

TARTU ÜLIKOOL

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

**Arüülsüsivesinike retseptori agonisti toime inimese embrüonaalsete  
tüvirakkude pluripotentsusele ja diferentseerumisele**

Magistritöö

30 EAP

Inge Varik

Juhendaja

MSc Indrek Teino

TARTU 2020

## **„Arüülsüivesinike retseptori agonisti toime inimese embrüonaalsete tüvirakkude pluripotentsusele ja diferentseerumisele“**

Dioksiinid (sealhulgas TCDD) on keskkonnas leiduvad kemikaalid, mis avaldavad inimesele pikaajast toksilist mõju juba väga madalas kontsentratsioonis. Arüülsüivesinike retseptor (AHR) on transkriptsioonifaktor, mille kõige afiinsemaks agonistiks on TCDD. Inimese embrüonaalsed tüvirakud on heaks mudeliks, uurimaks keskkonnakemikaalide toksilist mõju inimese embrüonaalsele arengule.

Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli uurida TCDD toimet inimese embrüonaalsete tüvirakkude pluripotentsusele ja diferentseerumisele. Magistritöö eksperimentide tulemusena selgus, et TCDD ei mõjuta märkimisväärselt inimese embrüonaalsete tüvirakkude pluripotentsust, kuid avaldab mõju varasele endodermaalsele ja mesodermaalsele arengule, inhibeerides diferentseerumiseks vajalike geenide ekspressiooni.

**Märksõnad:** arüülsüivesinike retseptor, TCDD, inimese embrüonaalsed tüvirakud, pluripotentsus, diferentseerumine

**CERCS kood:** B450 Arengubioloogia, teratoloogia, ontogenees, (inim)embrüoloogia; B220 Geneetika, tsütogeneetika.

## **„Effects of the aryl hydrocarbon receptor agonist on pluripotency and differentiation of human embryonic stem cells“**

Dioxins (including TCDD) are environmental chemicals that cause long-term toxic effects in humans at very low concentrations. TCDD is the most potent agonist of the ligand-dependent transcription factor aryl hydrocarbon receptor (AHR). Human embryonic stem cells are a good model for studying the effects of the toxicity of environmental chemicals on human embryonic development.

The purpose of this Master's thesis was to study the effect of TCDD on the pluripotency and differentiation of human embryonic stem cells. The results of this thesis show that TCDD did not significantly affect the pluripotency of human embryonic stem cells. Additionally, it was found that TCDD affects early endodermal and mesodermal development by inhibiting the expression of genes required for differentiation.

**Keywords:** aryl hydrocarbon receptor, TCDD, human embryonic stem cells, pluripotency, differentiation

**CERCS code:** B450 Development biology, teratology, ontogeny, embryology (human); B220 Genetics, cytogenetics

# SISUKORD

<b>KASUTATUD LÜHENDID .....</b>	<b>5</b>
<b>SISSEJUHATUS .....</b>	<b>7</b>
<b>1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE .....</b>	<b>8</b>
1.1. Inimese embrüonaalsed tüvirakud.....	8
1.1.1. Inimese varane embrüonaalne areng .....	8
1.1.2. Embrüonaalsete tüvirakkude iseuuenemisvõime ja pluripotentsus .....	9
1.1.3. Inimese embrüonaalsete tüvirakkude pluripotentsusmarkerid .....	10
1.1.4. Inimese embrüonaalsete tüvirakkude diferentseerumine .....	12
1.1.5. Inimese embrüonaalsete tüvirakkude liinid .....	14
1.1.6. Inimese embrüonaalsete tüvirakkude kasvatamine koekultuuris .....	14
1.1.7. Inimese embrüonaalsete tüvirakkude terapeutiline potentsiaal .....	15
1.2. Arüülsüsivesinike retseptor .....	16
1.2.1. Arüülsüsivesinike retseptori struktuur .....	17
1.2.2. Arüülsüsivesinike retseptori signaalirada .....	18
1.2.3. Arüülsüsivesinike retseptori roll organismis .....	19
1.2.4. Arüülsüsivesinike retseptor varases arengus ning tüvirakkudes .....	20
<b>2. EKSPERIMENTAALOSA .....</b>	<b>23</b>
2.1. Töö eesmärgid .....	23
2.2. Materjal ja meetodika .....	23
2.2.1. Rakkude kasvatamine koekultuuris .....	23
2.2.2. Embrüonaalsete kehade moodustamine ja hES rakkude suunatud diferentseerimine .....	24
2.2.3. RNA eraldamine .....	25
2.2.4. cDNA süntees .....	26
2.2.5. Kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon (qPCR) .....	26
2.2.6. Voolutsütomeetria .....	27
2.2.7. Kromatiini immunosadestamine (ChIP) .....	28
2.2.8. Raamatukogude valmistamine .....	30
2.2.9. Sekveneerimine ja andmeanalüüs .....	31
2.2.10. Andmete statistiline analüüs .....	32
3. Tulemused ja arutelu .....	33
3.1. H1 ja H9 hES rakkudest moodustatud embrüonaalsete kehade võrdlus .....	33
3.2. TCDD toime H9 hES rakkude pluripotentsusmarkerite ja arüülsüsivesinike retseptori ekspressioonile .....	37
3.3. TCDD toime H9 embrüonaalsete kehade diferentseerumisele .....	40

3.4. TCDD toime H9 hES rakkude varajasele neuraalsele diferentseerumisele.....	43
3.5. TCDD toime H9 hES rakkude varajasele endodermaalsele diferentseerumisele .....	46
3.6. TCDD toime H9 hES rakkude varajasele mesodermaalsele diferentseerumisele ....	49
3.7. Arüülsüivesinike retseptori seondumiskohtade identifitseerimine ChIP-seq meetodil .....	52
<b>KOKKUVÕTE.....</b>	<b>57</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>58</b>
<b>TÄNUSÕNAD .....</b>	<b>60</b>
<b>KIRJANDUSE LOETELU .....</b>	<b>61</b>
<b>KASUTATUD VEEBIAADRESSID .....</b>	<b>71</b>
<b>LISAD.....</b>	<b>72</b>
Lisa 1. qPCR-is kasutatud oligonukleotiidid .....	72
Lisa 2. TCDD toime diferentseerumise markergeenide ekspressioonile hES rakkudes .....	73
Lisa 3. Mesodermi ja endodermi markergeenide ekspressioon H9 embrüonaalsete kehade diferentseerumisel TCDD juuresolekul.....	74
Lisa 4. TCDD toime AHR-i sihtmärkgeeni ekspressioonile varajasel neuraalsel diferentseerumisel .....	76
<b>LIHTLITSENTS .....</b>	<b>77</b>

## Kasutatud lühendid

AHR	arüülsüivesinike retseptor ( <i>aryl hydrocarbon receptor</i> )
AHRR	arüülsüivesinike retseptori repressor ( <i>aryl hydrocarbon receptor repressor</i> )
ARNT	arüülsüivesinike retseptori tuuma translokaator ( <i>aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator</i> )
bHLH	aluseline heeliks-ling-heeliks motiiv ( <i>basic helix-loop-helix</i> )
BRA	transkriptsioonifaktor Brachyury
c-SRC	proto-onkogeen türosiin-proteiinkinaas SRC ( <i>proto-oncogene tyrosine-protein kinase SRC</i> )
CD	diferentseerumise klaster ( <i>cluster of differentiation</i> )
ChIP	kromatiini immunosadestamine ( <i>chromatin immunoprecipitation</i> )
Ct	lävitsükkel ( <i>cycle threshold</i> )
CYP	tsütokroom P450 valk ( <i>cytochrome P450 protein</i> )
DMSO	dimetüülsulfoksiid ( <i>dimethyl sulfoxide</i> )
EB	embrüonaalne keha ( <i>embryoid body</i> )
ES rakk	embrüonaalne tüvirakk ( <i>embryonic stem cell</i> )
FOXA2	<i>forkhead box</i> valk A2 ( <i>forkhead box protein A2</i> )
GATA4	GATA-seonduv valk 4 ( <i>GATA binding protein 4</i> )
GSC	<i>homeobox</i> valk <i>goosecoid</i> ( <i>homeobox protein goosecoid</i> )
HAH	halogeenitud aromaadne süivesinik ( <i>halogenated aromatic hydrocarbon</i> )
HAND1	südame ja neuraalharja derivaatide poolt ekspresseeritud valk 1 ( <i>heart- and neural crest derivatives-expressed protein 1</i> )
hES rakk	inimese embrüonaalne tüvirakk ( <i>human embryonic stem cell</i> )
HSC	hematopoeetiline tüvirakk ( <i>hematopoietic stem cell</i> )
ICM	sisemine rakkude mass ( <i>inner cell mass</i> )
NES	tuuma ekspordi signaal ( <i>nuclear export signal</i> )

NLS	tuuma lokalisatsioon signaal ( <i>nuclear localization signal</i> )
mES rakk	hiire embrüonaalne tüvirakk ( <i>mouse embryonic stem cell</i> )
OCT4	oktameerile seonduv transkriptsioonifaktor 4 ( <i>octamer-binding transcription factor 4</i> )
OTX2	<i>orthodenticle homeobox 2</i>
PAH	polütsükline aromaadne süsivesinik ( <i>polycyclic aromatic hydrocarbon</i> )
PAS A/B	Per-Arnt-Sim domeen A/B
PAX6	<i>paired box protein 6</i>
POU	Pit-Oct-Unc geeniperekond
qPCR	kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon ( <i>quantitative polymerase chain reaction</i> )
SOX	(sugu määrav regioon Y)-box ( <i>SRY-box</i> )
TAD	transaktivatsiooni domeen ( <i>transactivation domain</i> )
TCDD	2,3,7,8-tetraklorodibenso- <i>p</i> -dioksiin ( <i>2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin</i> )
WT	metsiktüüpi ( <i>wild-type</i> )
ZP	vitellinembraan ehk <i>zona pellucida</i>
XRE	ksenobiootiline vastuselement ( <i>xenobiotic response element</i> )

## Sissejuhatus

Arüülsüivesinike retseptor (AHR) on ligand-aktiveeritav transkriptsioonifaktor, mis on eelkõige tuntud kui mitmete keskkonnakemikaalide, sealhulgas 2,3,7,8-tetraklorodibenso-*p*-dioksiini ehk TCDD, toksilise toime vahendaja. Lisaks on näidatud, et AHR-il on oluline endogeenne roll erinevates füsioloogilistes protsessides ning normaalses arengus. Ahr-i *knockout* hiirtel on demonstreeritud vähenenud viljakust, häireid immuunsüsteemis ning maksa, aju ja südame arengus.

Dioksiinid on keskkonnas levinud saasteained, mis kutsuvad oma toksilisuse tõttu inimorganismis esile mitmesuguseid patoloogilisi muutuseid. Tegemist on ülemaailmse rahvatervise probleemiga, kuna uuringud on näidanud, et isegi madalas doosis pikaajaline dioksiiniga kokkupuude võib suurendada populatsioonis sünnidefektide esinemissagedust. Seetõttu on oluline uurida, missugustes arenguetappides ja läbi milliste mehhanismide võivad dioksiinid põhjustada arenguhäireid. Dioksiinide toimet inimese embrüonaalsele arengule on võimalik mimikeerida, kasutades mudelina pluripotentsid inimese embrüonaalseid tüvirakke, mis on võimelised arenema kõigiks kehaomasteks rakutüüpideks.

Käesoleva töö eesmärgiks oli välja selgitada, missugust toimet avaldab arüülsüivesinike retseptori agonist TCDD inimese embrüonaalsete tüvirakkude pluripotentsusele ning varajasele neuraalsele, mesodermaalsele ja endodermaalsele diferentseerumisele. Lisaks oli käesoleva töö huviobjektiks analüüsida AHR-i ülegenoomset seondumist pluripotentsetes inimese embrüonaalsetes tüvirakkudes ning nende diferentseerunud järglastes, leidmaks, milliseid geene võiks AHR potentsiaalselt embrüonaalse arengu käigus reguleerida.

