aktiveerides mitmete ensüümide geene, mis vastutavad ksenobiootiliste kemikaalide metaboolse lagundamise eest. (Schmidt ja Bradfield, 1996; Uniprot)

Inimese *AHR* geen asub seitsmenda kromosoomi lühikeses õlas ning sellelt kodeeritakse 7 erinevat transkripti, millest kahelt kodeeritakse valku (Ensembl). *AHR* on 848 aminohappejäägist koosnev valk, mille molekulmass on 96 kDa. *AHR*-i valgul on neli domeeni, millest kaks on konserveerunud (Uniprot). N-terminaalses osas asub bHLH motiiv, mida esineb ka teistel transkriptsioonifaktoritel, nagu näiteks Myc, ning see on kaasatud DNA-ga seondumisel ning hetero- või homodimerisatsioonil. C-terminaalse transkriptsiooni aktivatsiooni domeeni glutamiinirikas piirkond on vajalik sihtmärkgeenide transkriptsiooniliseks aktivatsiooniks. C-terminaalse osa läheduses asub 250 aminohappejäägist koosnev PAS (PER-ARNT-SIM) domeen, mis koosneb kahest hüdrofoobsest kordusjärjestusest – PAS A ja PAS B – mis osalevad dimerisatsioonil. (Mimura ja Fujii-Kuriyama, 2003) *AHR*-i ligandi siduv domeen kattub osaliselt PAS B regiooni ja Hsp90 seondumissaidiga, mis hoiab *AHR*-i struktuurselt kompetentsena ligandiga seondumiseks (Coumailleau et al., 1995) (Joonis 1).



Joonis 1. *AHR* valgu struktuur. *AHR* valk sisaldab domeene, mis on vajalikud selle funktsioneerimiseks: aluseline heeliks-ling-heeliks domeen (bHLH), milles sisalduvad tuuma lokaliseerimise (NLS) ning ekspordisignaali (NES), C-terminaalne transkriptsiooni aktivatsiooni domeen (TAD) ning PAS A/B domeenid, mis on vajalikud ligandidega seondumiseks ning dimerisatsiooniks (Modifitseeritud, Lindsey ja Papoutsakis, 2012).

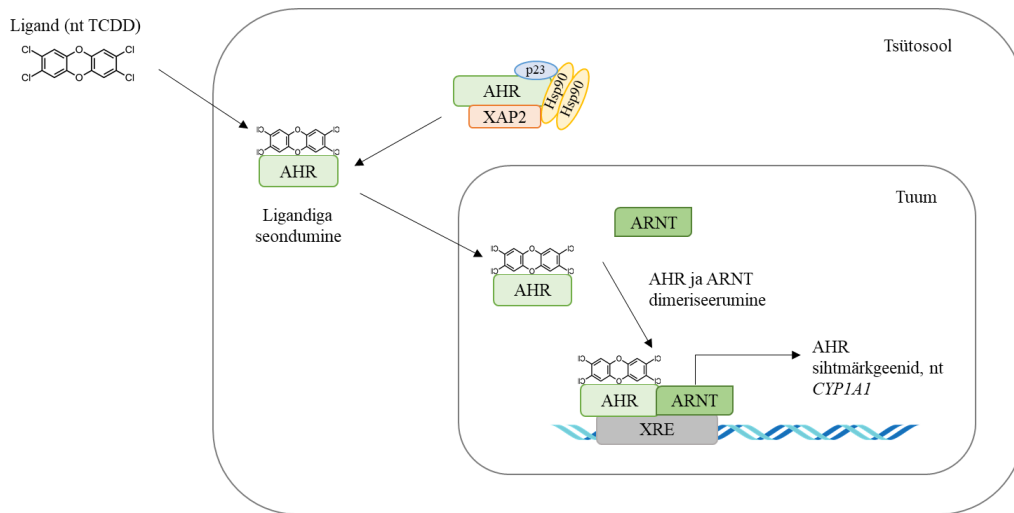
Arüülsüvesinike retseptoril on mitmeid erinevaid ligande, mis jaotatakse tavaliselt kahte gruppi: sünteetilised ehk ksenobiootilised ja organismi poolt sünteesitud ehk endogeensed. Enim on uuritud ksenobiootilisi ühendeid, mille hulka kuuluvad mitmed halogeenitud (HAH – *Halogenated Aromatic Hydrocarbon*) ja polütsüklilised aromaatsed süsivesinikud (PAH – *Polycyclic Aromatic Hydrocarbon*) (Whitlock, 1999). HAH hulka kuuluvad dibensodioksiinid, dibensofuraanid ning bifenüülid, PAH hulka mitmed aromaatsed amiinid, bensopüreen ning bensoflavoonid. Suurima afiinsusega *AHR*-i ligand on 2,3,7,8-tetraklorodibenso-*para*-dioksiin

ehk TCDD. Seetõttu kasutatakse seda enim AHR-i funktsioonide uurimisel. (Birnbaum, 1995) Endogeensete ligandide hulka kuuluvad indooli sisaldavad kemikaalid, näiteks trüptofaani derivaadid (Heath-Pagliuso et al., 1998; Miller). AHR-i on võimelised aktiveerima ka inimese uriinis leiduvad indigo ja indirubiin (Adachi et al., 2001). Leidub ka antagonistid, mis AHR-i aktiivsust pärssivad, nagu näiteks 7-ketokolesterool, mis interakteerub AHR-iga ning takistab seeläbi selle seondumist DNA-le (Savouret et al., 2001).

1.3.1. Arüülsüivesinike retseptori signaalirada

Ligandi puudumisel asub inaktiivne AHR tsütoplasmas, kus ta on kompleksis kuumašoki valguga HSP90 (*heat shock protein 90*), *co-chaperon*'iga p23 ning XAP2 valguga (HBV X-associated protein 2) (Kazlauskas et al., 1999; Meyer et al., 1998). Ligandide puudumisel on AHR-i tuuma lokalisatsiooni signaal (NLS – *nuclear localization signal*) varjatud HSP90 molekulide poolt. Ligandiga seondumisele järgnevad konformatsioonilised muutused, AHR dissotsieerub kahest HSP90 molekulist, paljastades seejärel NLS, mis võimaldab AHR-il tsütoplastast tuuma translokeeruda. (Ikuta et al., 1997) Tuumas moodustab AHR arüülsüivesinike retseptori tuuma translokaatoriga (ARNT – *aryl hydrocarbon receptor translocator*) heterodimeeri. AHR-ARNT heterodimeer on võimeline seonduma spetsiifilistele DNA järjestustele, mida nimetatakse XRE (*xenobiotic response element*), tuntud ka kui AHRE (*AHR response element*) või DRE (*dioxin response element*), mis sisaldab järjestust 5'-GCGTG-3'. Dioksiini poolt aktiveerituna seondub AHR-ARNT heterodimeer ksenobiootilisele vastuselemendile XRE, mis asub näiteks *CYP1A1* enhaanserregioonis, ning käitub kui transkriptsioonifaktor (Joonis 2). (Matsushita et al., 1993; Shen ja Whitlock, 1992)

AHR-ARNT kompleks on võimeline seonduma *AHRR*-i (*AHR repressor*) promootorile ning aktiveerima transkriptsiooni. *AHRR* funktsioneerib kui AHR-i negatiivne regulaator, takistades AHR-i dimeriseerumist ARNT-iga seejuures ise ARNT-iga seondudes. Dimeriseerumata AHR transporditakse tuumast välja ning lagundatakse proteasoomides. *AHRR*-ARNT dimeer tunneb samuti ära XRE järjestuse, kuid käitub kui transkriptsiooni repressor (Evans et al., 2008; Mimura ja Fujii-Kuriyama, 2003).



Joonis 2. Arüülsüivesinike retseptori signaalirada. Inaktiivne AHR asub tsütoplasmas kompleksis erinevate valkudega. Ligandiga seandumisel järgnevad konformatsioonilised muutused ning AHR vabaneb *chaperonidest* ning liigub tuuma, kus dimeriseerub ARNT-iga. AHR-ARNT heterodimeer seondub sihtmärkgeenide enhaanserregioonis olevatele vastuselementidele ning initsieerib nende transkriptsiooni (Modifitseeritud, Callero ja Loaiza-Pérez, 2011).

1.3.2. Arüülsüivesinike retseptori roll organismis

AHR on enim tuntud kui keskkonnakemikaalide kahjutustaja, kuid nüüdseks on sellele leitud ka teisi funktsioone erinevates organismides. Nagu eelnevalt mainitud, on AHR-i sihtmärkgeenideks ksenobiootilisi ühendeid metaboliseerviate ensüümide ning ka AHRR geenid. Lisaks nendele on AHR-i ligandide poolt indutseeritud geenid, mis on kaasatud rakujagunemises, rakutsükli regulatsioonis ning apoptoosis. Enamik nendest geenidest sisaldavad XRE järjestust regulatoorses regioonis, mis viitab sellele, et ligand-aktiveeritud AHR reguleerib nende geenide ekspressiooni otse XRE järjestusele seondues (Bekki et al., 2015; Chang et al., 2014; Mimura ja Fujii-Kuriyama, 2003). Arvatakse, et AHR-ARNT süsteem vahendab mitmesuguseid TCDD-sarnaste keskkonna saasteainete bioloogilisi efekte ning põhjustab seeläbi kartsinogeneesi, teratogeneesi, soodustab tuumorite teket ning immunosupressiooni (Courtney ja Moore, 1971; Kociba et al., 1978; Kremer et al., 1994). Inimese puhul on AHR-i puudumisel esinevaid tagajärgi üsna keeruline uurida ning seetõttu on enamasti informatsiooni pärit hiirtega tehtud katsetest. AHR-i olulisust on näidatud isegi selgrootute puhul. Selgrootute AHR-i isovormil, nagu *Drosophila melanogaster* Spineless (Ss) puudub detoksikatsiooni funktsioon, kuid on vajalik silmade, jalgade ning tiibade arengus (Céspedes et al., 2010). *Caenorhabditis elegans* puhul on näidatud AHR-i olulisust neuronalsel diferentseerumisel ning migratsioonil (Qin et al., 2006; Qin ja Powell-Coffman, 2004).

Ahr-puudulike hiirte kasvukiirus kolmel esimesel elunädalal on märgatavalt aeglasem võrreldes normaalsete hiirtega ning nende immuunsüsteem ja maks on defektselt arenenud (Schmidt et

al., 1996). Täiskasvanud *Ahr*-puudulikel hiirtel on lisaks kirjeldatud ebanormaalsed maksa ning neeru vaskulaarstruktuure, hiired on küll elujõulised, kuid nende maks on ligikaudu 30% väiksem kui metsiktüüpi hiirtel. Osaliselt on väiksema maksa põhjuseks hepatotsüütide kahanenud suurus (Lahvis et al., 2000).

Ahr reguleerib lümfotsüütide, makrofaagide ning dendriitrakkude aktiivsust, osaleb B-rakkude küpsemisel ning T-rakkude diferentseerumisel ja on üks võtmefaktoritest tsütokiinide vabastamisel ning tasakaalu hoidmises (Nguyen et al., 2013).

Arüülsüivesinike retseptoril on füsioloogiline roll munasarja arengus, mis mõjutab reproduktiivset võimekust. See võib olla seotud muutustega hiire munasarjas paiknevate primordiaalsete folliikulite arvukuses ja nende moodustumises neonataalses ning antraalsete folliikulite arvukusega postnataalses arenguetapis (Benedict et al., 2000). *Ahr*-puudulikel emastel hiirtel on veel kirjeldatud raskusi tiinuse säilitamisega, imetamisega ning järglaste imetamisest võõrutamiseni kasvatamisega (Abbott et al., 1999).

Inimese arüülsüivesinike retseptori mRNA on kõrgelt ekspresseeritud platsentas, kopsudes, südames, pankreases ning maksas ja madalalt ekspresseeritud ajus, neerudes ning skeletilihastes (Dolwick et al., 1993). On näidatud, et *AHR* on kõrgelt ekspresseeritud atoopilise dermatiidi ning psoriaasiga patsientide kahjustunud nahas (Kim et al., 2014). *AHR*-i ekspressiooni on näidatud ka inimese reetina pigmenteeritud epiteelirakkudes, mis mängivad väga olulist rolli reetina füsioloogias ning nägemistsüklis. Mitmed uuringud on näidanud, et *AHR* on oluline tegur retinaalsete haiguste tekkes, sealhulgas ealine maakula degeneratsiooni (Jin ja Jeong, 2016).

Suurenenud *AHR*-i ekspressiooni on näidatud mitmes erinevas inimese vähitüübis, sealhulgas kopsu-, rinna- ning kõhunäärmevähis (Koliopanos et al., 2002; Lin et al., 2003; Schlezinger et al., 2006). *CYP1B1* on detoksifikatsiooni geen, mida aktiveerib arüülsüivesinike retseptor ning selle üleekspressiooni on samuti näidatud mitmes erinevas vähitüübis, nagu näiteks söögitoru-, jämesoole- ja nahavähis. Seejuures ei ole täheldatud *CYP1B1* ekspressiooni vastavates normaalsetes kudedes (Murray et al., 1997).

1.3.3. *AHR*-i roll tüvirakkudes

AHR-i olulisust on täheldatud ka erinevate tüvirakkude puhul. Viimased uuringud on näidanud, et TCDD-poolne *Ahr*-i aktivatsioon blokeerib tiinetel hiirtel hematopoeetiliste tüvirakkude pikaajalist iseuuenemist (Laios et al., 2015). Lisaks on näidatud, et püsiv *Ahr*-i aktivatsioon varasel hiire embrüonaalsete tüvirakkude diferentseerumisel häirib südame mesodermi kasvu ja kardiomyotsüütide funktsioneerimiseks vajalikke signaale (Wang et al., 2016). *Ahr* on

oluline hematopoeesi reguleerimisel, käteldes negatiivse regulaatorina, mis piirab liigset ning ebavajalikku rakkude jagunemist. Dioksiiniga töödeldud *Ahr*-puudulike hiirte hematopoeetilised tüvirakud on hüperproliferatiivsed ning omavad muutunud rakutsükli (Gasiewicz et al., 2014).

Varasemalt on tehtud katseid, kus diferentseeriti *Ahr*-puudulike ning metsiktüüpi hiirte embrüonaalsed fibroblastid adipotsüütideks. Selgus, et *Ahr*-i puudumine viis rakud spontaanse diferentseerumise ning rakkude vananemiseni, mis võib olla tingitud sellest, et *Ahr* on varajane regulaator adipotsüütide diferentseerumisel (Alexander et al., 1998).

Ahr-i on hiires seostatud pluripotentsusega, kuna selle ekspressioon on transkriptsiooniliselt represseritud hiire embrüonaalsetes tüvirakkudes signaaliraja kaudu, mis kaasab transkriptsioonifaktoreid Oct4, Nanog ning Sox2. Selline repressioon on pöörduv ning rakkude diferentseerumisel aktiveeritakse *Ahr*-i ekspressioon. (Ko et al., 2014)

Inimese embrüonaalsete tüvirakkude ning AHR-i vaheliste seoste kohta leidub vähe informatsiooni. Varasemalt on meie laboris uuritud AHR-i ekspressiooni ning selle agonisti/antagonisti mõju inimese ES rakkude pluripotentsusele. Tulemused näitasid, et AHR on ekspresseeritud ES rakkudes, kuid agonist/antagonist ei avaldanud mõju pluripotentsusele ega rakutsükli (Hermann, 2013). Järgnevalt uuriti, kas hiire ES rakkude peal nähtu on kehtiv ka inimese ES rakkude diferentseerumisel. Leiti, et vastupidiselt hiire ES rakkudele, kus diferentseerumisel *Ahr*-i ekspressioon suurenes, inimese ES rakkude varasel diferentseerumisel AHR-i ekspressioon hoopis vähenes nii mRNA kui ka valgu tasemel (Uudeküll, 2016).

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

Eelnevat arvesse võttes oli käesoleva töö eesmärgiks selgitada, kuidas muutub AHR-i hulk ajas hES rakkude diferentseerimisel kolme lootelehe suunas.

2.2. Materjal ja metoodika

2.2.1. Kasutatud rakuliin, söötmed ja kemikaalid

Katsetes kasutati inimese embrüonaalsete tüvirakkude liini H9 (WA09) (WiCell Research Institute, National Stem Cell Bank). Embrüonaalseid tüvirakke kasvatati Matrigel™-iga (BD Biosciences) kaetud 6-kannulistel plaatidel mTeSR™1 (STEMCELL Technologies) söötmes 37°C ja 5% CO₂ juures. Üksikrakulise suspensiooni tegemiseks kasutati GCD reagenti (*gentle cell dissociation reagent* – STEMCELL™ Technologies). Rakke loendati Countess II rakuloenduriga (Thermo Fisher Scientific). Rakkude kasvamisel üksikrakulisena lisati nende elulemuse tõstmiseks passeerimise päeval söötmesse rho-sõltuva proteiinkinaasi (ROCK – Rho-associated protein kinase) inhibiitorit (10 µmol, Bio-Techne). Rakkude passeerimise ning diferentseeritud rakkude lüüsimise käigus kasutati PBS-i (Lonza Group Ltd) ja KnockOut™ DMEM (*dulbecco's modified eagle medium*) söödet (Thermo Fisher Scientific). Tüvirakkude diferentseerimiseks neuraalseteks eellasrakkudeks, varajase mesodermi ning definitiivse endodermi rakkudeks kasutati spetsiaalseid STEMdiff™ induktsiooni söötmeid (STEMCELL™ Technologies) ning toimiti vastavalt tootja protokollidele.

2.2.2. Rakkude kasvatamine ja diferentseerimine

Inimese embrüonaalseid tüvirakke passeeriti iga 3-4 päeva tagant. Tüvirakkude passeerimisel eraldati hES rakkude kolooniate tükid manuaalselt pipetiotsikuga kraapides ning tõsteti seejärel uuele Matrigel™-iga kaetud plaadile. Söödet vahetati igapäevaselt.

Neuraalsel diferentseerimisel pesti hES rakke 2ml PBS-iga. Rakud dissotsieeriti 1 ml GCD reagentiga, inkubeerides neid 8 minutit koekultuuri inkubaatoris 37°C ja 5% CO₂ juures. Seejärel rakud suspendeeriti ning tõsteti 1ml-sse KnockOut™ DMEM söötmega tuubi. Kanne pesti üks kord 1 ml söötmega, mis lisati rakususpensioonile. Rakke tsentrifuugiti 5 minutit 300 x g juures. Supernatant aspireeriti ning rakud resuspendeeriti STEMdiff™ neuraalse induktsiooni söötmes, millesse oli lisatud ROCK inhibiitorit (10µM). Rakkude loendamiseks segati 10 µl rakususpensiooni 10 µl trüpaansinisega (Thermo Fisher Scientific) ning kasutati lugemiskambreid, kuhu pipeteeriti 10 µl segu. Seejärel sisestati kambrid masinasse, mis teostas lugemise. Rakke loendati kahes kambris ning elusrakkude arvutamisel arvestati kahe loendamistulemuse keskmist. Seejärel pipeteeriti sobiv kogus (Joonis 3) rakususpensiooni

Matrigel™-iga kaetud 6-kannulistele plaatidele ning lisati neuraalse induktsiooni söödet kuni 2 ml-ni. Plaadid asetati koekultuuri inkubaatorisse 37°C juurde. Rakke diferentseeriti 7 päeva vältel ning neuraalse induktsiooni söödet vahetati igapäevaselt. Iga päev lüüsi ükss kann rakke.

p1	p2	p3	p4	p5	p6	p7
1 M	1 M	1 M	1 M	850 k	750 k	500 k

Joonis 3. Rakkude jaotus neuraalseks diferentseerimiseks päevade kaupa. M – miljon, k – tuhat.

Definiitivse endodermi ja varajase mesodermi diferentseerimiseks pesti hES rakke 2 ml PBS-iga (*Phosphate Buffered Saline*). Aspireerimise järel pipeteeriti rakkudele 1 ml rakkude GCD reagenti, millega inkubeeriti rakke koekultuuri inkubaatoris 37°C juures 8 minutit. Seejärel rakud suspendeeriti ning tõsteti tuubi, kus oli 1 ml DMEM söödet. Kanne pesti 1 ml DMEM söötmega, mis lisati tuubis olevale rakususpensioonile. Rakke tsentrifugeeriti 300 x g juures 5 minutit. Supernatant aspireeriti ning rakud resuspendeeriti ROCK inhibiitoriga (10 µl) mTeSR1™ söötmes. Rakkude loendamise teostas masin nagu eelnevalt kirjeldatud. Erinev kogus rakke lisati Matrigel™-iga kaetud 6-kannulistele plaatidele (Joonis 4 ja 5). Rakkudele lisati mTeSR1™ söödet 2 ml-ni ning asetati koekultuuri inkubaatorisse 37°C juurde. Üks päev pärast passeerimist lüüsi esimese ajapunkti rakud, teistel vahetati mTeSR1™ sööde spetsiaalse diferentseerimissöötme vastu.

Endodermaalseks diferentseerimiseks lisati pärast PBS-i pesu rakkudele STEMdiff™ definiitivse endodermi basaalsööde, millele oli lisatud lisandid A ja B (mõlemad suhtega 1:100). Järgnevatel päevadel lisati rakkudele basaalsööde, milles oli lisand B (1:100). Rakke diferentseeriti kuni viienda päevani ning iga päev lüüsi üks kann rakkudega.

Mesodermaalseks diferentseerimiseks aspireeriti rakkudelt mTeSR1™ sööde ning pesti 2 ml PBS-iga. Seejärel lisati 2 ml STEMdiff™ mesodermi induktsiooni söödet, mida vahetati igapäevaselt. Rakke diferentseeriti kuni viienda päevani ning iga päev lüüsi üks kann rakkudega.

p1	p2	p3	p4	p5
1,5 M	1 M	1 M	1 M	1 M

Joonis 4. Rakkude jaotus endodermaalseks diferentseerimiseks päevade kaupa. M – miljon.

p2	p3	p4	p5
1 M	500 k	500 k	250 k

Joonis 5. Rakkude jaotus mesodermaalseks diferentseerimiseks päevade kaupa. M – miljon, k – tuhat.

2.2.3. RNA eraldamine

Rakud lüüsi FARB puhvril, millele oli lisatud 2-merkaptotoetanooli ning RNA eraldati FavorPrep™ RNA eraldamise komplektiga (Favorgen Biotech Corp) vastavalt tootja protokollile.

Rakud lüüsi 350 µl FARB puhvril, millele oli lisatud 3,5 µl 2-merkaptotoetanooli. Teostati vortex ning lüsaat kanti filterkolonnile, fuugiti 18 000 x g juures 2 minutit. Filtri läbinud supernatant pipeteeriti mikrotsentrifuugituubi ning sellele lisati üks voluum (350 µl) 70% etanooli. Etanooliga proov kanti FARB minikolonnile ning tseentrifuugiti 18 000 x g juures 1 minut. Supernatant visati minema ning minikolonnile lisati 500 µl pesupuhvrit 1, seejärel tseentrifuugiti 18 000 x g juures 1 minut. Supernatant visati ära ning minikolonnile pesti 2 korda pesupuhvriga 2 ning tseentrifuugiti 18 000 x g juures 1 minut. Supernatant visati minema ning FARB minikolonnile tseentrifuugiti kuivatamiseks 18 000 x g juures 3 minutit. FARB minikolonn asetati elueerimistuubi ning filtri keskele lisati 30 µl RNAasi-vaba vett, millel lasti seista 1 minut ning seejärel tseentrifuugiti 18 000 x g juures 2 minutit. Tseentrifuugimise järel korrati viimast sammu, võttes tuubist 30 µl eluaati ning pipeteerides selle uuesti filtri keskele. Tseentrifuugiti 2 minutit 18 000 x g juures. Saadud RNA kontsentratsiooni mõõdeti masinaga Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific) ning seejärel säilitati -80°C juures.