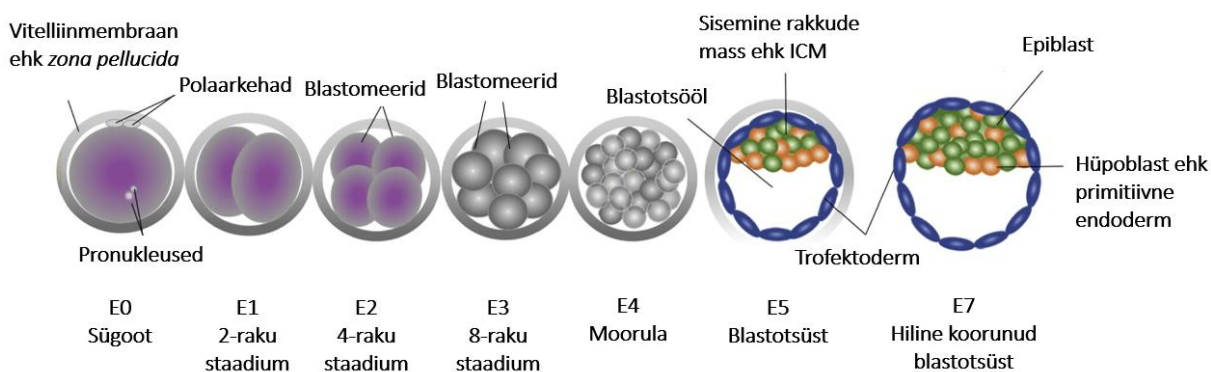
# 1. Kirjanduse ülevaade

## 1.1. Inimese embrüonaalsed tüvirakud

### 1.1.1. Inimese varane embrüonaalne areng

Inimese arengu esimeseks etapiks on munaraku viljastumine seemnerakuga. Nende kahe raku ühinemise tulemusena moodustub munajuhas totipotentne rakk, mida nimetatakse sügoodiks (Joonis 1) (Gilbert, 2000). Totipotentsus on raku võime genereerida kõikvõimalikke rakutüüpe ning neid korrektse kehaplaani moodustamiseks organiseerida. Seejuures on oluline, et rakk paikneks toetavas keskkonnas (Condic, 2014). Viljastumise toimumise järgselt liigub embrüo mööda munajuha emaka suunas ning mõne päeva jooksul leiavad iga 12-24 tunni möödudes aset mitootilised raku jagunemised – seda protsessi nimetatakse lõigustumiseks (Gilbert, 2000).

16-raku ehk moorula staadiumis diferentseeruvad blastomeerid kas rakkudeks, mis annavad aluse blastotsüsti sisemise rakkude massi ehk ICM-i (*inner cell mass*) või blastotsüsti välimise rakukihi ehk trofektodermi moodustumisele (Fleming, 1987). ICM-ist areneb inimorganism ning trofektodermist arenevad ekstraembrüonaalsed koed, mis toetavad loote arengut, näiteks loote poolne osa platsentast ehk koorion (Gilbert, 2000). Blastotsüsti staadiumis ICM-ist eraldatud rakke saab kasvatada koekultuuris ning neid nimetatakse inimese embrüonaalseteks tüvirakkudeks ehk hES rakkudeks (*human embryonic stem cells*) (Thomson, 1998).



**Joonis 1. Inimese varane embrüonaalne areng.** Inimorganismi areng saab alguse viljastatud munarakust ehk sügoodist, mis läbib lõigustumise protsessi, st rakud jagunevad ilma kasvamiseta. Rakkude jagunemise käigus läbitakse moorula ehk 16-raku staadium ning viiendal embrüonaalsel päeval (E5) tekib esimese diferentseerumise tulemusena blastotsüst, milles on eristatavad kaks rakupopulatsiooni – trofektoderm (joonisel sinine) ning ICM (blastotsüsti joonisel oranži ja rohelisega). Teise diferentseerumissündmuse käigus eristuvad ICM-is kaks rakupopulatsiooni – epiblast (joonisel roheline) ning hüoblast ehk primitiivne endoderm (joonisel oranž). ICM rakke saab embrüost isoleerida ning kultuuris kasvatada – nii saadaksegi hES rakud. Kohandatud Ortega jt. (2018) järgi.

### 1.1.2. Embrüonaalsete tüvirakkude iseuuenemisvõime ja pluripotentsus

Iseuuenemine on protsess, mille käigus tüvirakk jaguneb asümmeetriliselt või sümmeetriliselt, genereerides vastavalt kas ühe või kaks tütarrakku, millel on emarakule sarnane arengupotentsiaal. Embrüonaalsete tüvirakkude (ES rakud) piiramatult iseuuenemisvõime ja pluripotentsus suudetakse tagada tänu unikaalsele transkriptsiooni ja rakutsükli regulatsioonile (Shenghui jt., 2009). hES rakkude iseuuenemist toetab näiteks somaatilistest rakkudest lühem rakutsükkel, mille pikkust on vähendatud G1 faasi lühendamisega (Becker jt., 2006). Iseuuenemisvõime tagamisel on oluliseks mehhanismiks embrüonaalsete tüvirakkude apoptootilise rakusurma takistamine. Somaatilistes rakkudes lühenevad kromosoomid iga rakujagunemise tagajärjel (Muraki jt., 2012), kuni lõpuks saavutatakse kriitiline pikkus, mis viib apoptootilise rakusurma (Sharpless ja DePinho, 2007). ES rakkude puhul tagab nende piiramatult jagunemisvõime kõrge telomeraasne aktiivsus (Thomson, 1998). Telomeraas on ensüüm, mis aitab stabiliseerida telomeeride pikkust lisaks hES rakkudele ka idutee rakkudes (Wright jt., 1996) ning vähirakkudes, lisades kromosoomide otsesse juurde telomeerseid TTAGGG korduseid (Kim jt., 1994).

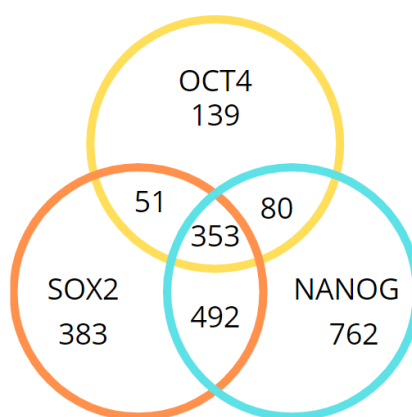
Potentsus on raku võimekus diferentseeruda spetsialiseerunud rakkudeks. Diferentseerumisvõimelised rakud võivad olla väga erineva arengupotentsiaaliga – totipotentsed, pluripotentsed, multipotentsed või unipotentsed. Näiteks on viljastatud munarakk totipotentne ehk võimeline arenema kõikvõimalikeks keharakkudeks, sealhulgas looteväliste kudede (näiteks platsenta) rakkudeks. Hematopoeetilisel tüvirakul (HSC – *hematopoietic stem cell*) on aga viljastatud munarakust märkimisväärselt limiteeritud arengupotentsiaal, olles võimeline produtseerima vaid erinevaid vererakke, st tegemist on multipotentse rakuga (Singh jt., 2016). ICM ja hES rakud on pluripotentsed, mis tähendab, et nad on võimelised moodustama kõigi kolme lootelehe – endodermi, ektodermi ning mesodermi – rakke, kuid mitte kõiki ekstraembrüonaalsete kudede rakke (Gilbert, 2000).

Uusi ES rakuliine genereerides on tarvis teostada funktsionaalseid teste, tõestamaks, et saadud rakud on pluripotentsed. Üheks võimalikuks testiks on ES rakkude agregeerimine areneva embrüoga, mis läbi sünnivad kimäärsed organismid. Kimääri moodustumisse panustanud ES rakkude osakaal ning organismi elujõulisus määravad ära ES rakkude diferentseerumisvõimekuse (Nagy jt., 1993). Inimese embrüonaalsete tüvirakkude pluripotentsuse demonstreerimiseks pole aga selline eksperiment selgelt eetilisele sobilik. Seetõttu rakendatakse hES rakkude pluripotentsuse hindamiseks nende süstimist raske kombineeritud immuunpuudulikkusega hiirtesse, misjärel vaadeldakse teratoomide

moodustumist (Reubinoff jt., 2000). Samuti võib hES rakke diferentseerida *in vitro*, genereerides embrüonaalseid kehasid (EB – *embryoid body*) (Itskovitz-Eldor jt., 2000). Seejuures on oluline kontrollida, kas teratoomides või embrüonaalsetes kehas on moodustunud ektodermaalsed, endodermaalsed ning mesodermaalsed struktuurid ning kas neis ekspresseeritakse vastavatele suundadele omaseid markergeene (Itskovitz-Eldor jt., 2000; Reubinoff jt., 2000).

### 1.1.3. Inimese embrüonaalsete tüvirakkude pluripotentsusmarkerid

hES rakud ekspresseerivad pluripotentsuse säilitamiseks mitmeid transkriptsioonifaktoreid, neist kesksel kohal on OCT4 (oktameerile seonduv transkriptsioonifaktor 4), SOX2 [(sugu määrav regioon Y)-box 2] ja NANOG. Nende transkriptsioonifaktorite puhul on näidatud vähemalt 353 ühise sihtmärkgeeni olemasolu (Joonis 2). Näiteks aktiveerivad OCT4, SOX2 ja NANOG üheskoos geene, mille hulka kuuluvad mitmed transkriptsioonifaktorid, kromatiini remodelleerijad ja histooni modifitseerivad kompleksid, aga ka TGF- $\beta$  (transformeeriv kasvufaktor beeta, *transforming growth factor beta*) ja WNT signaaliraja komponendid (Boyer jt., 2005), mille olulisust pluripotentsuse ja iseuenemisvõime tagamisel on varasemalt näidatud (James jt., 2005).



**Joonis 2. OCT4, SOX2 ning NANOG-i sihtmärkgeenide arv hES rakkudes.** Venni diagrammil on kujutatud geenide arv, mille promootorile pluripotentsusmarkerid hES rakkudes seonduvad. Kohandatud Boyer jt. (2005) järgi.

Lisaks pluripotentsust tagavate mehhanismide reguleerimisele represserivad OCT4, SOX2 ja NANOG samaaegselt diferentseerumiseks vajalikke transkriptsioonifaktoreid. Samuti reguleerivad need transkriptsioonifaktorid nii iseenda kui ka teineteise ekspressiooni (Boyer jt., 2005). hES rakkude pluripotentsuse säilitamiseks on oluline hoida kesksete regulaatorsete transkriptsioonifaktorite ekspressiooni kindlal tasemel, kuna on näidatud, et muutused OCT4,

SOX2 ja NANOG-i tasemetes viivad hES rakkude diferentseerumiseni (Adachi jt., 2010; Hyslop jt., 2005; Niwa jt., 2000).

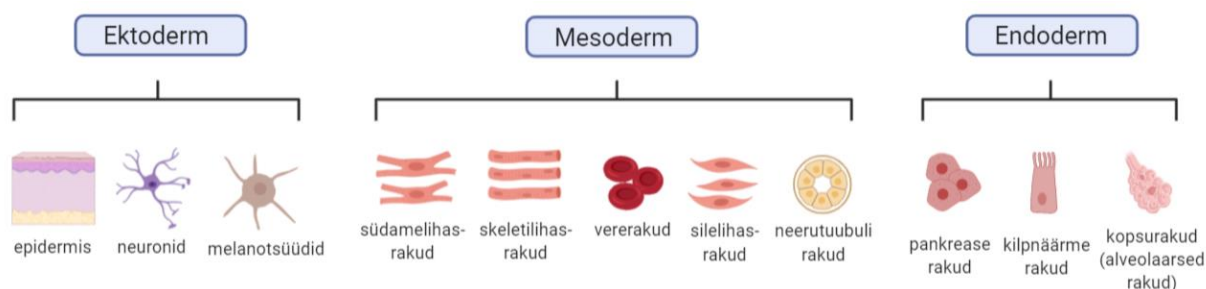
OCT4 on transkriptsioonifaktor, mis kuulub POU (Pit-Oct-Unc) perekonda ning mida kodeerib *POU5F1* geen. OCT4 valgul on mitmeid pseudogeene, samuti on alternatiivse splaiisingu tulemusena võimalik saada mitmeid OCT4 valgu isovorme (NCBI a). OCT4 kuulub oktameeriga seonduvate transkriptsioonifaktorite perekonda, mis on oma nime saanud DNA järjestusele 5'-ATTTGCAT-3' seondumise järgi (Uniprot a). OCT4 on võimeline heterodimeriseeruma SOX2-ga ning seonduma seejärel sihtmärkgeenide, sealhulgas iseenda, *SOX2* ja *NANOG*-i reguleerivatele järjestustele (Boyer jt., 2005; Rodda jt., 2005). Valgu OCT4 olulisust pluripotentsuse säilitamisel on demonstreeritud *knockout* hiirtel. Leiti, et OCT4<sup>-/-</sup> embrüod on võimelised arenema blastotsüsti staadiumini, kuid moodustuv ICM ei suuda säilitada pluripotentset olekut, vaid diferentseerub trofektodermiks, mis läbi on OCT4 puudumine arenevale embrüole letaalne (Nichols jt., 1998).

NANOG on homeodomeeni sisaldav transkriptsioonifaktor, mida kodeerib *NANOG*-i geen ning mida ekspresseeritakse imetajate pluripotentsetes rakkudes. NANOG-il on olemas 11 pseudogeeni (Uniprot b), millest mõned võivad samuti potentsiaalselt hES rakkude diferentseerumist mõjutada. NANOG on oluline epiblasti ning primitiivse endodermi eristumise etapis. NANOG-it ekspresseerivad rakud moodustavad epiblasti ning GATA6 (GATA-seonduv valk 6) ekspresseerivad rakud moodustavad primitiivse endodermi (Chazaud jt., 2006). Sarnaselt teistele pluripotentsusmarkeritele ei arene hiire embrüo NANOG-i puudumisel blastotsüsti staadiumist edasi, kuna ICM kaotab oma pluripotentsuse ja iseuenemisevõime (Mitsui jt., 2003).