2.2.4. DNAasi töötlus ja cDNA süntees

Komplementaarse DNA sünteesiks viidi läbi pöördtranskriptsioon, milleks kasutati Thermo kit K1622 (Thermo Fisher Scientific) cDNA sünteesi komplekti. Esmalt teostati DNAasi (Thermo Fisher Scientific) töötlus, milleks segati kokku reaktsioonisegu mahuga 10µl. Reaktsioonisegu sisaldas 1µg RNA-d, reaktsioonipuhvrit (1x) (Thermo Fisher Scientific), DNAasi (1U), RNAasi inhibiitorit Ribolock (10U) (Thermo Fisher Scientific) ja vett. Reaktsioon toimus Applied Biosystems™ 2720 termotsükleris (Thermo Fisher Scientific) 37°C juures 30 minutit. Järgnevalt lisati reaktsioonisegule 1µl 50mM EDTA ning inkubeeriti 65°C juures 10 minutit termotsükleris. Komplementaarse DNA sünteesiks lisati reaktsioonisegule reaktsioonipuhvrit (1x), dNTP-d (1mM) ja heksameersete praimerite segu (5µM), Ribolocki (20U) ning revertaasi (200U). Pöördtranskriptsioon viidi läbi termotsükleris 25°C juures 10 minutit (praimerite

seondumine RNA matriitsile), 42°C juures 60 minutit (cDNA süntees) ning 70°C juures 10 minutit (revertaasi inaktivatsioon).

2.2.5. Kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon (qPCR)

Kvantitatiivse polümeraasi ahelreaktsiooni (qPCR – *quantitative polymerase chain reaction*) teostamiseks kasutati 384-kannulisi plaate. Igas kannus oli reaktsioonisegu lõppmahus 10µl, mis sisaldas 5µl Maxima SYBR Green-i (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) ning vastavate päri- ja vastassuunaliste praimerite segu ja 5µl cDNA-d. Praimerite järjestused on leitavad käesoleva töö lisadest (Lisa 1). Kvantitatiivse PCR-i läbiviimiseks kasutati LightCycler® 480 Instrument II masinat (Roche) ning programmi, mis on välja toodud joonisel 6. Katsete tulemused normaliseeriti koduhoidjageeni *TBP* (*TATA-binding protein*) väärtustega.

	Temperatuur	Aeg	Tsüklite arv
Algne denaturatsioon	95°C	10 minutit	1
Denaturatsioon	95°C	15 sekundit	40
Praimerite seondumine ja süntees	59°C	60 sekundit	
Sulamiskõver	45-95°C	7 minutit	1

Joonis 6. Kvantitatiivse PCR-i programm

2.2.6. SDS-PAGE ja Western blot

Rakke lüüsi RIPA puhvris (*Radioimmunoprecipitation assay buffer*) (50 mM Tris pH 7,4, 1% Triton X-100, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0,1% SDS), kuhu oli lisatud 1 x proteaasi inhibiitori segu (Roche). Valgulüsaate hoiti 45 minutit jääl ning iga 15 minuti järel tehti vortex. Valgulüsaate tsentrifuugiti 10 minutit 18 000 x g juures ning supernatant tõsteti uude tuubi. Valgu kontsentratsioonid mõõdeti Pierce™ BCA valgu kontsentratsiooni mõõtmise komplektiga (Thermo Fisher Scientific) 540 nm lainepikkuse juures Multiskan Ascent aparatis (Thermo Fisher Scientific).

Valgulüsaatidele lisati laadimispuhvri (Thermo Fischer Scientific) ja ditiotreitooli (100 µmol, AppliChem) segu ning seejärel hoiti neid 5 minutit termostaadil 95°C juures. Lüsaadid kanti 10% SDS-poliüakrüülamiid-elektroforeesgeelile (SDS PAGE – *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*). Valgud lahutati Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad) masinat kasutades 45 minuti jooksul 50 V ning hiljem ühe tunni jooksul 170 V juures. Elektroforeesi lõppedes pandi geelid ning eelnevalt metanoolis aktiveeritud polüvinülideen difluoriid (PVDF – *polyvinylidene difluoride*) membraanid 5 minutiks loksutite

ülekanepuhvrise (192 mM glütsiin, 0,1% SDS, 25 mM Tris-HCl pH 8,3, 10% metanool). Valgud kanti geelilt PVDF membraanile Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad) masinat kasutades 15 V juures 17 minuti jooksul. PVDF membraanid loputati pärast ülekannet TBST-s (*tris buffered saline + tween 20*) (0,1% Tween 20, 0,15 M NaCl, 50 mM Tris Ph 7,5) ning seejärel blokeeriti antikeha ebaspetsiifilise seondumise vähendamiseks ühe tunni jooksul TBST lahuses, mis sisaldas 5% lõssipulbrit. Pärast blokeerimist inkubeeriti membraane üleöö vastavate primaarsete antikehadega blokeerimislahuses. Inkubeerimise järel pesti membraane 4 korda 7 minutit TBST-s. Seejärel inkubeeriti sekundaarse antikehaga 1 tund toatemperatuuril. Tunni möödudes pesti membraane 4 korda 7 minutit TBST-s. Immobilon Western Chemiluminescent HRP (*horseradish peroxidase*) substraati (Merck Millipore) kasutades segati kokku reaktsioonisegu, mis kanti membraanidele ning inkubeeriti 5 minutit. Signaalid detekteeriti röntgenfilmil (Agfa) kasutades ilmutit ning kinnitit (Agfa). Densitomeetrilise analüüsi teostamiseks kasutati ImageJ tarkvara.

Kasutatud primaarsed antikehad:

- a) AHR-i vastane küüliku polükloonaalne antikeha, BML-SA-210, 1:5000 (Enzo Life Sciences)
- b) Aktiini vastane küüliku polükloonaalne antikeha, sc-1616-R, 1:1000 (Santa Cruz Biotechnology)

Kasutatud sekundaarsed antikehad

- a) Küüliku vastane kitse antikeha, sc-2004, 1:5000 (Santa Cruz Biotechnology)

2.2.7. Andmete statistiline analüüs

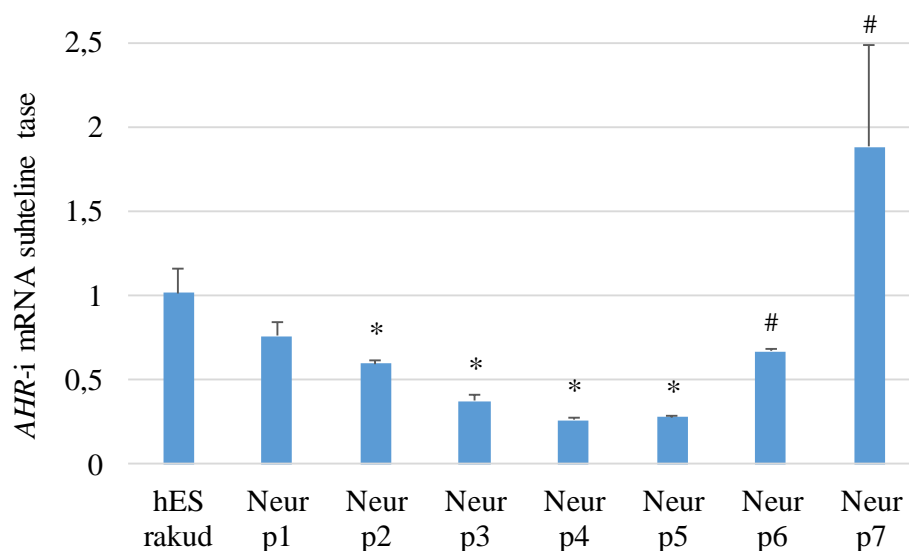
Kõik katsed viidi läbi kolmes korduses, leiti aritmeetiline keskmine ning statistiline analüüs viidi läbi MS Exceli abil. Tulemused on esitatud korduste aritmeetilise keskmisena, millele on märgitud veapiirid standardvea näol. Tulemuste statistiline olulisus on leitud MS Exceli t-testi abil, statistilise olulisuse nivooks on võetud $p < 0,05$.

2.3. Tulemused

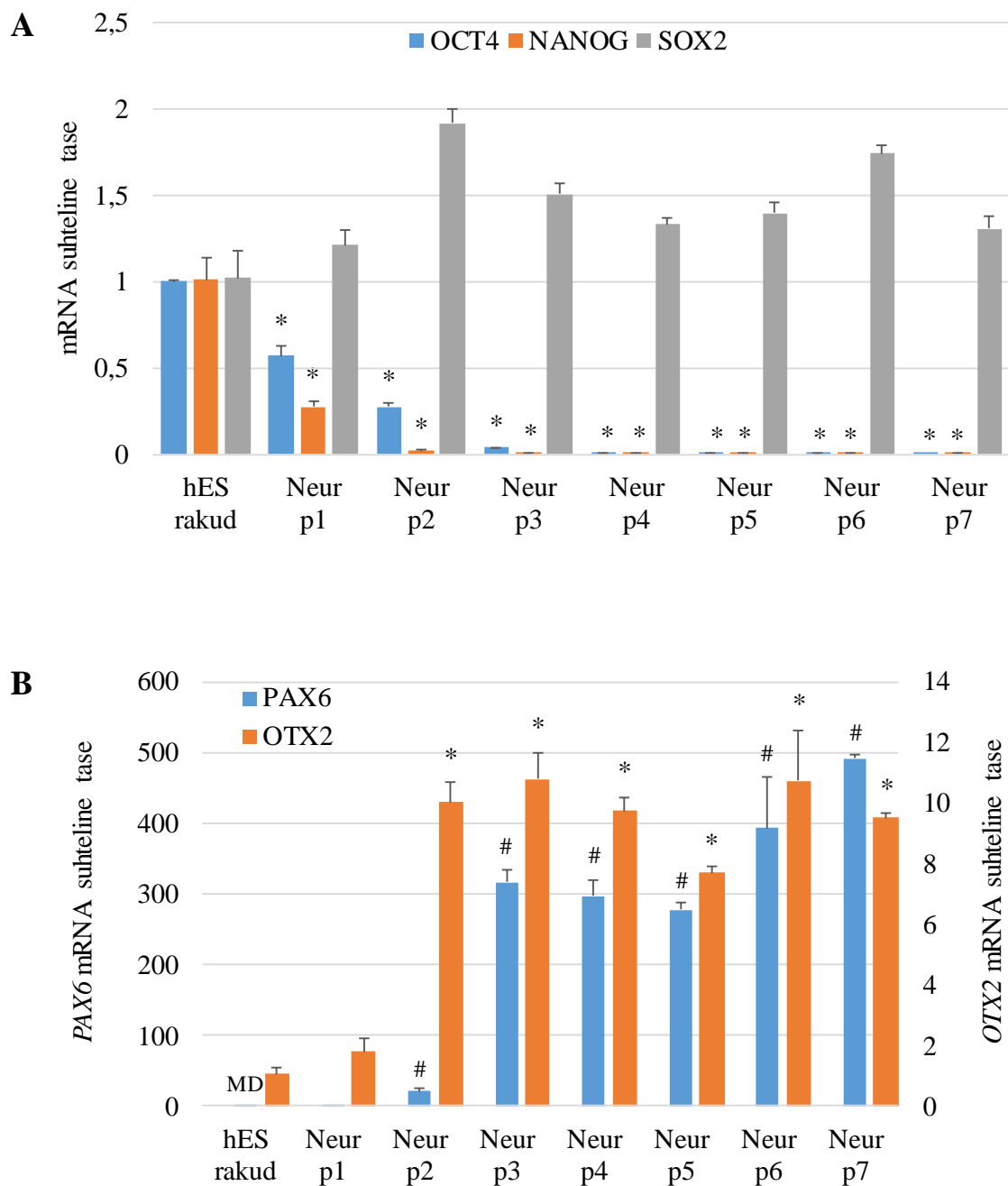
2.3.1. AHR-i ekspressioon neuraalsel diferentseerimisel

Uurimaks AHR-i ekspressiooni muutust ajas, pikema eesmärgiga selgitada AHR-i funktsiooni hES rakkudes ning nende diferentseeruvates järglastes, diferentseeriti hES rakke 7 päeva vältel STEMdiff™ neuraalse induktsiooni söötmes. Rakud lüüsi igapäevaselt mRNA ning valgu taseme analüüsiks.

Tulemustest selgus, et *AHR*-i ekspressioon oli oluliselt vähenenud teiseks päevaks (Joonis 7). Neljandal ja viiendal päeval täheldati umbes 70% ekspressiooni allaregulatsiooni. See-eest alates 6. päevast oli märgata *AHR*-i ekspressiooni olulist tõusu ning 7. päeval oli ekspressioon tõusnud viienda päevaga võrreldes ligikaudu 7 korda. Olemaks kindel, et rakud diferentseerusid, analüüsiti pluripotentsusmarkerite ekspressiooni. Selgus, et nii *OCT4* kui ka *NANOG*-i ekspressioon reguleeriti alla, kusjuures olulised muutused olid märgata juba esimesest päevast alates, *SOX2* ekspressioonis see-eest muutusi märgata ei olnud (Joonis 8 A). Lisaks analüüsiti järgnevalt ka suunaspetsiifiliste markerite *PAX6* ja *OTX2* ekspressiooni. Selgus, et mõlema geeni ekspressioon oli ülesreguleeritud (Joonis 8 B), mis veel kord kinnitas, et toimus hES rakkude diferentseerumine neuraalses suunas.

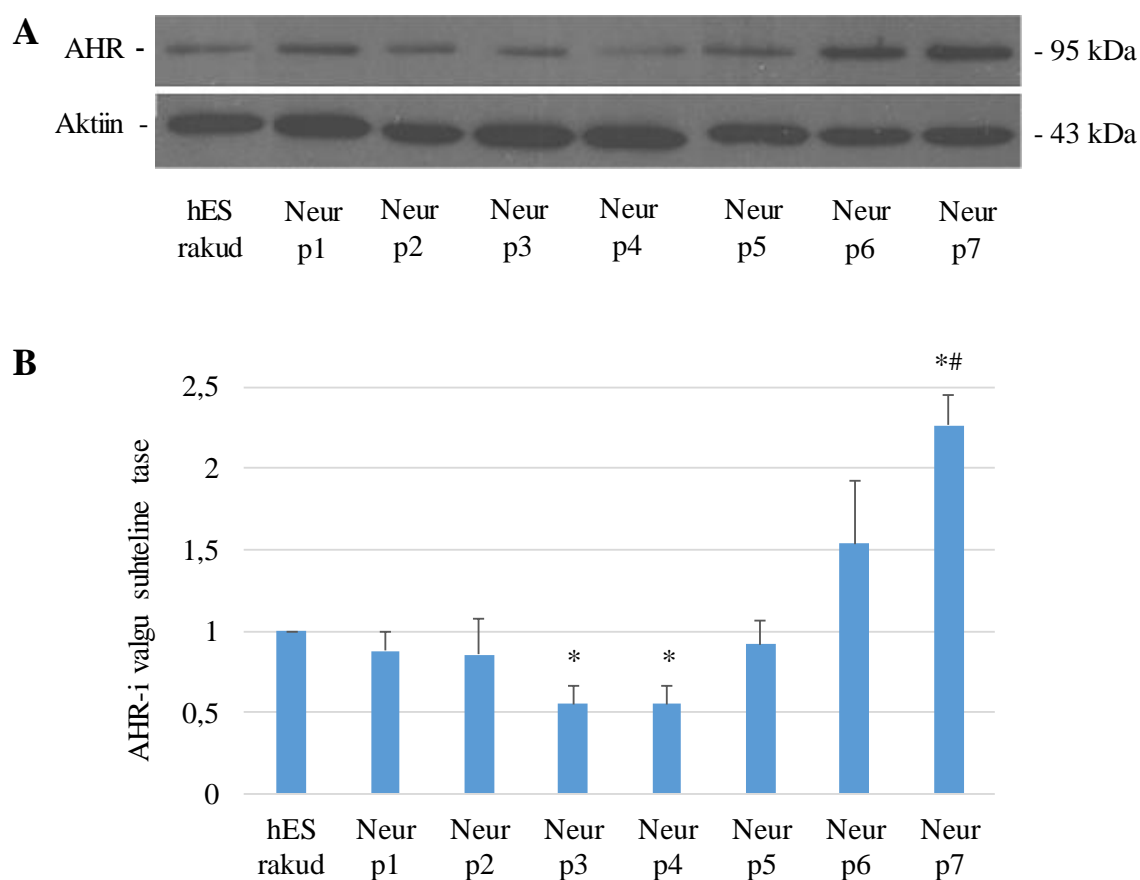


Joonis 7. *AHR*-i mRNA dünaamika hES rakkude varajasel neuraalsel diferentseerimisel. Inimese embrüonaalseid tüvirakke diferentseeriti neuraalses (Neur) suunas 7 päeva. *AHR*-i mRNA ekspressioon tuvastati RT-qPCR meetodil. (* $p < 0,05$ vs hES rakud; # $p < 0,05$ vs Neur p5).



Joonis 8. Pluripotentsusgeenide ning suunaspetsiifiliste markerite mRNA dünaamika hES rakkude varajasel neuraalsel diferentseerimisel. Inimese embrüonaalseid tüvirakke diferentseeriti neuraalses (Neur) suunas 7 päeva. Pluripotentsusgeenide (OCT4, NANOG ja SOX2) (A) ning spetsiifiliste suunamarkerite (PAX6 ja OTX2) (B) mRNA ekspressioon tuvastati RT-qPCR meetodil. (* $p < 0,05$ vs hES rakud; # $p < 0,05$ vs Neur p1; MD – mitte detekteeritud).

On teada, et muutused mRNA ekspressioonis ei pruugi alati põhjustada erinevusi valgu tasemes. Selgitamaks, kas eelpool nähtud *AHR*-i mRNA regulatsioon väljendub ka *AHR*-i valgu hulga muutuses, teostati Western blot analüüs *AHR*-i ning aktiini vastaste antikehadega. Tulemustest selgus, et sarnaselt mRNA-le reguleeritakse ka *AHR*-i valgu hulk neuraalse diferentseerimise käigus esmalt alla ning hilisemates ajapunktides taas üles (Joonis 9 A). Kvantifitseerimaks tehtud korduskatsete tulemusi, teostati ka densitomeetriline analüüs. Selgus, et võrrelduna hES rakkudega väheneb *AHR*-i valgu hulk oluliselt alates kolmandast päevast (Joonis 9 B). Lisaks täheldasime, et 7. päevaks oli *AHR*-i valgu hulk võrreldes neljanda päevaga taas suurenenud.

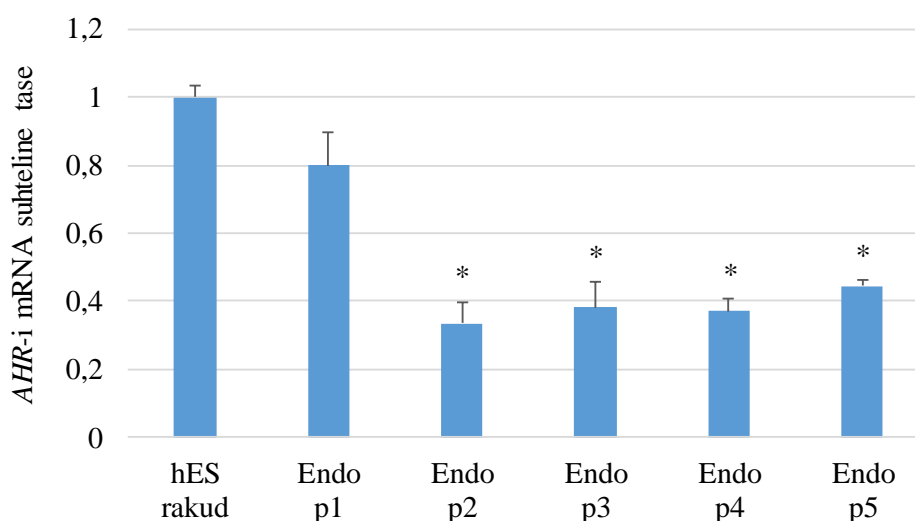


Joonis 9. *AHR*-i valgu hulga muutus hES rakkude neuraalsel diferentseerimisel. Western blot analüüs hES ning 7 päeva neuraalses suunas (Neur) diferentseeritud rakkudest *AHR*-i ning aktiini vastaste antikehadega (A). Western blottide densitomeetriline analüüs, mis näitab *AHR*-i valgu suhtelist muutust diferentseerimisel (B) (* $p < 0,05$ vs hES rakud; # $p < 0,05$ vs Neur p4).

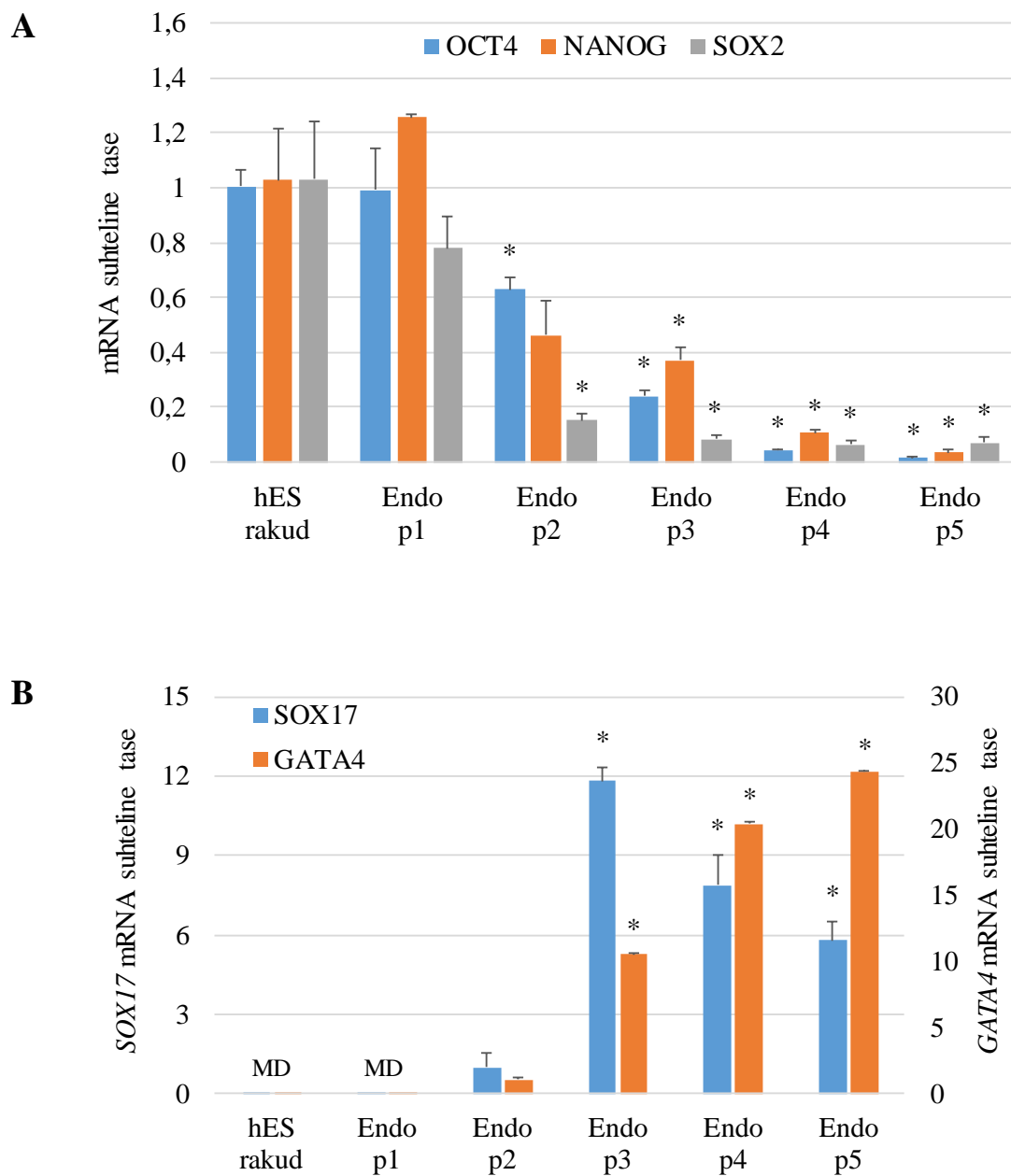
2.3.2 AHR-i ekspressioon endodermaasel diferentseerimisel

Selgitamaks AHR-i ekspressiooni muutust ajas endodermaasel diferentseerimisel, kasvatati rakke 5 päeva jooksul STEMdiff™ definitiivse endodermi söötmes. Rakud lüüsi igapäevaselt mRNA ning valgu taseme analüüsiks.