SOX2 on transkriptsioonifaktor, mida transkribeeritakse *SOX2* geenilt ning mis sisaldab kõrgelt konserveerunud DNA-ga seondumisel osalevat HMG-box (*high mobility group*) domeeni (Uniprot c). *SOX2 knockout* hiirte embrüod arenevad blastotsüsti staadiumini, kuid hukuvad peagi pärast implanteerumist (Avilion jt., 2003). Ektodermaalse ning mesendodermaalse suuna valikul on oluline valkude OCT4 ja SOX2 tasemete suhe. Madal SOX2 ja kõrge OCT4 tase soodustab mesendodermaalset arengut ning madal OCT4 ja kõrge SOX2 tase võimaldab ektodermaalset diferentseerumist (Thomson jt., 2011a). Diferentseerumisprotsessi alustamiseks on aga vajalik NANOG-i allaregulatsioon (Thomson jt., 2011b).

### 1.1.4. Inimese embrüonaalsete tüvirakkude diferentseerumine

Arenevas organismis tekivad erinevatest lootelehtedest kindlat tüüpi koed – endodermist arenevad sooleepiteel, hingamiseldkond, maks, pankreas, sapipõis ja kilpnääre, mesodermist sidekude, veri, luud, sugunäärmed ja neerud ning ektodermist närvisüsteem ja epidermis (Joonis 3) (Gilbert, 2000). Sarnaselt on hES rakud võimelised *in vitro* diferentseeruma kolme lootelehe suunda. Selleks on vajalik, et rakkude kasvukeskkonnas sisalduksid samad faktorid, mis osalevad lootelehtede moodustumisel embrüogeneesi käigus (Gadue jt., 2005).



**Joonis 3. Lootelehed ja näited nende derivaatidest.** Inimese arengu käigus moodustub embrüos kolm lootelehte (ektoderm, mesoderm ja endoderm), mis annavad aluse spetsiifiliste kudede ning organite arenguks. Kohandatud Heins jt. (2004) järgi.

Kui hES rakkudel võimaldatakse koekultuuris suspensioonis spontaanselt diferentseeruda, moodustuvad kolmedimensionaalsed agregaadid ehk embrüonaalsed kehad, mis sisaldavad endas kõigi kolme lootelehe derivaate (Itskovitz-Eldor jt., 2000). Embrüonaalsed kehad on heaks mudeliks, mille põhjal uurida raku saatuse ja diferentseerumise mehhanisme, kuna teatud arenguprogrammide puhul on rakk-rakk interaktsioonid kriitilise tähtsusega (Keller, 2005). Varasemalt on hiire embrüonaalseid kehasid kasutatud organ-laadsete struktuuride ehk organoidide (Eiraku jt., 2011), samuti embrüo-laadsete struktuuride ehk embrüoidide loomiseks (Brink jt., 2014). Konkreetsete raketüüpide genereerimiseks pole aga spontaanne diferentseerimine eriti efektiivne, kuna kõrvalproduktina saadakse ka soovimatuid raketüüpe. Kindlate raketüüpide tootmiseks lisatakse hES rakkude kasvukeskkonda faktoreid, mis suunavad arengut soovitud raketüübi suunas ning faktoreid, mis inhibeerivad arengut teistesse suundadesse. Tänapäeval on välja töötatud kommertsiaalsed söötmed, mis võimaldavad hES rakkude diferentseerimist kõigisse lootelehtedesse.

hES rakke ektodermaalsesse suunda diferentseerides on eelkõige keskendunud neuraalsete eellasrakkude genereerimisele, mis on võimelised diferentseeruma kesknärvisüsteemi rakkudeks – neuroniteks, astrotsüütideks ning oligodendrotsüütideks. hES rakkudest toodetud neuraalseid eellasrakke on siiratud vastündinud hiire aju ning näidatud nende edasist diferentseerumist küpseteks neuroniteks ning gliarakkudeks, mis paigutusid erinevatesse aju

osadesse (Zhang jt., 2001). Neuraalsed eellasrakud säilitavad pluripotentsusmarkeri *SOX2* ekspressiooni ning ekspresseerivad muuhulgas selliseid markereid nagu nestiin, *SOX1* ja *SOX3* (Dhara ja Stice, 2008). Üheks laialt kasutatavaks neuraalse suuna markeriks on *PAX6* (*paired box protein 6*). On teada, et selle geeni ekspressioon aktiveeritakse hES rakkude neuraalse diferentseerimise varases etapis, aga ka inimloote varastes neuroektodermaalsetes rakkudes (Zhang jt., 2010). Neuraalse suuna markeriks on ka transkriptsioonifaktor *OTX2* (*orthodenticle homeobox 2*), mis on olulise tähtsusega inimese aju, eelkõige väikeaju ja vaheaju arengus (Larsen jt., 2010).

Arvatakse, et hES rakkude diferentseerumine endodermaalsesse ja mesodermaalsesse suunda toimub läbi vahepealse mesendodermi (Task jt., 2012). Kasvatades hES rakke kõrges kontsentratsioonis aktiivis A juuresolekul, toimub diferentseerumine definitiivse endodermi (epiblasti päritolu endodermi) suunas (D'Amour jt., 2005). Definitiivse endodermi rakkude saamine võimaldab edasist diferentseerimist näiteks maksa- või pankreaserakkudeks. Näiteks on suudetud hES rakkudest *in vitro* genereerida funktsionaalseid pankrease beetarakke. Seejuures demonstreeriti hiire mudelil nende rakkude võimet sekreteerida insuliini ning vähendada diabeedi korral hüperglükeemia progresseerumist (Pagliuca jt., 2014). On leitud, et varaseks endodermaalseks diferentseerumiseks on vajalik transkriptsioonifaktori *FOXA2* (*forkhead box valk A2*) ekspressioon. Endodermaalsed eellasrakud ekspresseerivad lisaks markergeene *SOX17* [(sugu määrav regioon Y)-box 17] ja *GATA4* (GATA-seonduv valk 4) (Kopper ja Benvenisty, 2012).

hES rakud on suutelised spetsiifiliste morfogeenide juuresolekul läbima epiteliaalse-mesenhümaalse transitsiooni ning diferentseeruma mesodermaalseteks eellasrakkudeks, mis on aluseks vererakkude, mesenhüümi (luud, kõhred, rasvarakud), endoteeli, silelihas- ja südamelihaskude arengule (Evseenko jt., 2010). Kõige enam on mesodermaalse arengusuuna puhul keskendunud terapeutilisel eesmärgil kardiomiotsüütide ja hematopoeetiliste rakkude tootmisele. Näiteks on Wang jt. (2006) näidanud, et hES rakkudest genereeritud hematopoeetilised rakud on võimelised taastasustama immuunpuudulike hiirte luuüdi. Mesodermaalsel diferentseerumisel on oluline BMP (luu morfogeene valk, *bone morphogenetic protein*) signaliseerimine, mis indutseerib hES rakkudes varajase mesodermi markergeeni *BRA* (*BRACHYURY*) ekspressiooni (Bernardo jt., 2011). Mesodermaalse suuna markeriteks on ka *HAND1* (südame ja neuraalharja derivaatide poolt ekspresseeritud valk 1), mis mängib olulist rolli kardiomiotsüütide diferentseerumisel (Riley jt., 1998), ning *GSC* (*homeobox valk gooseoid*), mida ekspresseeritakse mesendodermis (Tada jt., 2005).

### **1.1.5. Inimese embrüonaalsete tüvirakkude liinid**

Esimesed hiire embrüonaalsed tüvirakud (mES rakud) isoleeriti aastal 1981 (Evans ja Kaufman, 1981), kuid inimese embrüonaalsed tüvirakud alles 17 aastat hiljem. Kokku saadi viis rakuliini, millest kolm (H1, H13 ja H14) olid normaalse XY karüotüübiga ning kaks rakuliini (H7 ja H9) normaalse XX karüotüübiga. Seni on genereeritud kokku üle 400 hES rakuliini (*NIH Central Resource for Grants and Funding Information* andmetel) ning H9 rakuliin on üheks kõige sagedamini teadusuuringutes kasutatavaks hES rakuliiniks.

Kultiveerides H1, H7 ja H9 hES rakuliine kahe aasta jooksul, on näidatud nii madala kui kõrge passaažiarvuga rakkude normaalset karüotüüpi, aga ka hES rakkudele omaste pinnamarkerite ja transkriptsioonifaktorite ekspressiooni püsijäämist (Rosler jt., 2004). Kuigi embrüonaalsete tüvirakkude liine peetakse iseuuenemise, pluripotentsusmarkerite ekspressiooni ning diferentseerumisvõime poolest väga sarnasteks, on üha enam ilmne, et liinide vahel esineb ka erinevusi – pikaajalisel kasvatamisel on täheldatud rakuliinide vahelisi erinevusi kasvukiiruses ja epigeneetilises stabiilsuses (Cowan jt., 2004; Hoffman ja Carpenter, 2005). Samadel koekultuuritingimustel kasvatatud erinevate hES rakuliinide puhul on täheldatud ka erinevusi geeniekspressioonis. Üllataval kombel on kolme hES rakuliini (HSF-1, HSF-6 ja H9) võrdlusel leitud, et neis rakuliinides ekspresseeritavatest geenidest vaid 52% on ekspresseeritud kõigis kolmes ning igas hES rakuliinis ekspresseeritakse sadu unikaalseid gene (Abeyta jt., 2004).

### **1.1.6. Inimese embrüonaalsete tüvirakkude kasvatamine koekultuuris**

hES rakke iseloomustab kõrge tuuma ja tsütoplasma suhe ning selgelt eristatavad tuumakesed (Sathananthan jt., 2002). hES rakud kasvavad kompaktselt konkreetset piiritletud kolooniatena ning koekultuuris kasvatades tuleb spontaanse diferentseerumise vältimiseks jälgida, et kolooniad ei kasvaks liiga suureks (Schwartz jt., 2011). hES rakke kasvatati algselt ksenogeensete komponentide, näiteks veise loote seerumi juuresolekul. Tänapäeval on aga võimalik loomsete patogeenide ning immunogeensete molekulide rakukultuuri kandumise vältimiseks asendada loomsed komponendid täielikult defineeritud kommertsiaalsete söötmetega (Dakhore jt., 2018).

hES rakud vajavad *in vitro* kasvuks sobivat substraati. Selleks sobivad erinevad mitootiliselt inaktiveeritud toiterakud, näiteks hiire embrüonaalsed fibroblastid, kuid loomsete produktide rakukultuuri sattumise vältimiseks on võimalik kasutada ka inimese embrüonaalseid

fibroblaste, emaka endomeetriumi rakke või rinna parenhüümi rakke (Lee jt., 2004). hES rakke on võimalik kasvatada ka ekstratsellulaarsel maatriksil – Matrigelil, laminiinil, fibronektiinil või kollageen IV substraadil. Kasvatades hES rakke aga näiteks želatiinil, väheneb rakkude elulemus ning rakud alustavad diferentseerumist (Xu jt., 2001). Matrigel on želatiinse konsistentsiga ekstratsellulaarse maatriksi valkude kogum, mis on eraldatud hiire Engelbreth-Holm-Swarm tuumorist (Kleinman ja Martin, 2005) ning mille peamisteks komponentideks on laminiin, kollageen IV ja enaktiin (Hughes jt., 2010).

hES rakke on võimalik passeerida kas mehaaniliselt või ensümaatilisel. Mehaanilisel passeerimisel lõhutakse kolooniad tükkideks ning kantakse uuele koekultuuri plaadile. Seejuures valitakse edasi passeerimiseks kolooniad, millel puuduvad visuaalsed märgid diferentseerumisest. Kuigi mehaaniline passeerimine on aja- ja töömahukas, võimaldab see saada ühtlasema suurusega kolooniaid. Ensümaatilisel passeerimisel eraldatakse üksteise külge adhereerunud rakud ensüümide, näiteks kollageenaasi abil. Ensümaatilise passeerimise miinuseks on suur varieeruvus kolooniatükkide suuruses, mistõttu saavutatakse ebahühtlane rakkude jaotumine. Samuti esineb suurem tõenäosus, et passeeritakse kaasa ka diferentseerunud rakke (Oh jt., 2005). Ühtlasi on leitud, et pidev ensümaatiline töötlus võib tekitada hES rakkudes aneuploidiaid. Nimelt demonstreerisid Brimble jt. (2004), et kolooniate ensümaatilisel lõhkumisel esines rohkem kromosoomide 12 ja 17 trisoomiaid, samas kui manuaalsel passeerimisel säilitas hES rakukultuur normaalse karüotüübi. Ensümaatilise passeerimine eeliseks on eelkõige kiirus ning seetõttu eelistatakse seda hES rakkude masstootmisel (Oh jt., 2005).