Tulemustest nähti, et *AHR*-i ekspressioon oli teiseks päevaks vähenenud umbes 60% võrra ning jäi sellele tasemele viienda päevani (Joonis 10). Veendumaks rakkude diferentseerumises analüüsiti ka pluripotentsusmarkerite ekspressiooni. Selgus, et nii *OCT4*, *NANOG*-i kui ka *SOX2* ekspressioon reguleeriti alla. *OCT4* ning *SOX2* puhul oli märgata olulist langust alates teisest ning *NANOG*-i korral alates kolmandast päevast (Joonis 11 A). Täiendavalt analüüsiti ka suunaspetsiifiliste markerite *SOX17* ja *GATA4* ekspressiooni. Antud suunamarkerid ei olnud ekspresseeritud hES rakkudes ning üks päev pärast passeerimist, kuid olid detekteeritavad alates teisest päevast. Seetõttu on järgnevate ajapunktide ekspressioonitasemed avaldatud võrrelduna ajapunktiga p2. Selgus, et mõlema geeni ekspressioon oli ülesreguleeritud (Joonis 11 B), mis kinnitas, et diferentseerimine endodermaalses suunas oli edukas.

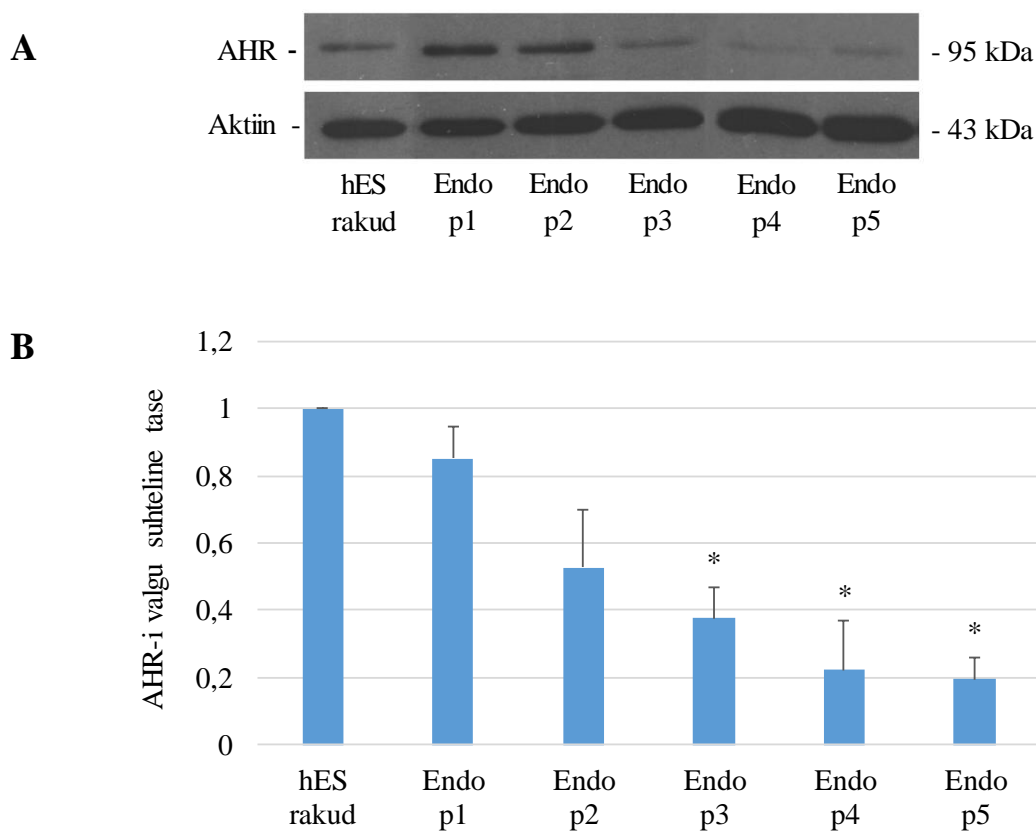


Joonis 10. *AHR*-i mRNA dünaamika hES rakkude varajasel endodermaasel diferentseerimisel. Endodermaalses (Endo) suunas diferentseeriti hES rakke 5 päeva. *AHR*-i mRNA ekspressioon tuvastati RT-qPCR meetodi abil (* $p < 0,05$ vs hES rakud).



Joonis 11. Pluripotentsusgeenide ning suunamarkerite mRNA dünaamika hES rakkude varajasel endodermaalsel diferentseerimisel. Endodermaalses (Endo) suunas diferentseeriti hES rakke 5 päeva. Pluripotentsusgeenide (*OCT4*, *NANOG* ja *SOX2*) (A) ja spetsiifiliste suunamarkerite (*SOX17* ja *GATA4*) (B) mRNA ekspressioon tuvastati RT-qPCR meetodi abil (* $p < 0,05$ vs Endo p2; MD – mitte detekteeritud).

Selgitamaks, kas valgu taseme muutus on mRNA muutustega kooskõlas teostati AHR-i ja aktiini vastaste antikehadega Western blot analüüs. Tulemustest selgus, et muutused AHR-i valgu hulgas on sarnased mRNA ekspressiooniga. AHR-i valgu tase reguleeritakse alates kolmandast päevast alla ning taseme vähenemise trend jätkub viienda päevani (Joonis 12 A). Korduskatsete tulemuste kvantifitseerimiseks teostati densitomeetriline analüüs. Selgus, et võrreldes hES rakkudega väheneb AHR-i ekspressioon oluliselt kolmandaks päevaks. Olgugi, et vähenev trend jätkus, ei olnud kolmandat ning viendat päeva võrreldes muutus statistiliselt oluline (Joonis 12 B).

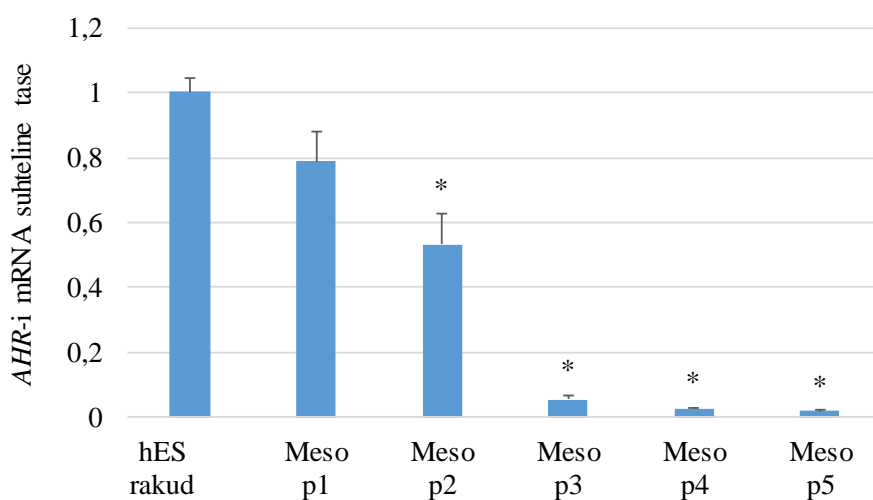


Joonis 12. AHR-i valgu hulga muutus hES rakkude endodermaalsel diferentseerimisel. Western blot analüüs hES ning 5 päeva endodermaalses suunas diferentseeritud (Endo) rakkudest AHR-i ning aktiini vastaste antikehadega (A). Western blot korduskatsete densitomeetriline analüüs (B), mis näitab AHR-i valgu suhtelist muutust diferentseerimisel (* $p < 0,05$ vs hES rakud).

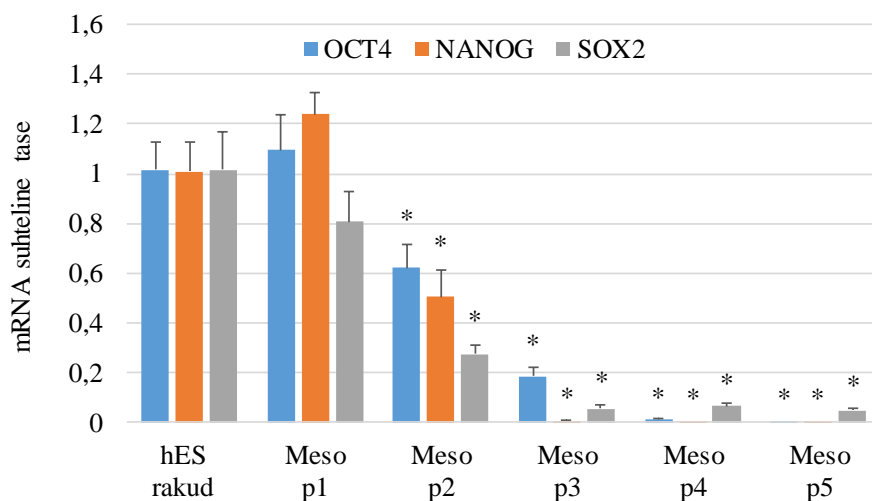
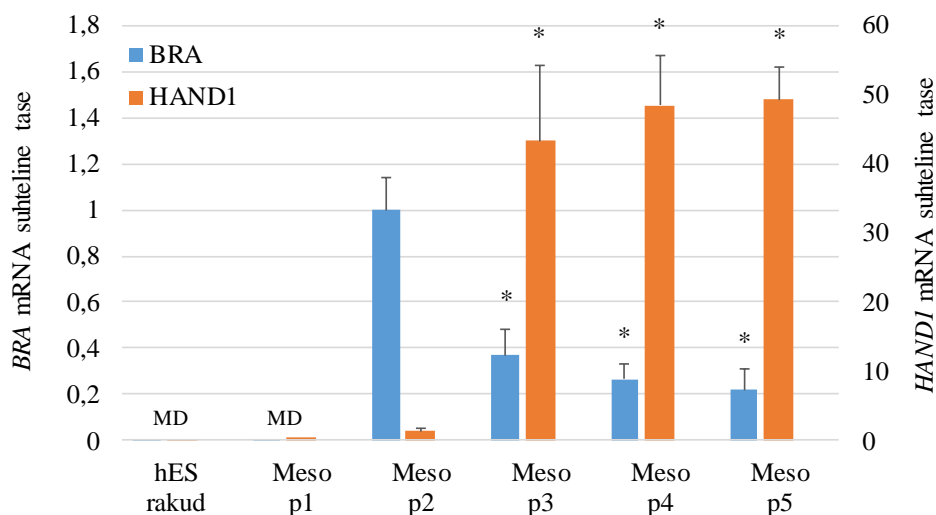
2.3.3. AHR-i ekspressioon mesodermaalsel diferentseerimisel

Selleks, et uurida AHR-i ekspressiooni muutust ajas mesodermaalses suunas, diferentseeriti hES rakke 5 päeva vältel STEMdiff™ mesodermaalse induktsiooni söötmes. Rakud lüüsi igapäevaselt mRNA ja valgu taseme analüüsiks.

Tulemustest selgus, et AHR-i ekspressioon vähenes teiseks päevaks oluliselt ning alates kolmandast päevast oli ekspressioon 95% võrra vähenenud (Joonis 13). Olemaks kindel rakkude diferentseerumises, analüüsiti ka pluripotentsusgeenide ekspressiooni. Nähti, et nii OCT4, NANOG kui SOX2 ekspressioon vähenes oluliselt alates teisest päevast ning alates neljandast praktiliselt puudus (Joonis 14 A). Lisaks analüüsiti ka spetsiifiliste suunamarkerite BRACHYURY (BRA) ning HAND1 ekspressiooni. Antud suunamarkerid ei olnud ekspresseeritud hES rakkudes ning üks päev pärast passeerimist, kuid olid detekteeritavad alates teisest päevast. Seetõttu on järgnevate ajapunktide ekspressioonitasemed avaldatud võrrelduna p2 ajapunktiga. Selgus, et mõlema geeni ekspressioon oli alates teisest päevast ülesreguleeritud (Joonis 14 B), mis kinnitab rakkude diferentseerumist mesodermaalses suunas.

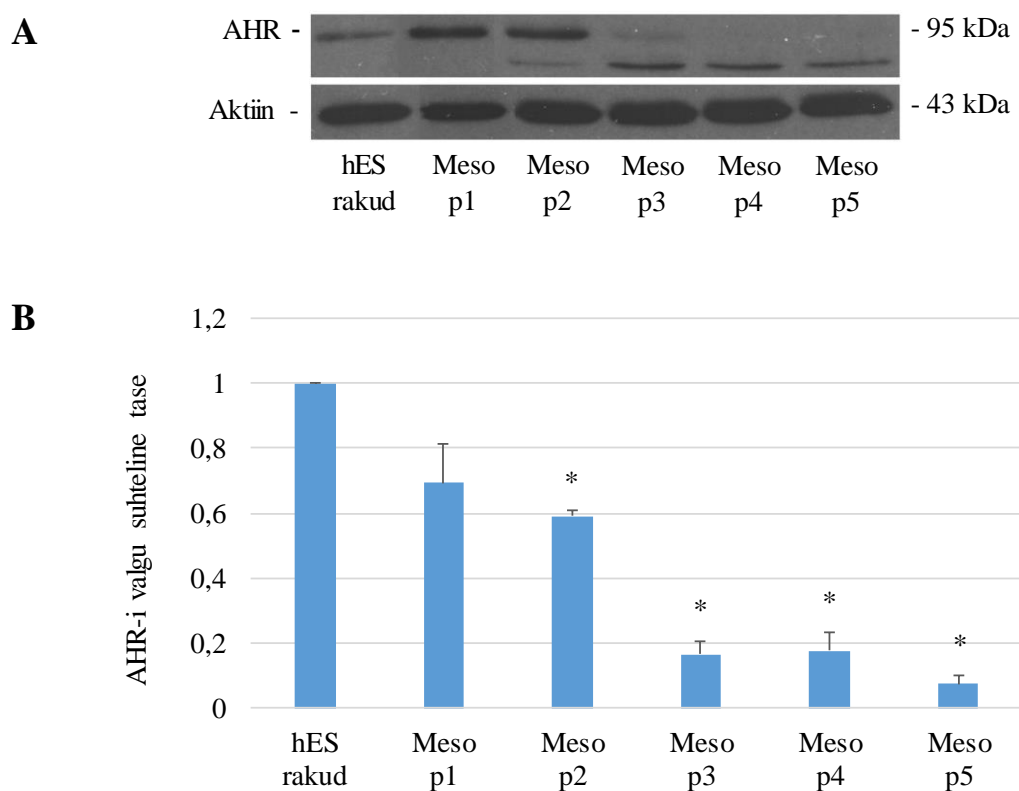


Joonis 13. AHR-i mRNA dünaamika hES rakkude varajasel mesodermaalsel diferentseerimisel. Inimese embrüonaalseid tüvirakke diferentseeriti mesodermaalses suunas (Meso) 5 päeva. AHR-i ekspressioon tuvastati RT-qPCR meetodit kasutades (* $p < 0,05$ vs hES rakud).

A**B**

Joonis 14. Pluripotentsusgeenide ja suunaspetsiifiliste markerite mRNA dünaamika hES rakkude varajasel mesodermaalsel diferentseerimisel. Inimese embrüonaalseid tüvirakke diferentseeriti mesodermaalses suunas (Meso) 5 päeva. Pluripotentsusmarkerite (*OCT4*, *NANOG* ning *SOX2*) (**A**) ja spetsiifiliste suunamarkerite (*BRA* ja *HAND1*) (**B**) ekspressioon tuvastati RT-qPCR meetodit kasutades (* $p < 0,05$ vs Meso p2; MD – mitte detekteeritud).

Selgitamaks, kas ning mil määral AHR valgu tasemel allareguleeritakse, tehti Western blot analüüs AHR-i ning aktiini vastaste antikehadega. Tulemustest nähti, et sarnaselt mRNA-le reguleeritakse mesodermaalses suunas AHR ka valgu tasemel kolmandaks päevaks peaaegu täiesti alla (Joonis 15 A). Märkimisväärne on seejuures asjaolu, et Western blotil detekteeriti AHR-i antikehaga valk, mille molekulmass on AHR-i omast madalam. Lisaks täheldati selle pöördvõrdelist ekspressiooni võrreldes AHR-iga. Illustreerimaks tehtud korduskatsete tulemusi tehti densitomeetriline analüüs. Selgus, et hES rakkudega võrreldes on mesodermaalse suuna viiendaks päevaks AHR-i valgu tase langenud enam kui 90% (Joonis 15 B).



Joonis 15. AHR-i valgu hulga muutus hES rakkude mesodermaalsel diferentseerimisel. Western blot analüüs hES ning 5 päeva mesodermaalses suunas (Meso) diferentseeritud rakkudest AHR-i ning aktiini vastaste antikehadega (A). Western blottide korduskatsete densitomeetriline analüüs (B), mis aitab hinnata AHR-i valgu suhtelist muutust diferentseerimisel (* $p < 0,05$ vs hES rakud).

2.4. Arutelu

Arüülsüivesinike retseptorit on varasemalt inimese embrüonaalsetes tüvirakkudes üsna vähe uuritud. Seejuures on hiire embrüonaalsete tüvirakkude puhul näidatud, et Ahr-i ekspressioon on represseritud Oct4, Sox2 ning Nanogi poolt ja rakkude diferentseerimisel taas aktiveeritud (Ko et al., 2014). Eelnevalt on meie laboris näidatud, et *AHR* on ekspresseeritud hES rakkudes (Hermann, 2013) ning varajasel diferentseerumisel *AHR*-i ekspressioon väheneb märgatavalt nii mRNA kui ka valgu tasemel (Uudeküll, 2016). See tähendab, et inimese embrüonaalsetes tüvirakkudes muutub *AHR*-i tase vastupidiselt hiire embrüonaalsetes tüvirakkudes nähtuga. Lisaks on näidatud, et *AHR* võib seonduda *OCT4* promootorile ning represserida selle ekspressiooni (Cheng et al., 2015). Samas *SOX2* ekspressiooni võib *AHR* positiivselt mõjutada (Stanford, 2016).

Eelnevast ajendatuna tekkis huvi uurida, kuidas muutub *AHR*-i ekspressiooni dünaamika hES rakkude varajasel diferentseerumisel spetsiifiliste kommertsiaalsete söötmetega ekto-, endo- ning mesodermaalses suunas. Seejuures olid hES rakud diferentseeritud neuraalseteks eellasrakkudeks, definitiivse endodermi ning varajase mesodermi rakkudeks.

Neuraalsetes eellasrakkudes reguleeriti neljandaks diferentseerumise päevaks *AHR*-i ekspressioon 70% võrra alla ning püsis nii viienda päevani. Alates kuuendast päevast võis märgata olulist ekspressiooni tõusu ning sama muster kehtis ka valgu tasemel. Olgugi, et sarnast *AHR*-i ekspressiooni dünaamikat ajas varasemalt kirjeldatud pole, on näidatud *AHR*-i ekspressiooni neuraalse suuna derivaatide puhul, näiteks täiskasvanud inimese aju korteksis, neuronites ning ka inimese reetina pigmenteeritud epiteelirakkudes (Dauchy et al., 2008; Ash 2017; Jin ja Jeong, 2016). Eelnevat arvesse võttes on fluktuatsioonid *AHR*-i tasemes diferentseerumise käigus oodatavad. Kuigi konkreetne *AHR*-i funktsioon jäi käesolevas töös selgitamata, on tulevikus plaanis teostada kromatiini immunosadestamise ning sekveneerimise analüüs nii hES rakkude kui ka neuraalsete eellasrakkudega, selgitamaks *AHR*-i täpsemat rolli.

Lisaks nähti diferentseeritud neuraalsete eellasrakkude puhul *SOX2* püsivat ekspressiooni samal ajal kui teiste pluripotentsusmarkerite ekspressioon oli allareguleeritud. Antud tulemus on kooskõlas kirjandusega, kus varasemalt on näidatud *SOX2* ekspressiooni püsimist proliferereervates neuraalsetes eellasrakkudes. *SOX2* ekspressiooni vähenemine see-eest soodustas diferentseerumist (Graham et al., 2003).

Definitiivse endodermi rakkudes oli *AHR*-i ekspressioon alates teisest päevast 60% võrra allareguleeritud ning jäi umbes sellele tasemele diferentseerimise lõpuni. Valgu tasemel oli näha olulist langust alates kolmandast päevast ning edaspidi jäi *AHR* samal tasemel

ekspresseerituks, mis on kooskõlas mRNA tulemustega. Varasemalt avaldatud publikatsioonides on definiitivse endodermi derivaatides näidatud *AHR*-i ekspressiooni lisaks kopsu adenokartsinoomi rakkudele ka täiskasvanu normaalse kopsukoe bronhiolaarses epiteelis. Normaalses koes on *AHR*-i ekspresseeritud oluliselt madalamal tasemel kui vähirakkudes, kuid samuti on teada, et just paljudes vähivormides on *AHR* kõrgelt ekspresseeritud (Koliopanos et al., 2002; Lin et al., 2003; Schlezinger et al., 2006). Lisaks on näidatud *AHR*-i ekspressiooni ka loote bronhiaalses epiteelis, kus *AHR* oli madalamalt ekspresseeritud kui täiskasvanul (Lin et al., 2003). Loote bronhiaalse epiteeli rakud on see-eest palju lähedasemad derivaadid antud töös diferentseeritud definiitivse endodermi rakkudele kui näiteks täiskasvanu rakud ning *AHR*-i madal ekspressioon on kooskõlas käesoleva töö tulemustes nähtuga. Lisaks loote bronhiaalse epiteeli rakkudele on *AHR*-i ekspressiooni näidatud ka teistes loote kudedes, nagu näiteks maksas, pankreases ning söögitorus, mis on samuti definiitivse endodermi derivaadid (Jiang et al., 2010). Selgitamaks ning paremini mõistmaks *AHR*-i rolli definiitivses endodermis on tulevikus plaanis teostada kromatiini immunosadestamise ning sekveneerimise analüüs. Selle abil oleks võimalik kindlaks teha, milliseid gene *AHR* võib reguleerida ning selgitada selle funktsiooni varasel endodermaalsel diferentseerimisel.

Mesodermaalsel diferentseerimisel leiti, et *AHR*-i ekspressioon vaigistatakse peaaegu täielikult. Eelnevalt on näidatud, et mesodermi derivaatide hematopoeetiliste tüvirakkude paljunemiseks ning diferentseerimise vältimiseks on vajalik *AHR*-i aktiivsuse inhibeerimine (Boitano et al., 2010). Seega võib *AHR*-i vaigistamine varasel mesodermaalsel diferentseerumisel olla funktsionaalse tähtsusega ning iseloomulik ka teistele mesodermi derivaatidele, kuna näiteks ka loote südames *AHR*-i ekspressioon puudub (Jiang et al., 2010).

Mesodermaalsel diferentseerumisel detekteeriti Western blot analüüsil *AHR*-i vastase antikehaga valk, mille molekulaarmass on *AHR*-i omast väiksem. Seejuures täheldati *AHR*-iga võrreldes selle pöördvõrdelist ekspressiooni. Kuigi käesolevas töös ei tuvastatud, millega täpsemalt tegu, võib spekuloida, et võibolla on tegemist *AHR*-i valguga, millelt on lõigatud NLS-järjestus. Selline isovorm, olgugi et eelnevalt kirjeldamata, takistaks *AHR*-i translokeerumist tuuma ning selle käitumist kui transkriptsioonifaktor. Samas säiliks *AHR* tsütoplasmas, kus see võiks mõjutada rakulisi protsesse, interakteerudes teiste valkudega. Antud iseärasuse selgitamiseks on tulevikus plaanis teostada mass-spektromeetiline analüüs.