### **1.1.7. Inimese embrüonaalsete tüvirakkude terapeutiline potentsiaal**

Tänu hES rakkude suurele arengupotentsiaalile on neid võimalik rakendada terapeutiliselt mitmesuguste degeneratiivsete, pahaloomuliste või geneetiliste haiguste ravis. Suuretes kogustes inimrakkude tootmine on potentsiaalselt kasulik ka ravimiuuringutes erinevates toksikoloogilistes testides kasutamiseks. Lisaks võimaldab hES rakkude uurimine teadlastel täpsemalt mõista inimese varase arengu protsesse, mida ei ole võimalik eetilistel kaalutlustel inimese embrüoid kasutades uurida.

Selleks, et hES rakke oleks võimalik terapeutiliselt rakendada, tuleks neid diferentseerida erinevateks rakutüüpideks, kuna *in vivo* võivad diferentseerumata hES rakud moodustada teratoome (Hentze jt., 2009). Näiteks võib hES rakkudest suunatud diferentseerimise teel saada hepatotsüüte, mida saab kasutada kas inimese maksa arengu molekulaarsete mehhanismide

uurimiseks või ravimite toksilisuse testimiseks (Cai jt., 2014). Diferentseerides hES rakke erinevateks rakutüüpideks, saab neid rakendada ka erinevate koekahjustuste kõrvaldamisel. Näiteks on võimalik hES rakke diferentseerida insuliini produtseerivateks beetarakkudeks ning seejärel siirata neid I tüüpi diabeediga patsientidele, kellel on autoimmuunreaktsiooni tõttu pankreases beetarakud hävinud (Kroon jt., 2008).

Inimese embrüonaalsete tüvirakkude terapeutiliseks kasutamiseks on vaja välja töötada meetodeid piisavas koguses diferentseerunud rakkude tootmiseks. Lisaks on oluline tekitada piisaval hulgal rakuliine, katmaks HLA (inimese leukotsüüdi antigeen, *human leukocyte antigen*) tohutut spektrit, et siirdamisel oleks minimeeritud äratõukereaktsiooni tekkerisk (Taylor jt., 2005). Teiseks võimaluseks on rakuteraapias kasutada indutseeritud pluripotentsid tüvirakke, mis saadakse patsiendi enda somaatiliste rakkude reprogrammeerimisel, kasutades transkriptsioonifaktoreid OCT4, SOX2, c-MYC ja KLF4 (Kruppel-laadne faktor) (Takahashi ja Yamanaka, 2006). Pluripotentsuse molekulaarse olemuse selgitamine on oluline somaatiliste rakkude ümberprogrammeerimise täiustatud strateegiate väljatöötamiseks ning mõistmaks, kuidas saab pluripotentsid tüvirakke huvipakkuvatesse suundadesse diferentseerida (Theunissen ja Jaenisch, 2017).

## 1.2. Arüülsüsivesinike retseptor

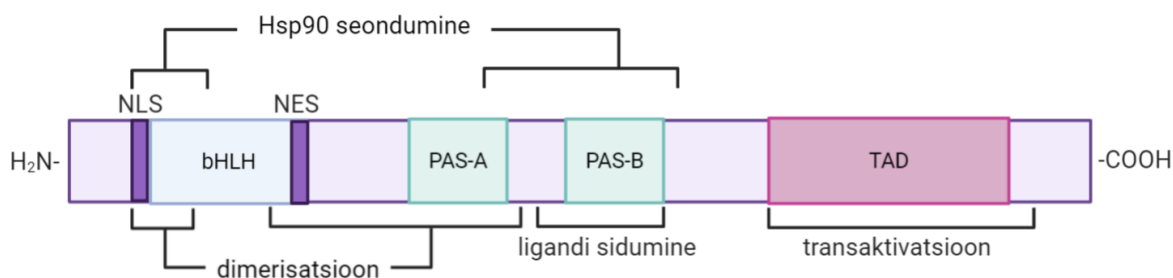
Arüülsüsivesinike retseptor ehk AHR (*aryl hydrocarbon receptor*) on ligand-aktiveeritav transkriptsioonifaktor, mis funktsioneerib ksenobiootikumide ehk kehavõõraste ainete metabolismi vahendaja ja kahjutustajana. AHR-i ligandidena on eelkõige tuntud mitmed keskkonnas leiduvad saasteained, näiteks halogeenitud aromaatsed süsivesinikud ehk HAH-id (*halogenated aromatic hydrocarbon*) (nt dioksiinid ja bifenüülid) ning halogeenimata polütsükliilised aromaatsed süsivesinikud ehk PAH-id (*polycyclic aromatic hydrocarbon*) (nt bensopüreenid) (Denison ja Nagy, 2003). Neist paljud on aga toksiliste ja kartsinogeensete omadustega. Üheks AHR-i potentseimaks ligandiks on halogeenitud aromaadne ühend TCDD ehk 2,3,7,8-tetraklorodibenso-*p*-dioksiin, mis seondub AHR-iga kõrge afiinsusega (Mimura ja Fujii-Kuriyama, 2003). Ligandiga seondunud AHR reguleerib mitmete ksenobiootikumide metaboliseerivate ensüümide, näiteks tsütokroom P450 perekonda kuuluvate geenide *CYP1A1*, *CYP1A2* ja *CYP1B1* ekspressiooni (Nebert jt., 2004).

Lisaks ksenobiootilistele ligandidele (HAH-id ja PAH-id) on mitmed endogeensed ehk organismis sünteesitud ühendid võimelised AHR-i aktiveerima. AHR-i endogeenseteks agonistideks on näiteks indigo ja indigorubiin, mida kasutatakse tekstiilide värvimisel (Adachi

jt., 2001), põletikuvastase toimega arahhidoonhappe metaboliidid – eikosanoidid (nt lipoksiin A4) (Schaldach jt., 1999), aga ka trüptofaani derivaadid, näiteks künureniin (Mezrich jt., 2010). Lisaks on teada, et mitmed toidus leiduvad ühendid, nagu näiteks flavonoidid, on AHR-i antagonistid, mis kaitsevad organismi dioksiini toksilisuse eest (Ashida jt., 2000). AHR-i antagonistiks on ka punases veinis sisalduv resveratrol, mis seondub AHR-iga ja indutseerib selle seondumist DNA-le, kuid inhibeerib sihtmärkgeenide transkribeerimist (Casper jt., 1999).

### 1.2.1. Arüülsüivesinike retseptori struktuur

Inimese AHR on 96 kDa suurune valk, mis koosneb 848 aminohappejäägist (Uniprot d). AHR-i valgul on kolm funktsionaalset domeeni, mille hulka kuuluvad aluseline heeliks-lingheeliks (bHLH – *basic helix-loop-helix*), Per-Arnt-Sim (PAS) ja transaktivatsiooni domeen (TAD – *transactivation domain*) (Fukunaga jt., 1995) (Joonis 4). bHLH domeen paikneb valgu N-terminuses ning osaleb nii DNA-ga seondumises kui ka valk-valk interaktsioonides. bHLH domeenis sisalduvad ka AHR-i tuuma ja tsütoplasma vaheliseks transpordiks vajalikud tuuma lokaliseerimise signaal (NLS – *nuclear localization signal*) ja tuuma ekspordi signaal (NES – *nuclear export signal*) (Ikuta jt., 1998). PAS domeeni moodustavad PAS-A ja PAS-B, mis osalevad teiste PAS valkudega, näiteks AHR-i tuuma translokaatoriga (ARNT – *AHR nuclear translocator*), dimeriseerumises ja *chaperon*-valkudega interakteerumises. PAS-B osaleb lisaks ligandi sidumises (Gu jt., 2000). TAD osaleb AHR-i sihtmärkgeenide transkriptsiooni aktivatsioonis (Kumar jt., 2001).

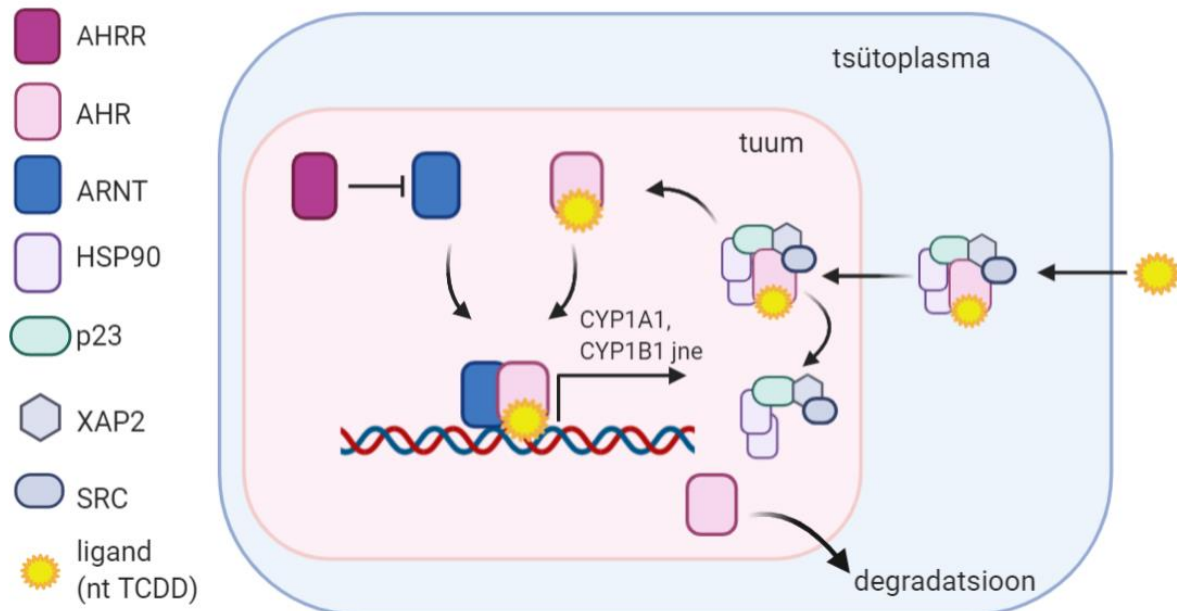


**Joonis 4. Inimese AHR-i valgu struktuur.** AHR-i N-terminuses paikneb DNA-le seondumiseks vajalik bHLH domeen, mis sisaldab tuuma lokaliseerimise signaali (NLS) ja tuuma ekspordi signaali (NES). PAS-A ja PAS-B domeenid osalevad ligandi sidumises ja heterodimeriseerumises. C-terminuses paikneb transaktivatsiooni domeen. Kohandatud Monostory jt. (2009) järgi.

## 1.2.2. Arüülsüivesinike retseptori signaalirada

Kõige enam on uuritud AHR-i signaalirada, mida aktiveerivad erinevad eksogeensed ligandid, näiteks TCDD. Inaktiivne ligandiga seondumata AHR paikneb tsütoplasmas seotuna molekulaarsete *chaperon*-valkude kompleksiga, mis sisaldab endas kahte kuumašokivalku HSP90 (*heat shock protein 90*), *co-chaperoni* p23 (Nair jt., 1996), valku XAP2 (hepatiit B viirus X-seoseline valk 2) (Carver ja Bradfield, 1997) ning proteiinkinaasi c-SRC (proto-onkogeen türosiin-proteiinkinaas SRC) (Enan ja Matsumura, 1996) (Joonis 5).

Ligandiga seondues leiab AHR-i valgus aset konformatsiooniline muutus, misjärel avaneb tuuma lokaliseerimise signaal (NLS) (Ikuta jt., 1998). Seejärel liigub ligandiga seondunud AHR tuuma, vabaneb *chaperon*-valkudest (Mimura ja Fujii-Kuriyama, 2003) ja moodustab funktsionaalse heterodimeeri ARNT-iga (Reyes jt., 1992). Moodustunud heterodimeer tunneb ära ksenobiootilise vastuselemendi ehk XRE (*xenobiotic responsive element*) konsensusjärjestuse 5'-TNGCGTG-3', mis paikneb AHR-i sihtmärkgeenide reguleeritud alades (Mimura jt., 1999; Swanson jt., 1995). Transkriptsiooni reguleerimise järgselt eemaldatakse AHR-ARNT heterodimeer XRE järjestuselt, seejärel transporditakse AHR tsütoplasmasse ning lagundatakse proteasoomis (Davarinos ja Pollenz, 1999).