Käesoleva bakalaureusetöö tulemused näitavad, et arüüsüivesinike retseptori ekspressioon väheneb embrüonaalsete tüvirakkude diferentseerimisel neuraalseteks eellasrakkudeks, definiitivse endodermi ning varajase mesodermi rakkudeks suunaspetsiifiliselt. Kuigi *AHR*-i

roll hES rakkudes ning nende diferentseerimisel jäi välja selgitamata, on antud tulemused sobivaks aluseks edasisteks katseteks.

KOKKUVÕTE

Käesoleva bakalaureusetöö kirjanduse ülevaates kirjeldati inimese embrüonaalseid tüvirakke, nende omadusi ning anti ülevaade olulisematest pluripotentsuse säilitamisel osalevatest transkriptsioonifaktoritest. Samuti kirjeldati embrüonaalsete tüvirakkude diferentseerumist ekto-, endo- ning mesodermaalses suunas ning erinevaid võimalusi diferentseerumise indutseerimiseks. Lisaks anti ülevaade arüülsüivesinike retseptorist ning selle teadaolevatest funktsioonidest.

Antud bakalaureusetöö eksperimentaalse osa tulemusena selgus RT-qPCR-i meetodil, et inimese embrüonaalsete tüvirakkude diferentseerimisel ekto-, endo- ning mesodermaalses suunas langeb arüülsüivesinike retseptori ekspressioon, seejuures on dünaamika suunaspetsiifiline. Ektodermaalsesse suunda diferentseerides selgus, et *AHR*-i ekspressioon langes oluliselt alates teisest diferentseerimise päevast, kuid alates kuuendast päevast hakkas ekspressioonitase taas tõusma. Western blot analüüs näitas samuti *AHR*-i valgu taseme langust ning alates kuuendast päevast tõusu, mis on RT-qPCR-i tulemustega kooskõlas. Endodermaalsel diferentseerimisel langes *AHR*-i ekspressioon alates kolmandast diferentseerimise päevast ning seejärel jäi viienda päevani samale tasemele. Sellist dünaamikat kinnitas ka Western blot analüüs. Mesodermaalse diferentseerimise puhul reguleeriti *AHR*-i ekspressioon täiesti alla juba kolmandaks päevaks ning ekspressioon püsis samal tasemel diferentseerimise lõpuni. Western blot analüüs kinnitas RT-qPCR-i tulemusi.

Käesolev bakalaureusetöö näitab inimese embrüonaalsete tüvirakkude diferentseerimisel arüülsüivesinike retseptori ekspressiooni dünaamikat ajas ning tõestab, et *AHR*-i ekspressioon langeb nii ekto-, endo- kui ka mesodermaalsel diferentseerimisel suunaspetsiifiliselt.

The expression of aryl hydrocarbon receptor during differentiation of human embryonic stem cells into ecto-, endo- and mesodermal lineages

Laura Pajusaar

SUMMARY

Human embryonic stem (hES) cells are derived from the inner cell mass (ICM) of the early blastocyst. These cells are pluripotent, which means that they can differentiate into all of the three primary germ layer derivatives. Transcription factors play a crucial role in sustaining pluripotency with OCT4, NANOG and SOX2 being the most important. These are also used as genetic markers to identify hES cells.

The differentiation of hES cells into three primary germ layer cells, which are also known as the endodermal, ectodermal and mesodermal cells, can be induced *in vitro*. This can be achieved by using special differentiation media and small molecule compounds. The aryl hydrocarbon receptor (AHR) is a ligand-activated transcription factor, which mediates biological responses to environmental chemicals, but is also known to have other physiological functions.

It has been previously shown that AHR is expressed in hES cells and is downregulated during early differentiation. Therefore, the aim of this thesis was to examine the dynamics of AHR downregulation in the early stages of hES cell differentiation over time.

To this end, hES cells were differentiated into neural progenitor, definite endoderm and early mesoderm cells with the use of specialized induction media. Reverse transcription qPCR and western blotting were used to analyze AHR expression. The obtained results suggest lineage-specific patterns in the downregulation of AHR expression. During neural differentiation of hES cells, AHR expression is downregulated starting from day two. Starting from day six the expression starts increasing. AHR expression is downregulated from day two and remains constant during the endodermal differentiation of hES cells. The expression of AHR in mesodermal differentiation was also downregulated from day two and barely detectable afterwards.

The current dissertation demonstrates the dynamics of AHR in the differentiation of human embryonic stem cells. Furthermore, this study indicates that the AHR downregulation has lineage-specific properties.

TÄNUSÕNAD

Sooviksin tänada oma juhendajat Indrek Teinot, kes abistas katsete läbiviimisel, tulemuste analüüsimisel ning antud bakalaureusetöö koostamisel. Sooviksin tänada ka Annika Treid, kes passeeris tüvirakke ning tagas selle, et need oleks katsete tegemiseks olemas. Samuti soovin tänada Antti Matveret, kes vastas tekkinud küsimustele ning vajadusel andis nõu ning suunas.

KIRJANDUSE LOETELU

- Abbott, B.D., Schmid, J.E., Pitt, J.A., Buckalew, A.R., Wood, C.R., Held, G.A., Diliberto, J.J. (1999). Adverse reproductive outcomes in the transgenic Ah receptor-deficient mouse. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 155: 62–70.
- Adachi, J., Mori, Y., Matsui, S., Takigami, H., Fujino, J., Kitagawa, H., Miller, C.A., Kato, T., Saeki, K., Matsuda, T. (2001). Indirubin and indigo are potent aryl hydrocarbon receptor ligands present in human urine. *J. Biol. Chem.* 276: 31475–31478.
- Alexander, D.L., Ganem, L.G., Fernandez-Salguero, P., Gonzalez, F., Jefcoate, C.R. (1998). Aryl-hydrocarbon receptor is an inhibitory regulator of lipid synthesis and of commitment to adipogenesis. *J. Cell Sci.* 111 (Pt 22): 3311–3322.
- Ash, P.E.A., Stanford, E.A., Al Abdulatif, A., ... Wolozin, B. (2017). Dioxins and related environmental contaminants increase TDP-43 levels. *Mol. Neurodegener.* 12: 35.
- Avilion, A.A., Nicolis, S.K., Pevny, L.H., Perez, L., Vivian, N., Lovell-Badge, R. (2003). Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev.* 17: 126–140.
- Bain, G., Kitchens, D., Yao, M., Huettner, J.E., Gottlieb, D.I. (1995). Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. *Dev. Biol.* 168: 342–357.
- Bekki, K., Vogel, H., Li, W., Ito, T., Sweeney, C., Haarmann-Stemmann, T., Matsumura, F., Vogel, C.F.A. (2015). The aryl hydrocarbon receptor (AhR) mediates resistance to apoptosis induced in breast cancer cells. *Pestic. Biochem. Physiol.* 120: 5–13.
- Benedict, J.C., Lin, T.-M., Loeffler, I.K., Peterson, R.E., Flaws, J.A. (2000). Physiological role of the aryl hydrocarbon receptor in mouse ovary development. *Toxicol. Sci.* 56: 382–388.
- Bernardo, A.S., Faial, T., Gardner, L., ... Pedersen, R.A. (2011). BRACHYURY and CDX2 mediate BMP-induced differentiation of human and mouse pluripotent stem cells into embryonic and extraembryonic lineages. *Cell Stem Cell* 9: 144–155.
- Birnbaum, L.S. (1995). Developmental effects of dioxins and related endocrine disrupting chemicals. *Toxicol. Lett.* 82–83: 743–750.
- Boitano, A.E., Wang, J., Romeo, R., Cooke, M.P. (2010). Aryl hydrocarbon receptor antagonists promote the expansion of human hematopoietic stem cells. *Science* (80). 329: 1345–1348.

- Cai, J., Zhao, Y., Liu, Y., ...Deng H. (2007). Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional hepatic cells. *Hepatology* 45: 1229–1239.
- Callero, M.A., Loaiza-Pérez, A.I. (2011). The role of aryl hydrocarbon receptor and crosstalk with estrogen receptor in response of breast cancer cells to the novel antitumor agents benzothiazoles and aminoflavone. *Int. J. Breast Cancer* 2011: 923250.
- Céspedes, M.A., Galindo, M.I., Couso, J.P. (2010). Dioxin toxicity in vivo results from an increase in the dioxin-independent transcriptional activity of the aryl hydrocarbon receptor. *PLoS One* 5(11): e15382.
- Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S., Smith, A. (2003). Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 113: 643–655.
- Chang, C.-C., Sue, Y.-M., Yang, N.-J., Lee, Y.-H., Juan, S.-H. (2014). 3-Methylcholanthrene, an AhR agonist, caused cell-cycle arrest by histone deacetylation through a RhoA-dependent recruitment of HDAC1 and pRb2 to E2F1 Complex. *PLoS One* 9: e92793.
- Chazaud, C., Yamanaka, Y., Pawson, T., Rossant, J. (2006). Early lineage segregation between epiblast and primitive endoderm in mouse blastocysts through the Grb2-MAPK pathway. *Dev. Cell* 10: 615–624.
- Cheng, A.M., Saxton, T.M., Sakai, R., ...Pawson, T. (1998). Mammalian Grb2 regulates multiple steps in embryonic development and malignant transformation. *Cell* 95(6): 793–803.
- Cheng, J., Li, W., Kang, B., ... Wang Y.J. (2015). Tryptophan derivatives regulate the transcription of Oct4 in stem-like cancer cells. *Nat. Commun.* 6: 7209.
- Coumailleau, P., Poellinger, L., Gustafsson, J.-åke, Whitelaw, M.L. (1995). Definition of a minimal domain of the dioxin receptor that is associated with Hsp90 and maintains wild type ligand binding affinity and specificity. *J. Biol. Chem.* 270: 25291–25300.
- Courtney, K.D., Moore, J.A. (1971). Teratology studies with 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-P-dioxin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 20: 396–403.
- D'Amour, K.A., Bang, A.G., Eliazer, S., Kelly, O.G., Agulnick, A.D., Smart, N.G., Moorman, M.A., Kroon, E., Carpenter, M.K., Baetge, E.E. (2006). Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 24: 1392–1401.
- Dauchy, S., Dutheil, F., Weaver, R.J., Chassoux, F., Daumas-Duport, C., Couraud, P.-O.,

- Scherrmann, J.-M., De Waziers, I., Declèves, X. (2008). ABC transporters, cytochromes P450 and their main transcription factors: expression at the human blood-brain barrier. *J. Neurochem.* 107: 1518–1528.
- Dolwick, K.M., Schmidt, J. V, Carver, L.A., Swanson, H.I., Bradfield, C.A. (1993). Cloning and expression of a human Ah receptor cDNA. *Mol. Pharmacol.* 44: 911–917.
- Dye, B.R., Hill, D.R., Ferguson, Spence J.R. (2015). In vitro generation of human pluripotent stem cell derived lung organoids. *Elife* 4.
- Evans, M.J., Kaufman, M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292:154–156.
- Evans, B.R., Karchner, S.I., Allan, L.L., Pollenz, R.S., Tanguay, R.L., Jenny, M.J., Sherr, D.H., Hahn, M.E. (2008) Repression of aryl hydrocarbon receptor (AHR) signaling by AHR repressor: role of DNA binding and competition for AHR nuclear translocator. *Mol. Pharmacol.* 73: 387-398.
- Fogarty, N.M.E., McCarthy, A., Snijders, K.E., Niakan K.K. (2017). Genome editing reveals a role for OCT4 in human embryogenesis. *Nature* 550: 67–73.
- Fong, H., Hohenstein, K.A., Donovan, P.J. (2008). Regulation of self-renewal and pluripotency by Sox2 in human embryonic stem cells. *Stem Cells* 26: 1931–1938.
- Gasiewicz, T.A., Singh, K.P., Bennett, J.A. (2014). The Ah receptor in stem cell cycling, regulation, and quiescence. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1310: 44–50.
- Graham, V., Khudyakov, J., Ellis, P., Pevny, L. (2003). SOX2 functions to maintain neural progenitor identity. *Neuron* 39: 749–765.
- Graichen, R., Xu, X., Braam, S.R., Davidson B.P. (2008). Enhanced cardiomyogenesis of human embryonic stem cells by a small molecular inhibitor of p38 MAPK. *Differentiation* 76: 357–370.
- Heath-Pagliuso, S., Rogers, W.J., Tullis, K., Seidel, S.D., Cenijn, P.H., Brouwer, A., Denison, M.S. (1998). Activation of the Ah receptor by tryptophan and tryptophan metabolites. *Biochemistry* 37: 11508–11515.
- Herrmann, B.G., Labeit, S., Poustka, A., King, T.R., Lehrach, H. (1990). Cloning of the T gene required in mesoderm formation in the mouse. *Nature* 343: 617–622.
- Höpfl, G., Gassmann, M., Desbaillets, I. (2004). Differentiating embryonic stem cells into

embryoid bodies. *Methods Mol. Biol.* 254: 79–98.

Hu, P., Herrmann, R., Bednar, A., Saloupis, P., Dwyer, M.A., Yang, P., Qi, X. (2013). Aryl hydrocarbon receptor deficiency causes dysregulated cellular matrix metabolism and age-related macular degeneration-like pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110: e4069-78

Hyslop, L., Stojkovic, M., Armstrong, L., Walter, T., Stojkovic, P., Przyborski, S., Herbert, M., Murdoch, A., Strachan, T., Lako, M. (2005). Downregulation of NANOG induces differentiation of human embryonic stem cells to extraembryonic lineages. *Stem Cells* 23: 1035–1043.

Ikuta, T., Eguchi, H., Tachibana, T., Yoneda, Y., Kawajiri, K. (1998) Nuclear localization and export signals of the human aryl hydrocarbon receptor. *J. Biol. Chem.* 273: 2895-904

Jiang, Y., Wang, K., Fang, R., Zheng, J. (2010). Expression of aryl hydrocarbon receptor in human placentas and fetal tissues. *the J. Histochem. Cytochem.* 58: 679–685.

Kanai-Azuma, M., Kanai, Y., Gad, J.M., Hayashi, Y. (2002). Depletion of definitive gut endoderm in Sox17-null mutant mice. *Development* 129: 2367–2379.

Kazlauskas, A., Poellinger, L., Pongratz, I. (1999). Evidence that the co-chaperone p23 regulates ligand responsiveness of the dioxin (aryl hydrocarbon) receptor. *J. Biol. Chem.* 274: 13519–13524.

Keller, G. (2005). New insights into early human development : lessons for stem cell derivation and differentiation. *Genes Dev.* 19: 1129–1155.

Kim, H.O., Kim, J.H., Chung, B.Y., Choi, M.G., Park, C.W. (2014). Increased expression of the aryl hydrocarbon receptor in patients with chronic inflammatory skin diseases. *Exp. Dermatol.* 23: 278–281.

Ko, C.-I., Wang, Q., Fan, Y., Xia, Y., Puga, A. (2014). Pluripotency factors and Polycomb Group proteins repress aryl hydrocarbon receptor expression in murine embryonic stem cells. *Stem Cell Res.* 12: 296–308.

Kociba, R.J., Keyes, D.G., Beyer, J.E., Humiston, C.G. (1978). Results of a two-year chronic toxicity and oncogenicity study of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 46: 279–303.

Koliopanos, A., Kleeff, J., Xiao, Y., Safe, S., Zimmermann, A., Büchler, M.W., Friess, H. (2002). Increased arylhydrocarbon receptor expression offers a potential therapeutic target for

pancreatic cancer. *Oncogene* 21: 6059–6070.

Kremer, J., Gleichmann, E., Esser, C. (1994). Thymic stroma exposed to arylhydrocarbon receptor-binding xenobiotics fails to support proliferation of early thymocytes but induces differentiation. *J. Immunol.* 153: 2778–2786.

Lahvis, G.P., Lindell, S.L., Thomas, R.S., McCuskey, R.S., Murphy, C., Glover, E., Bentz, M., Southard, J., Bradfield, C.A. (2000). Portosystemic shunting and persistent fetal vascular structures in aryl hydrocarbon receptor-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97: 10442–10447.

Laios, M.D., Tate, E.R., Ahrenhoerster, L.S., Chen, Y., Wang, D. (2015). Effects of developmental activation of the aryl hydrocarbon receptor by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on long-term self-renewal of murine hematopoietic stem cells. *Environ. Health Perspect.* 124: 957–965.

Lan Jin, H., Won Jeong, K. (2016). Regulation of aryl hydrocarbon receptor-mediated transcription in human retinal pigmented epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 472: 366-372.

Larsen, K.B., Lutterodt, M.C., Møllgård, K., Møller, M. (2010). Expression of the homeobox genes OTX2 and OTX1 in the early developing human brain. *J. Histochem. Cytochem.* 58: 669–678.

Ludwig, T.E., Levenstein, M.E., Jones, J.M., Thomson, J.A. (2006). Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions. *Nat. Biotechnol.* 24, 185–187.

Matsushita, N., Sogawa, K., Ema, M., Yoshidas, A., Fujii-Kuriyama, Y. (1993). A factor binding to the xenobiotic responsive element (XRE) of P-4501A1 gene consists of at least two helix-loop-helix proteins, Ah Receptor and Arnt. *J. Biol. Chem.* 268: 21002–21006.

Meyer, B.K., Pray-Grant, M.G., Vanden Heuvel, J.P., Perdew, G.H. (1998). Hepatitis B virus X-associated protein 2 is a subunit of the unliganded aryl hydrocarbon receptor core complex and exhibits transcriptional enhancer activity. *Mol. Cell. Biol.* 18: 978–988.

Miller, C.A. Expression of the human aryl hydrocarbon receptor complex in yeast. Activation of transcription by indole compounds. *J. Biol. Chem.* 272: 32824-32829.

Mimura, J., Fujii-Kuriyama, Y. (2003). Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1619: 263–268.

- Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., Maruyama, M., Maeda, M., Yamanaka, S. (2003). The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 113: 631–642.
- Murray, G.I., Taylor, M.C., McFadyen, M.C., McKay, J.A., Greenlee, W.F., Burke, M.D., Melvin, W.T. (1997). Tumor-specific expression of cytochrome P450 CYP1B1. *Cancer Res.* 57: 3026–3031.
- Nguyen, N.T., Hanieh, H., Nakahama, T., Kishimoto, T. (2013). The roles of aryl hydrocarbon receptor in immune responses. *Int. Immunol.* 25: 335–343.
- Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Schöler, H., Smith, A. (1998). Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 95: 379–391.
- Niwa, H., Miyazaki, J., Smith, A.G. (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat. Genet.* 24: 372–376.
- Lin, P., Chang, H., Tsai, W.-T., Wu, M.-H., Liao, Y.-S., Chen, J.-T., Su, J.-M. (2003). Overexpression of Aryl Hydrocarbon Receptor in Human Lung Carcinomas. *Toxicol. Pathol.* 31: 22–30.
- Qin, H., Powell-Coffman, J.A. (2004). The *Caenorhabditis elegans* aryl hydrocarbon receptor, AHR-1, regulates neuronal development. *Dev. Biol.* 270: 64–75.
- Qin, H., Zhai, Z., Powell-Coffman, J.A. (2006). The *Caenorhabditis elegans* AHR-1 transcription complex controls expression of soluble guanylate cyclase genes in the URX neurons and regulates aggregation behavior. *Dev. Biol.* 298: 606–615.
- Rhinn, M., Dierich, A., Shawlot, W., Behringer, R.R., Le Meur, M., Ang, S.L. (1998). Sequential roles for *Otx2* in visceral endoderm and neuroectoderm for forebrain and midbrain induction and specification. *Development* 125: 845–856.
- Savouret, J.F., Antenos, M., Quesne, M., Xu, J., Milgrom, E., Casper, R.F. (2001). 7-ketocholesterol is an endogenous modulator for the arylhydrocarbon receptor. *J. Biol. Chem.* 276: 3054–3059.
- Schlezniger, J.J., Liu, D., Farago, M., Seldin, D.C., Belguise, K., Sonenshein, G.E., Sherr, D.H. (2006). A role for the aryl hydrocarbon receptor in mammary gland tumorigenesis. *Biol. Chem.* 387: 1175–1187.

Schmidt, J., Bradfield, C. (1996). Ah receptor signaling pathways. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 12: 55–89.

Schmidt, J. V., Su, G.H., Reddy, J.K., Simon, M.C., Bradfield, C.A. (1996). Characterization of a murine Ahr null allele: involvement of the Ah receptor in hepatic growth and development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 6731–6736.

Selwood, L., Johnson, M.H. (2006). Trophoblast and hypoblast in the monotreme, marsupial and eutherian mammal: evolution and origins. *BioEssays* 28: 128–145.

Shen, E.S., Whitlock, J.P. (1992). Protein-DNA interactions at a dioxin-responsive enhancer. Mutational analysis of the DNA-binding site for the liganded Ah receptor. *J. Biol. Chem.* 267: 6815–6819.

Spence, J.R., Mayhew, C.N., Rankin, S.A., Wells, J.M. (2011). Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue in vitro. *Nature* 470: 105–109.

Stanford, E. A., Wang, Z., Novikov, O., ... Sherr, D. H. (2016). The role of the aryl hydrocarbon receptor in the development of cells with the molecular and functional characteristics of cancer stem-like cells. *BMC Biol.* 14: 20.

Thomson, J.A., Thomson, J.A., Itskovitz-eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., Jones, J.M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 282: 1145–1148.

Thomson, M., Liu, S.J., Zou, L.-N., Smith, Z., Meissner, A., Ramanathan, S. (2011). Pluripotency factors in embryonic stem cells regulate differentiation into germ layers. *Cell* 145: 875–889.

Togi, K., Kawamoto, T., Yamauchi, R., Yoshida, Y., Kita, T., Tanaka, M. (2004). Role of Hand1/eHAND in the dorso-ventral patterning and interventricular septum formation in the embryonic heart. *Mol. Cell. Biol.* 24: 4627–4635.

Van De Velde, H., Cauffman, G., Tournaye, H., Devroey, P., Liebaers, I. (2008). The four blastomeres of a 4-cell stage human embryo are able to develop individually into blastocysts with inner cell mass and trophectoderm. *Hum. Reprod.* 23: 1742-1747

Wang, Q., Kurita, H., Carreira, V., Ko, C.-I., Fan, Y., Zhang, X., Biesiada, J., Medvedovic, M., Puga, A. (2016). Ah receptor activation by dioxin disrupts activin, BMP, and WNT signals during the early differentiation of mouse embryonic stem cells and inhibits cardiomyocyte functions. *Toxicol. Sci.* 149: 346–357.

Wegner, M., Stolt, C.C. (2005). From stem cells to neurons and glia: A Soxist's view of neural development. *Trends Neurosci.* 28: 583–588.

Whitlock, J.P. (1999). Induction of cytochrome P4501A1. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol* 39: 103–125.

Winnier, G., Blessing, M., Labosky, P.A., Hogan, B.L. (1995). Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes Dev.* 9: 2105–2116.

Zhang, P., Li, J., Tan, Z., ... Deng, H. (2008). Short-term BMP-4 treatment initiates mesoderm induction in human embryonic stem cells. *Blood* 111: 1933–1941.

Zhao, S., Nichols, J., Smith, A.G., Li, M. (2004). SoxB transcription factors specify neuroectodermal lineage choice in ES cells. *Mol. Cell. Neurosci.* 27: 332–342.

KASUTATUD VEEBIAADDRESSID

NCBI a. Kasutatud 19.04.2018 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5460>

NCBI b. Kasutatud 19.04.2018 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6657>

NCBI c. Kasutatud 19.04.2018 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/79923>

NCBI d. Kasutatud 19.04.2018 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/196>

Ensembl. Kasutatud 19.04.2018

https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000106546;r=7:16916359-17346152

LIHTLITSENTS

Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Laura Pajusaar

(sünnikuupäev: 23.05.1996)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihlitsentsi) enda loodud teose

„Arüülsüsivesinike retseptori ekspressioon inimese embrüonaalsete tüvirakkude diferentseerumisel ekto-, endo- ning mesodermaalses suunas“,

mille juhendaja on Indrek Teino,

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 alates **31.12.2019** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

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

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

Tartus, 28.05.2018