**Joonis 5. AHR-i klassikaline signaalirada.** Kohandatud Rothhammer ja Quintana (2019) järgi.

Üheks enim uuritud AHR-i sihtmärkgeeniks on *CYP1A1* (Israel ja Whitlock, 1984). On teada, et AHR-i sihtmärkgeeniks on ka tema enda repressor *AHRR* (*aryl hydrocarbon receptor repressor*). Sarnaselt AHR-ile moodustab AHRR heterodimeeri ARNT-iga, kuid moodustuv kompleks on transkriptsiooniliselt inaktiivne. Kuna AHRR ja AHR konkureerivad ARNT-iga

dimeriseerumise osas, vähendatakse läbi negatiivse tagasiside AHR-i poolt indutseeritud sihtmärkgeenide ekspressiooni (Mimura jt., 1999).

Lisaks genoomsetele mehhanismidele on AHR võimeline bioloogilisi protsesse reguleerima ka läbi mittegenoomse signaliseerimise. Näiteks põhjustab c-SRC vabanemine AHR-i tsütoplasmaatilisest *chaperon*-valkude kompleksist mitmete c-SRC sihtmärkvalkude fosforüleerimist (Enan ja Matsumura, 1996). Huvitaval kombel on leitud, et ligandi poolt aktiveeritud AHR võib käituda ubikvitiinligaasina ning suunata seeläbi steroidhormoonide retseptoreid, näiteks östrogeeni retseptorit proteasoomsele lagundamisele (Ohtake jt., 2007).

### **1.2.3. Arüülsüivesinike retseptori roll organismis**

Arüülsüivesinike retseptori homolooge on tuvastatud paljudel loomaliikidel, nii selgroogsetel kui selgrootutel, mis tähendab, et tegemist on evolutsiooniliselt konserveerunud valguga (Hahn, 2002). Näiteks on teada, et *Drosophila melanogaster*-i AHR-iga homoloogne valk *spineless* on vajalik äädikakärbse jäsemete ja tundlate distaalsete piirkondade arenguks (Duncan jt., 1998). Samuti on imetajate puhul leitud, et AHR on vajalik mitte ainult keskkonnakemikaalide kahjutustamisel, aga ka mitmetes muudes füsioloogilistes protsessides. Uuringud Ahr-i *knockout* hiirtega on näidanud, et AHR osaleb rakkude proliferatsiooni regulatsioonis, organismi normaalse arengu tagamisel ning südame, veresoonte, soolestiku, naha ja mitmete teiste kudede homöostaasi säilitamisel (Fernandez-Salguero jt., 1997). Kuna selgrootute AHR-i homoloogidel puudub võime seonduda dioksiiniga, arvatakse, et AHR omas algselt vaid organismi arenguprotsessidega seotud funktsioone ning võime seonduda HAH-ide ja PAH-idega on selgroogsete puhul uus omandatud funktsioon (Hahn, 2002).

Vaatamata aastakümnete pikkustele intensiivsetele uuringutele ei ole AHR-i füsioloogilised funktsioonid inimese organismis lõplikult teada. Uuringuid raskendavad erinevused liikide vahel, aga ka rakutüübist ning raku kontekstist sõltuvate AHR-i funktsioonide esinemine. On teada, et AHR-i ekspresseeritakse nii loote arengu käigus kui ka täiskasvanud inimese organismis erinevates kudedes erineval tasemel (Dolwick jt., 1993; Jiang jt., 2010). Täiskasvanueas ekspresseeritakse AHR-i konstitutiivselt võrdlemisi kõrgel tasemel maksas ning barjäärsetes kudedes nagu näiteks nahas, kopsudes, soolestikus ja platsentas (Dolwick jt., 1993). Need koed sisaldavad immuunrakke, millest näiteks Th17-rakud ekspresseerivad kõrgel tasemel AHR-i. Samuti on teada, et AHR-i aktivatsioon soodustab Th17-rakkudeks diferentseerumist ning IL-22 (interleukiin-22) tootmist (Veldhoen jt., 2009). AHR-i rolli immuunsüsteemis on demonstreeritud TCDD manustamisega tüüp I diabeediga NOD (*non-*

*obese diabetic*) hiirtele, mislõbi suurenes pankrease lümfisõlmedes CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> reguleerivate T-rakkude populatsioon ning vähenes pankrease saarekeste kahjustumine, viies kokkuvõttes diabeedi taandumiseni (Kerkvliet jt., 2009).

On teada, et AHR omab olulist füsioloogilist funktsiooni reproduktiivorganites ning nii liigne AHR-i aktivatsioon kui ka AHR-i puudumine põhjustavad reproduktiivseid häireid. Kokkupuude TCDD-ga võib läbi AHR-i viia munasarja antraalsete folliikulite arvukuse vähenemiseni (Heimler jt., 1998), häirida steroidhormoonide tootmist (Morán jt., 2003) ning tekitada häireid menstruaaltsükli (Eskenazi jt., 2002) ja spermatogeneesis (Simanainen jt., 2004). Ahr-i *knockout* hiired on võimelised saama järglasi, kuid vähenenud viljakuse tõttu sünnib väiksem pesakond. Ahr-defitsiitsete hiirte munasarjad on tavapärasest väiksemad ning sisaldavad vähem kollaskehi, mis viitab sellele, et ovulatsiooni toimumine on häiritud, kuna folliikulite küpsemist ei viida lõpuni (Baba jt., 2005).

AHR-i ja tema ligandide osalust on demonstreeritud mitmetes vähitüüpides. 15 aastat pärast Itaalias 1976. aastal toimunud tööstusõnnetust, mil tuhanded inimesed puutusid kokku kõrges kontsentratsioonis TCDD-ga, on antud populatsioonis tuvastatud kõrgenenud müeloidse leukeemia, mitte-Hodgkini lümfoomi ning lümfohematopoeetiliste kasvaja esinemissagedus (Bertazzi jt., 2001). Mitmed laborid on näidanud, et isegi eksogeensete ligandide puudumisel on AHR konstitutiivselt aktiivne ning kõrgel tasemel ekspresseeritud mitmetes vähitüüpides, näiteks maovähi (Peng jt., 2009), pankreasevähi (Koliopanos jt., 2002) ja glioblastoomi (Gramatzki jt., 2009) puhul. AHR-i signaaliseerimise moduleerimist peetakse paljutöötavaks sihtmärgiks uute ravimite väljatöötamisel, eriti vähi ning põletikuliste ja autoimmuunhaiguste ravi eesmärgil, mistõttu on AHR-iga seotud bioloogiliste mehhanismide uurimine väga oluline.

#### **1.2.4. Arüüsüsivesinike retseptor varases arengus ning tüvirakkudes**

Ahr-i funktsionaalne roll on ilmnunud ka imetajate varases embrüonaalses arengus. Hiljuti demonstreerisid Nacarino-Palma jt. (2020) Ahr-i dünaamikat hiire embrüos 2-raku staadiumist kuni blastotsüsti staadiumini. Seejuures näidati, et Ahr lokaliseerub blastotsüstis eelkõige blastomeerides, mis edasise arengu käigus diferentseeruvad trofektodermiks, ning puudub blastomeerides, mis annavad aluse ICM-i moodustumisele. See viitab Ahr-i võimele limiteerida ekstraembrüonaalseid kudesid genereerivate blastomeeride pluripotentsust. Sama uuringu käigus leiti, et Ahr-i *knockout* hiirte embrüotes ekspresseeritakse sügoodist kuni moorula staadiumini metsiktüüpi (WT – *wild-type*) embrüotest märkimisväärselt kõrgemal tasemel pluripotentsusmarkereid Oct4 ja Nanog. Samuti leiti, et mõlema pluripotentsusmarkeri

lokalisatsioon Ahr-defitsiitsetes embrüotes on WT embrüotest erinev, mis viitab sellele, et Ahr reguleerib hiire embrüo varases arengus pluripotentsusmarkerite lokaliseerimist. Nendest tulemustest võib järeldada, et Ahr on oluline pluripotentsuse ja diferentseerumise regulatsioonis.

Kooskõlas hiire embrüos toimuvaga ekspresseeritakse mES rakkudes (hiire embrüonaalne tüvirakk, *mouse embryonic stem cell*) Ahr-i väga madalal või lausa puudulikul tasemel, kuid diferentseerumise indutseerimisel suureneb Ahr-i ekspressioon kiiresti. On leitud, et Ahr-i ekspressiooni vaigistatakse mES rakkudes läbi pluripotentsusmarkerite Oct4, Sox2 ja Nanog ning Polycomb valkude seondumise Ahr-i promootorile (Ko jt., 2014). Ahr-i ekspressiooni taastades reguleeritakse alla Oct4 ja Sox2 ekspressioon, mis läbi väheneb mES rakkude pluripotentsus. Ahr-defitsiitsete mES rakkude puhul on diferentseerumisel täheldatud WT rakkudega võrreldes mesendodermi markerite (*Sox17*, *Gata4*) allaregulatsiooni ning ektodermi/neuroglia markerite (*Notch1*, *Lhx5*) ülesregulatsiooni. See viitab, et Ahr-i ekspressioon mES rakkudes indutseerib diferentseerumist ektodermi/neuroglia suunas ning blokeerib arengut mesendodermi. Seega on selge antud valguga vajalikkus imetajate normaalses embrüogeneesis.

AHR-i osalust on demonstreeritud ka inimese tüvirakkudes. Huvitaval kombel reguleerib AHR inimese hematopoeetiliste tüvirakkude multipotentsust. Nimelt on leitud, et AHR-i inhibeerimine võimaldab HSC-de ekspansiooni. Boitano jt. (2010) kasutasid hematopoeetiliste tüvirakkude *ex vivo* paljundamiseks AHR-i antagonistiga StemRegenin 1 ning selle tulemusena saadi tavapärasest 17 korda rohkem terapeutiliseks siirdamiseks sobilikke rakke. Lisaks on teada, et ka Ahr-i geeni deleteerimine hiirtel võimaldab hematopoeetiliste tüvirakkude proliferatsiooni (Singh jt., 2011), mis kinnitab veelgi AHR-i funktsionaalset rolli täiskasvanu tüvirakkudes ning hematopoeesis. Hetkel on käimas II faasi kliinilised uuringud, kus testitakse AHR-i antagonistiga abil paljundatud HSC-de (rakuteraapia toode MGTA-456) siirdamise ohutust ja tulemuslikkust pärilike metaboolsete haigustega patsientidel (ClinicalTrials.gov).

Seni on inimese embrüonaalsete tüvirakkude ning AHR-i vaheliste seoste kohta võrdlemisi vähe teada. Hiljuti demonstreerisid Yamamoto jt. (2019) AHR-i endogeense ligandi künureeniini osalust hES rakkude iseuuenemise säilitamisel. Sama uuringu käigus selgus lisaks, et künureeniini lagundamine on vajalik hES rakkude diferentseerumiseks neuroektodermaalses suunas. Fu jt. (2019) andmetel inhibeerib TCDD läbi AHR-i aktivatsiooni hES rakkude diferentseerumist kardiomüotsüütideks – selleks repressioonitakse mitmete mesodermaalse suuna arenguks vajalike geenide ekspressiooni. Meie laboris on varasemalt näidatud, et hES rakuliinis H9 ekspresseeritakse AHR-i, kuid ei AHR-i agonisti (TCDD) ega ka antagonistiga

(alfa-naftoflavoon) toime ei avalda märkimisväärset mõju hES rakkude pluripotentsusele ega rakutsüklile (Hermann, 2013). Vastupidiselt mES rakkudes toimuvale on meie laboris näidatud, et hES rakkude varasel diferentseerumisel väheneb nii *AHR*-i mRNA kui ka valgu tase (Uudeküll, 2016). Lisaks leiti, et hES rakkude neuraalsel diferentseerumisel algselt *AHR*-i ekspressioon küll langeb, kuid hilisemates ajapunktides tõuseb märkimisväärselt. Endodermaalsel ning mesodermaalsel diferentseerumisel on näidatud *AHR*-i allaregulatsiooni ning saavutatud madala taseme säilimist (Pajusaar, 2018). Erinevused *AHR*-i ekspressiooni dünaamikas erinevatesse suundadesse diferentseerumisel viitavad *AHR*-i olulisusele hES rakkude diferentseerumisel.

## 2. Eksperimentaalosa

### 2.1. Töö eesmärgid

Käesoleva magistr töö eesmärgiks oli:

1. Uurida, kas tüvirakuliinides H1 ja H9 ning nende embrüonaalseteks kehadeks diferentseerumisel esineb erinevusi *AHR*-i, pluripotentsusmarkerite ning neuraalse, mesodermaalse ja endodermaalse suuna markergeenide ekspressioonis;
2. Uurida TCDD toimet *AHR*-i, pluripotentsusmarkerite ning neuraalse, mesodermaalse ja endodermaalse suuna markergeenide ekspressioonile inimese embrüonaalsetes tüvirakkudes, embrüonaalsetes kehaes ning inimese embrüonaalsete tüvirakkude suunatud diferentseerimisel;
3. Analüüsida *AHR*-i ülegenoomset seondumist sekveneeritud ChIP andmestiku põhjal TCDD-ga töödeldud hES rakkudes, neuraalsetes eellasrakkudes ja definitiivse endodermi rakkudes.

### 2.2. Materjal ja meetodika

#### 2.2.1. Rakkude kasvatamine koekultuuris

Eksperimentide läbiviimisel kasutati inimese embrüonaalsete tüvirakkude liine H9 (46, XX; WA09) ning H1 (46, XY; WA01) (WiCell Research Institute, National Stem Cell Bank). hES rakke kasvatati Matrigel™-iga (BD Biosciences) kaetud 6-kannulistel koekultuuri plaatidel defineeritud koostisega mTeSR™1 (STEMCELL Technologies) söötmes, mida vahetati iga päev. Tüvirakkudele sobiva kasvukeskkonna tagamiseks hoiti kultuuri veeauruga küllastatud inkubaatoris temperatuuril 37 °C ning 5% CO<sub>2</sub> juures. hES rakke passeeriti rutiinsel kasvatamisel iga 3-4 päeva järel, seejuures passaažiarv jäi vahemikku 30-55. Passeerimist viidi läbi manuaalselt. Selleks kraabiti hES rakkude kolooniatükid pipetiotsikuga kasvupinnalt lahti ning tõsteti seejärel uuele Matrigel™-iga kaetud koekultuuri plaadile. hES rakkude igapäevase kultiveerimisega tegeles TÜ rakubioloogia õppetooli laborant Annika Trei.

### 2.2.2. Embrüonaalsete kehade moodustamine ja hES rakkude suunatud diferentseerimine

Vahetult enne embrüonaalsete kehade genereerimist pesti hES rakke üks kord PBS-iga ning seejärel lisati rakkudele defineeritud koostisega TeSR™-E6 sööde (STEMCELL Technologies). Embrüonaalsete kehade saamiseks kraabiti hES rakkude kolooniaid manuaalselt pipetiotsikuga koekultuuri tassilt lahti ning seejärel tõsteti kolooniatükid uuele 6-kannulisele plaadile. Embrüonaalseid kehasid kasvatati kokku viis päeva ning söödet vahetati ülepäeviti. Iga päev lüüsiiti edasiseks analüüsiks üks kann embrüonaalseid kehasid. hES rakkude suunatud diferentseerimiseks passeeriti kindlas koguses rakke 6-kannulisele Matrigel™-iga kaetud koekultuuri plaadile ning diferentseerimise indutseerimiseks kasvatati rakke tootja protokollis toodud instruksioonide järgi vastavas STEMdiff™ induktsiooni söötmes – neuraalse, definitiivse endodermi või varajase mesodermi induktsiooni söötmes (STEMCELL Technologies).

Neuraalseks diferentseerimiseks pesti hES rakke kõigepelt 2 ml PBS-iga ning seejärel dissotsieeriti rakud koekultuuri plaadilt, inkubeerides neid 1 ml GCD reagentiga (*Gentle Cell Dissociation reagent*, STEMCELL Technologies) 8-10 minutit koekultuuri inkubaatoris 37 °C ja 5 % CO<sub>2</sub> juures. Järgnevalt suspendeeriti kolooniad üksikrakuliseks ning tõsteti KnockOut™ DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Thermo Fisher Scientific) söötmesse. Kannud pesti 1 ml KnockOut DMEM™ söötmega ning see lisati rakususpensioonile. Rakke tsentrifuugiti 5 minutit 300 rcf juures. Seejärel aspireeriti supernatant ning rakud resuspendeeriti STEMdiff™ neuraalse induktsiooni söötmes, millele oli eelnevalt rakkude elulemuse tõstmiseks lisatud 10 µM ROCK (*Rho-associated protein kinase*) inhibiitorit (Bio-Techne). Rakkude loendamiseks segati kokku 10 µl rakususpensiooni ning 10 µl trüpaansinist (Thermo Fisher Scientific) ning saadud segu pipeteeriti kahte lugemiskambrisse. Rakke loendati Countess II rakuloenduriga (Thermo Fisher Scientific) ning rakkude arvukuse leidmiseks arvutati kahe loenduse keskmine tulemus. Seejärel pipeteeriti sobiv kogus rakke (Tabel 1) Matrigel™-iga kaetud koekultuuri plaadile, millesse oli tõstetud neuraalse induktsiooni söödet lõppmahus 2 ml. Rakke diferentseeriti vastavalt tootja protokollile neuraalses suunas seitse päeva ning edasisteks analüüsiks lüüsiiti iga päev üks kann rakke.

**Tabel 1. Rakkude passeerimise skeem neuraalseks diferentseerimiseks.** M – miljon, k – tuhat, p – päev.

Päev	p1	p2	p3	p4	p5	p6	p7
Rakkude arv	2M	2M	1M	1M	750k	500k	500k

Mesodermaalseks ning endodermaalseks diferentseerimiseks järgiti passeerimisel eespool kirjeldatud protokoll, kuid pärast rakkude tsentrifugimist resuspendeeriti need mTeSR™1 söötmes, millele oli eelnevalt lisatud 10 µM ROCK inhibiitorit. Teostati rakkude loendus ning seejärel pipeteeriti sobiv kogus rakke (Tabel 2 ja 3) Matrigel™-iga kaetud 6-kannulisele koekultuuri plaadile lõppmahus 2 ml. Järgmisel päeval vahetati sööde vastavalt kas STEMdiff™ varajase mesodermi induksiooni või STEMdiff™ definitiivse endodermi induksiooni söötme vastu. Rakke diferentseeriti vastavalt tootja protokollile mesodermaalses ja endodermaalses suunas viis päeva ning iga päev lüüsi ükssada kann rakke.

**Tabel 2. Rakkude passeerimise skeem mesodermaalseks diferentseerimiseks.** M – miljon, k – tuhat, p – päev.

Päev	p1	p2	p3	p4	p5
<b>Rakkude arv</b>	2M	1,5M	750k	300k	250k

**Tabel 3. Rakkude passeerimise skeem endodermaalseks diferentseerimiseks.** M – miljon, p – päev.

Päev	p1	p2	p3	p4	p5
<b>Rakkude arv</b>	2M	2M	2M	2M	2M

### 2.2.3. RNA eraldamine

RNA eraldamiseks kraabiti rakud koekultuuri tassi pinnalt PBS-is kokku ning tõsteti 1,5 ml tuubi. Rakke tsentrifugiti 300 rcf juures 5 minutit, eemaldati supernatant ning resuspendeeriti FARB lüüsilahuses (Favorgen). RNA eraldamisega jätkati kas kohe või säilitati lüsaate edasiseks kasutamiseks -80 °C juures. Rakkude lüüsimiseks ning RNA eraldamiseks kasutati FavorPrep Blood/Cultured Cell Total RNA Purification komplekti (Favorgen) ning RNA eraldus viidi läbi vastavalt tootja protokollile. Kolonnile kogutud RNA elueeriti 40 µl nukleasivabas vees. Spektrofotomeetri NanoDrop ND-100 (Thermo Fisher Scientific) abil mõõdeti RNA kontsentratsioon ning RNA puhtuse hindamiseks vaadeldi 260/280 nm ning 230/260 nm lainepikkuste suhteid. Vältimaks valepositiivsete tulemuste saamist qPCR-i käigus, puhastati proovid genoomsest DNA-st, viies tootja protokollile järgides läbi DNAas I (Thermo Fisher Scientific) töötluse, mille käigus kasutati 2720 Thermal Cycler termotsüklerit (Applied Biosystems).

#### 2.2.4. cDNA süntees

Pöördtranskriptsiooniks kasutati 200-1000 ng hES rakkudest või 20-1000 ng embrüonaalsetest kehadest eraldatud ning DNAasiga töödeldud RNA-d ning RevertAid First Strand cDNA Synthesis komplekti (Thermo Fisher Scientific). cDNA süntees viidi läbi lõppmahus 20 µl vastavalt tootja protokollile ning selleks kasutati 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems) termotsüklerit. Pöördtranskriptsiooniks kasutati Tabelis 4 kirjeldatud programmi.

**Tabel 4. Pöördtranskriptsiooni programm**

	<b>Temperatuur</b>	<b>Aeg</b>
Aktivatsioon	25 °C	10 min
cDNA süntees	42 °C	60 min
Inaktivatsioon	70 °C	10 in

#### 2.2.5. Kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon (qPCR)

Kvantitatiivse polümeraasi ahelreaktsiooni ehk qPCR-i teostamiseks kasutati LightCycler<sup>®</sup> 480 II (Roche) masinat ning reaktsioonid viidi läbi 384-kannu plaatidel (Bioplastics). Reaktsioonisegu lõppmahus 10 µl sisaldas 5 µl 2X Maxima<sup>®</sup> SYBR Green/ROX qPCR Master Mix-i (Thermo Fisher Scientific), 0,5 µl 10 µM *forward* praimerit, 0,5 µl 10 µM *reverse* praimerit ning 4 µl cDNA-d. Kontaminatsiooni kontrollina kasutati reaktsioonisegus cDNA asemel RNAasi-vaba vett. Eksperimentides kasutatud praimerid on varasemalt disainitud meie töörühma liikmete poolt ning praimerite järjestused on leitavad käesoleva töö Lisas 1. qPCR-i reaktsioonide teostamiseks kasutati Tabelis 5 kirjeldatud programmi.

**Tabel 5. qPCR-i programm**

	<b>Temperatuur</b>	<b>Aeg</b>	<b>Tsüklid</b>
Algne denaturatsioon	95 °C	10 min	1
Denaturatsioon	95 °C	15 sek	40
Praimerite seondumine ja produkti paljundamine	60 °C	60 sek	
Lõplik ekstensioon	72 °C	5 min	1
Sulamiskõvera analüüs	45-95 °C	7 min	1

Katsed mõõdeti triplikaatidena ning tulemuste analüüsimisel arvestati triplikaatide keskmiseid väärtuseid. Reaktsioonide lävitsükli väärtused (*Ct – cycle threshold*) arvutati LightCycler 480 II tarkvara abil. Huvipakkuvate geenide *Ct* väärtused normaliseeriti koduhoidjageeni *TBP* (TATA-seonduv valk, *TATA-binding protein*) *Ct* väärtuste suhtes. Tuvastamaks reaktsiooni käigus võimalikke tekkinud lisaprojekte, kasutati sulamiskõvera analüüsi. Relatiivsed geeniekspressiooni tasemed arvutati Livaki meetodi abil (Livak ja Schmittgen, 2001).

### **2.2.6. Voolutsütomeetria**

hES rakke töödeldi enne voolutsütomeetria analüüsi teostamist kolme ööpäeva jooksul DMSO-s (dimetüülsulfoksiid) lahustatud 10 nM TCDD-ga (Cambridge Isotope Laboratories) ning rakkudel vahetati kemikaaliga söödet iga päev. Negatiivseks kontrolliks kasvatati hES rakke tavalises mTeSR™1 söötmes ning mTeSR™1 söötmes, millele oli lisatud TCDD-ga võrdväärses koguses ehk 0,0064% DMSO (Sigma-Aldrich). Eksperimenti alustades pesti kõigepealt hES rakke kaks korda 1 ml PBS-iga. Järgnevalt eemaldati PBS ning lisati 1 ml 0,5 mM EDTA, misjärel asetati rakud 10 minutiks koekultuuri inkubaatorisse 37 °C juurde. Kolooniad suspendeeriti üksikrakuliseks ning koguti kokku 15 ml tuubi, millesse oli lisatud lahus A (1% BSA, 2 mM EDTA, PBS). Rakke tsentrifugeeriti 5 min 300 rcf juures. Seejärel eemaldati supernatant ning resuspendeeriti 1-2 ml lahuses A. Järgnevalt teostati rakkude loendamise ning iga proovi kohta tõsteti voolutsütomeetriatuubi 300 000 rakku. Rakke tsentrifugeeriti taas 5 min 300 rcf juures, misjärel aspireeriti supernatant ning rakud resuspendeeriti fikseerimise eesmärgil 1,6 % paraformaldehüüdi (Sigma-Aldrich) lahuses. Rakke fikseeriti toatemperatuuril 10 minutit, misjärel lisati 1 ml PBS-i. Rakke tsentrifugeeriti 5 min 300 rcf juures ning supernatant eemaldati. Rakke pesti 2 ml permeabiliseerimispuhvriga (eBioscience), tsentrifugeeriti taas 5 min 300 rcf juures ning eemaldati supernatant. Järgmisena resuspendeeriti rakud 50 µl permeabiliseerimispuhvril, millesse olid lisatud primaarsed antikehad (kasutatud antikehade loetelu on esitatud Tabelis 6). Seejärel inkubeeriti rakke toatemperatuuril 45 minutit pimedas. Antikehaga inkubeerimisele järgnes kaks pesu 2 ml permeabiliseerimispuhvriga. Rakke resuspendeeriti lõpuks 200 µl permeabiliseerimispuhvril, millesse oli lisatud 1:2000 DNA-ga seonduv värv DAPI (Sigma-Aldrich). Proovid filtreeriti ning analüüsiti voolutsütomeetrial FACS Aria I (BD Biosciences), kasutades tarkvara BD FACS-DiVa™ (versioon 6.1.3, BD Biosciences). Iga proovi kohta salvestati 10 000 sündmust.

**Tabel 6. Töös kasutatud antikehad.** Tabelis on esitatud voolutsütomeetria kasutatud antikehad, vastavad isotüübikontrollid ja lahjendused. Isotüübikontrollide lõppkontsentratsioonid olid võrdsed vastava spetsiifilise antikeha lõppkontsentratsiooniga. Sulgudes on märgitud antikehade külge konjugeeritud fluorestseeruvad märgised.

Sihimärk	Lahjendus	Päritolu ja klonaalsus	Tootja
OCT4 (Alexa 647)	1:100	Hiire monoklonaalne IgG2b	BioLegend
NANOG (PE)	1:5	Hiire monoklonaalne IgG1	BD Biosciences
SOX2 (PerCP-Cy5.5)	1:20	Hiire monoklonaalne IgG1	BD Biosciences
Isotüübikontrollid			
Alexa 647 konjugaat	1:100	Hiire IgG2b	BioLegend
PE konjugaat	1:80	Hiire IgG1	BD Biosciences
PerCP-Cy5.5 konjugaat	1:5	Hiire IgG1	BD Biosciences

### 2.2.7. Kromatiini immunosadestamine (ChIP)

ChIP eksperimentideks kasutati algmaterjalina pluripotentsid hES rakke, seitse päeva varajases neuraalses suunas diferentseeritud rakke ning viis päeva definitiivses endodermaalses suunas diferentseeritud rakke (12 miljonit), mida töödeldi 90 minutit 100 nM TCDD-ga. Koekultuuri tassidel kasvavate rakkude fikseerimiseks lisati söötmesse 1% lõppkontsentratsioonis formaldehüüdi lahust, moodustamaks DNA ja valkude vahel ristsidemeid. Tasse loksutati õrnalt ning inkubeeriti 10 minutit toatemperatuuril. Seejärel lisati fikseerimisreaktsiooni peatamiseks rakkudele 133 mM lõppkontsentratsioonis glütsiini. Tasse loksutati taas õrnalt ning lasti seista 5 minutit toatemperatuuril. Järgnevalt asetati koekultuuri tassid jääle ning rakke pesti 2 korda 1 ml külma PBS-iga. Seejärel lisati rakkudele ühe kannu kohta 500 µl PBS-i, mis sisaldas 5% lõppkontsentratsioonis FBS-i (veise loote seerum, *fetal bovine serum*). Rakud kraabiti kokku, tõsteti 1,5 ml tuubi ning tseentrifuugiti 5 min 1000 rcf juures temperatuuril 4 °C.

Takistamiseks immunosadestamise etapis tsütoplasmas paiknevate valkude seondumist antikehaga, viidi läbi tuumade eraldamine. Rakkudelt eemaldati supernatant ning resuspendeeriti tuumade eraldamiseks 250 µl puhvril, mis oli järgneva koostisega: 50 mM Hepes (pH 7,9), 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5% NP-40, 0,25% Triton X-100, 10 mM KCl, Milli-Q vesi. Rakke inkubeeriti keerutil 4 °C juures 10 minutit. Proove tseentrifuugiti 5 min 1350 rcf juures temperatuuril 4 °C. Seejärel eemaldati supernatant ning materjali suspendeeriti 250

µl puhvris, mis oli järgneva koostisega: 10 mM Tris (pH 8,0), 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, Milli-Q vesi. Proove inkubeeriti keerutil toatemperatuuril 10 minutit. Proove tsentrifuugiti 5 min 1350 rcf juures, seejärel eemaldati supernatant ning tuumad suspendeeriti 100 µl 1% SDS lüüsi puhvris (1% SDS, 20 mM EDTA, 50 mM Tris, pH 8,0), millele oli lisatud 1X proteaasi inhibiitori kokteil (Roche). Tuumasid lüüsi jääl 10-15 minutit, aeg-ajalt proove vorteksil segades.

Immunosadestamise läbiviimiseks fragmenteeriti kromatiin Bioruptor® Plus (Diagenode SA) sonikaatoriga. Sonikeerimine viidi läbi 10 min jooksul 30-sekundiliste *on* ja *off* tsüklitena 4 °C juures. Pärast sonikeerimist lahjendati proove ChIP lahjenduspuhvris (0,01% SDS, 1,1% Triton X-100, 1,2 mM EDTA, 16,7 mM Tris (pH 8,0), 167 mM NaCl, Milli-Q vesi) ning lisati 1X proteaasi inhibiitori kokteil (Roche). Proove tsentrifuugiti 10 min 10 000 rcf juures temperatuuril 4 °C ning saadud supernatant tõsteti uude tuubi. Supernatandist tõsteti 5 µl *input* proovi jaoks eraldi tuubi ning sellele lisati 500 µl elueerimispuhvrit (1% SDS, 50 mM Tris (pH 8,0), 1 mM EDTA, Milli-Q vesi). *Input* proovi hoiustati edaspidiseks kasutamiseks -20 °C juures. Ülejäänud supernatant jagati võrdset kahte tuubi (AHR-i ning IgG antikeha jaoks). Seejärel lisati proovidele vastavalt 8 µg AHR-i vastast antikeha SA-210 (Enzo Life Sciences) või 8 µg küüliku IgG-d (Abcam). Proove inkubeeriti üleöö 4 °C juures.

Järgmisel päeval lisati antikehaga töödeldud proovidele 34 µl Protein G Dynabeads (Invitrogen) magnetkerakesi, mis olid eelnevalt vastavalt tootja protokollile ette valmistatud. Proove inkubeeriti magnetkerakestega kaks tundi 4 °C juures keerutil. Seejärel viidi läbi magnetkerakeste pesuetapid erinevate puhvritega: üks kord vähesoolase puhvriga (0,1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris (pH 8,0), 150 mM NaCl, Milli-Q vesi), üks kord soolase puhvriga (0,1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris (pH 8,0), 500 mM NaCl, Milli-Q vesi), üks kord LiCl puhvriga (0,25 M LiCl, 1% NP-40 1% naatriumdeoksükolaat, 1 mM EDTA, 10 mM Tris (pH 8,0), Milli-Q vesi) ning kaks korda TE puhvriga (10 mM Tris (pH 8,0), 1 mM EDTA, Milli-Q vesi). Iga loetletud pesu läbiviimiseks lisati 1 ml külma puhvrit, magnetkerakesed suspendeeriti ning proovid asetati 5 minutiks 4 °C juurde keerutile. Seejärel asetati proovid magnetlusele, eemaldati supernatant ning jätkati järgneva pesuetapiga.

Pesude järel suspendeeriti magnetkerakesed 250 µl elueerimispuhvris ning kromatiini-antikeha komplekside eemaldamiseks magnetkerade küljest inkubeeriti proove loksutil temperatuuril 65 °C. Proovid asetati magnetlusele ning supernatandid tõsteti uutesse tuubidesse. Magnetkerakestele lisati taas 250 µl elueerimispuhvrit ning korrati viimast etappi. Saadud

eluaadid liideti ning lisati 300 mM lõppkontsentratsioonis NaCl. Siin etapis võeti juurde ka varasemalt külmutatud *input* proovid, millele lisati samuti 300 mM lõppkontsentratsioonis NaCl. Järgnevalt inkubeeriti proove DNA ja antikeha vahel tekkinud ristsidemete lõhkumiseks 65 °C juures üleöö. Järgmisel päeval lisati proovidele valkude lagundamiseks proteinaas K (Thermo Fisher Scientific) lõppkontsentratsioonis 40 µg/ml ning inkubeeriti 50 °C juures 2 tundi. Seejärel lisati proovidele RNA-de lagundamiseks RNAas A (Thermo Fisher Scientific) lõppkontsentratsioonis 20 µg/ml ning inkubeeriti 30 min 37 °C juures.

Viimase etapina puhastati DNA fenool-kloroform meetodil. Proovidele lisati võrdses mahus fenool-kloroformi (1:1) ning tsentrifugeeriti 5 minutit 18 000 rcf juures (tsentrifugeerimised teostati toatemperatuuril). Vesifaas koguti uude tuubi ning fenool-kloroformi tuubi lisati 200 µl TE puhvrit (pH 8.0). Proove segati korralikult ning tsentrifugeeriti 5 minutit 18 000 rcf juures. Tekkinud vesifaas lisati varem kogutud vesifaasile. Saadud vesifaasi maht oli umbes 700 µl ning proovidele lisati samas mahus kloroformi. Proove segati korralikult ning tsentrifugeeriti 5 minutit 18 000 rcf juures. Vesifaas tõsteti uude tuubi ning lisati taas samas koguses kloroformi, proove segati, tsentrifugeeriti ning saadud vesifaas lisati varem kogutud vesifaasile. Seejärel lisati vesifaasile 300 mM lõppkontsentratsioonis naatriumatsetaati (pH 5,3), 0,1% glükogeeni ning 2 mahtu külma 100% etanooli. Seejärel asetati proovid üleöö -20 °C juurde.

Järgmisel päeval tsentrifugeeriti proove temperatuuril 4 °C 18 000 rcf juures tund aega. Supernatant eemaldati ning seejärel lisati tekkinud sademele 1 ml külma 70% etanooli. Proove tsentrifugeeriti temperatuuril 4 °C 18 000 rcf juures 7 minutit. Etanool eemaldati ettevaatlikult ning seejärel korrati pesu 70% etanooliga. Tsentrifugeerimise järel eemaldati pipetiga etanool ning kuivatati sadet 37 °C juures. Puhastatud DNA elueeriti 50 µl nukleasivabas vees ja saadud DNA-d säilitati -20 °C juures kuni edasise kasutamiseni.

### **2.2.8. Raamatukogude valmistamine**

ChIP-i proovidest valmistati raamatukogud, kasutades komplekti Ovation® Ultralow Library System Kit V2 (NuGen) ning järgides tootja protokollit. Raamatukogude tegemiseks kasutati 40-60 ng ChIP-i ja *input*-i proove. Raamatukogude sekveneerimise eelselt kontrolliti qPCR meetodil raamatukogu fragmentide külge ligeeritud adapterite olemasolu. Kromatiini immunosadestamine ja sellele järgnev sekveneerimine viidi läbi kahes korduses.

### 2.2.9. Sekveneerimine ja andmeanalüüs

Teise põlvkonna sekveneerimine viidi läbi Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramu tuumiklaboris NextSeq500 masinaga (Illumina), kasutades 75 bp järjestusi. Sekveneerimisel saadud toorandmeid demultipleksiti programmiga Local Run Manager Generate FASTQ Analysis Module (versioon 2.0.1). Proovi kohta saadi keskmiselt 20 miljonit järjestust. Tuumiklaborist saadud FASTQ failid ühendati UNIX-is *cat* käsuga ja saadud failid joondati GRCh37/hg19 referentsgenoomile, kasutades Bowtie2 programmi (versioon 2.2.3) (Langmead ja Salzberg, 2012), lubades *seed* järjestuses ühte *mismatchi* (-N1).

Kasutades Samtools (versioon 1.16) paketti (Li jt., 2009), konverteeriti joondamisest saadud SAM fail BAM failiks (käsk *samtools view*), seejärel saadud BAM fail sorteeriti (käsk *samtools sort*) ja indekseeriti (käsk *samtools index*). Saadud faile kasutati bigWig failide genereerimiseks, kasutades deepTools paketi (Ramírez jt., 2016) bamCoverage käsklust järgmiste parameetritega: `--normalizeTo1x --ignoreDuplicates --minMappingQuality 40 -bl hg19_blacklist.bed`. Kasutatud musta nimekirja kuuluvate genoomsete piirkondade fail, mis sisaldab halvasti joondatavaid regioone, on koostatud Stanfordini Ülikoolis EnCode projekti raames Anshul Kundaje poolt (Dunham jt., 2012).

Saadud bigWig failid visualiseeriti UCSC genoomilehitsejas, kasutades *custom track'e* (Kent jt., 2002). Arüülsüivesinike retseptori seondumiskohtade leidmiseks genoomis kasutati programmi MACS2 (versioon 2.1.0) (Zhang jt., 2008), võrreldes kahe bioloogilise korduse immunosadestatud proovi signaali kontrollproovide signaali suhtes ning kasutades vaikimisi parameetreid. Selle tulemusena saadi kätte seondumiskohtade genoomsed koordinaadid, mida filtreeriti suure tõenäosusega valepositiivseid signaale andvate nn musta nimekirja kuuluvate genoomsete piirkondade suhtes, kasutades BEDtools (versioon 2.26.0) *subtract* käsklust (Quinlan ja Hall, 2010). Sekveneerimisel saadud toorandmete andmetötluse teostas TÜMRI biotehnoloogia dotsent Tõnis Org.

Proovide vaheliste kattuvate seondumiskohtade leidmiseks ja visualiseerimiseks kasutati veebipõhist platvormi Cistrome (Liu jt., 2011). Uurimaks seondumiskohtade funktsionaalset seotust erinevate bioloogiliste protsessidega, viidi läbi geeniontoloogia analüüs, milleks kasutati GREAT andmebaasi (McLean jt., 2010). Motiiviotsing teostati veebipõhise programmiga Trawler (Dang jt., 2018).

### **2.2.10. Andmete statistiline analüüs**

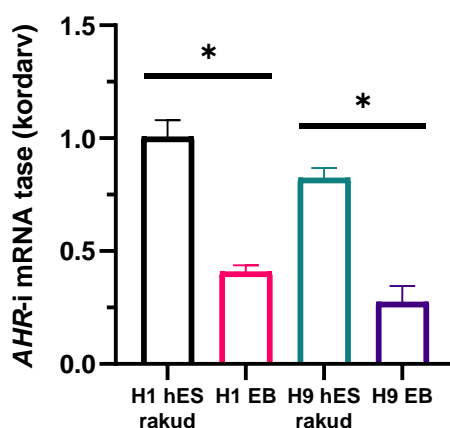
Käesolevas magistritöös sooritati eksperimendid kahes kuni kolmes korduses. Nii voolutsütomeetria kui ka qPCR analüüside puhul on tulpdiaagrammidel esitatud korduste keskväärtus $\pm$ SEM (keskväärtuste standardviga, *standard error of mean*). Statistilise olulisuse määramiseks kasutati MS Exceli kahepoolset sõltumatut Studenti t-testi ning statistilise olulise nivooks loeti  $p < 0,05$ . Tulemuste esitamiseks koostati tulpdiaagrammid programmis Graphpad Prism (versioon 8.4.2).

### 3. Tulemused ja arutelu

#### 3.1. H1 ja H9 hES rakkudest moodustatud embrüonaalsete kehade võrdlus

Varasemast on teada, et H9 hES rakkude diferentseerumisel embrüonaalseteks kehadeks väheneb *AHR*-i mRNA tase viiendaks päevaks umbes 45% ning *AHR*-i valgu tase ligi 70% (Uudeküll, 2016). Käesoleva töö esimeseks eesmärgiks oli kontrollida, kas selline ekspressiooni dünaamika esineb spetsiifiliselt vaid H9 rakuliinis või on tegemist hES rakuliinides laiemalt levinud nähtusega. Selleks võrreldi *AHR*-i ekspressiooni H1 ja H9 hES rakkudes ning embrüonaalsetes kehas (EB). Embrüonaalseid kehasid kasvatati suspensioonkultuuris viis päeva, misjärel need lüüsi ning kõigest saadud rakulüsaatidest eraldati RNA. Järgnevalt sünteesiti cDNA ning geeniekspressiooni uurimiseks teostati qPCR analüüs. Kõikides eksperimentides kasutati mRNA tasemete normaliseerimiseks *TBP* (TATA-seonduv valk) Ct väärtuseid.

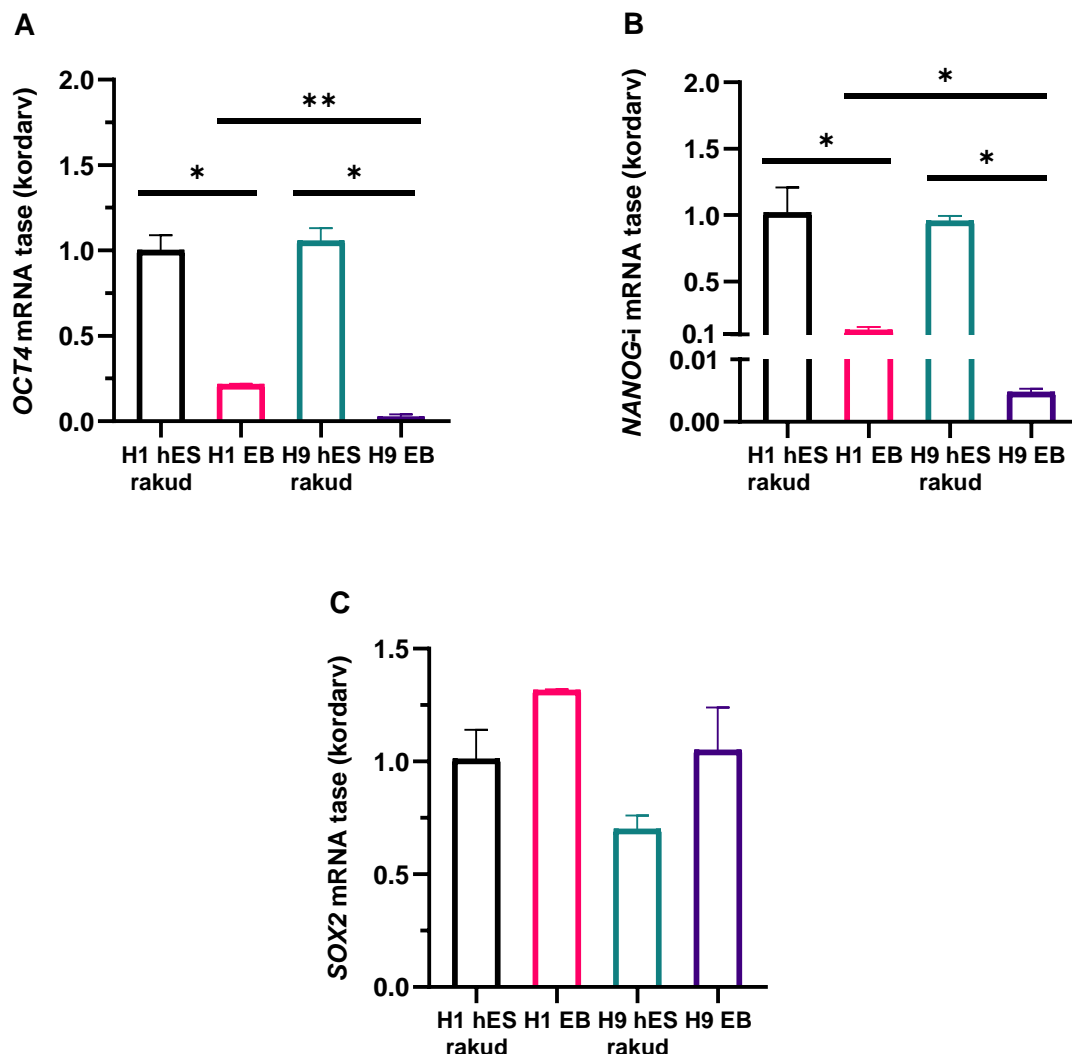
Katse tulemusena selgus, et H1 ja H9 hES rakkudes on *AHR* ekspresseeritud võrdvärsel tasemel ning diferentseerumisel embrüonaalseteks kehadeks *AHR*-i ekspressioon väheneb – H1 embrüonaalsetes kehas ligikaudu 60% ning H9 embrüonaalsetes kehas umbes 65% (Joonis 6). Saadud tulemus kinnitab, et *AHR*-i ekspressiooni vähenemine hES rakkude diferentseerumisel pole rakuliini spetsiifiline, vaid on lisaks omane H1 rakuliinile ning tõenäoliselt ka teistele hES rakuliinidele.



**Joonis 6.** *AHR*-i ekspressioon H1 ja H9 hES rakkude diferentseerumisel embrüonaalseteks kehadeks (EB). *AHR*-i mRNA tase mõõdeti qPCR meetodil ning normaliseeriti *TBP* suhtes. Tulemus põhineb kahel iseseisval korduskatsel (\* $p < 0,05$ ).

Lisaks kontrolliti embrüonaalsetes kehas pluripotentsusmarkerite *OCT4*, *SOX2* ja *NANOG*-i ekspressiooni, kinnitamaks pluripotentsuse kadumist hES rakkude diferentseerumisel. Ootuspäraselt langes nii H1 kui H9 embrüonaalsete kehade moodustumisel märkimisväärselt

*OCT4* ja *NANOG*-i ekspressioon (Joonis 7A,B). Seejuures täheldati H9 hES rakkude diferentseerumisel nimetatud pluripotentsusmarkerite ekspressiooni ulatuslikumat allaregulatsiooni. Diferentseerumise käigus vähenes *OCT4* mRNA tase H1 rakkudes ligi 5 korda, H9 rakkudes aga umbes 40 korda ning *NANOG*-i mRNA tase vähenes H1 rakkudes ligi 8 korda, H9 rakkudes aga umbes 200 korda. Mõlema rakuliini puhul võis embrüonaalsetes kehaes täheldada hES rakkudega võrreldes *SOX2* ekspressiooni tõusutrendi, kuid saadud tulemus ei olnud statistiliselt oluline ( $p > 0,05$ ) (Joonis 7C).

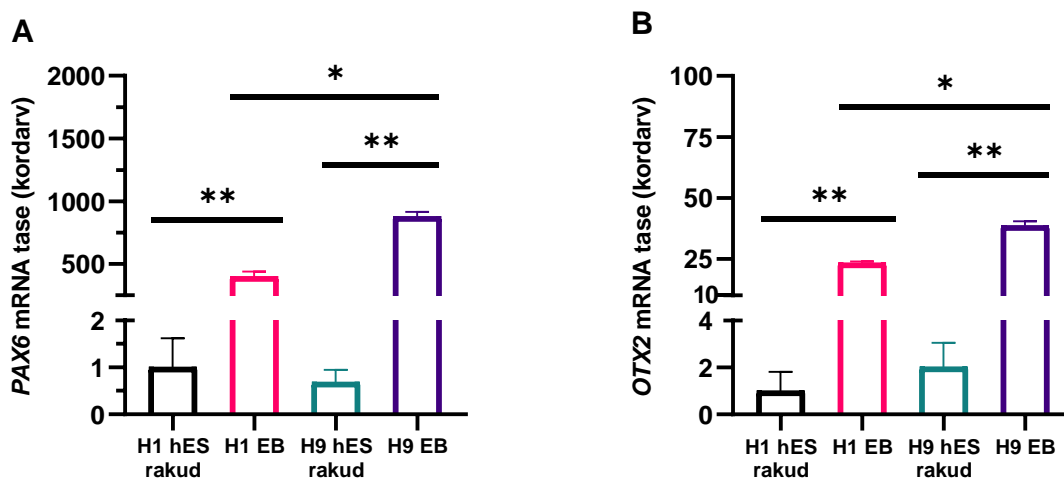


**Joonis 7. Pluripotentsusmarkerite *OCT4* (A), *SOX2* (B) ja *NANOG*-i (C) ekspressioon H1 ja H9 hES rakkude diferentseerumisel embrüonaalseteks kehaes (EB). mRNA tasemed mõõdeti qPCR meetodil ning normaliseeriti *TBP* suhtes. Tulemus põhineb kahel iseseisval korduskatsel (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ).**

Tabrizi jt. (2013) on näidanud, et neuroektodermaalsesse suunda diferentseerumisel säilitatakse *SOX2* kõrge tase ning leiab aset *OCT4* allaregulatsioon. Kuna käesolevas töös leiti, et nii H1 kui ka H9 hES rakkudest moodustunud embrüonaalsetes kehaes püsib *SOX2* ekspressioon

pluripotentsete hES rakkudega võrdväärsel kõrgel tasemel ning samaaegselt leiab aset *OCT4* allaregulatsioon, võib selle põhjal oletada, et nii H1 kui ka H9 embrüonaalsetes kehaes diferentseeruvad rakud eelkõige neuraalsesse suunda.

Kuigi on teada, et hES rakuliinid on iseuenemise, pluripotentsusmarkerite ekspressiooni ning diferentseerumisvõimekuse osas äärmiselt sarnased, on selge, et rakuliinide vahel esineb ka mitmeid erinevusi. Käesolevas töös nähtud H1 ja H9 rakuliinide vahelised erinevused *OCT4* ja *NANOG*-i mRNA allaregulatsioonis võivad potentsiaalselt tuleneda sellest, et nimetatud rakuliinid diferentseeruvad erineva kiirusega. Tsankov jt. (2015) uurisid erinevate hES rakuliinide diferentseerumispotentsiaali, vaadeldes embrüonaalsete kehade moodustumisel muutusi geeniekspressioonis. Uuringu käigus leiti, et H9 rakkudes represseriti embrüonaalsete kehade moodustumisel pluripotentsusmarkerite ekspressiooni tunduvalt kiiremini kui H1 rakkudes. Käesolevas töös saadud tulemused ühtivad Tsankov jt. (2015) poolt näidatuga ning viitavad sellele, et H9 rakud diferentseeruvad tõepoolest kiiremini kui H1 rakud. Selle hüpoteesi kontrollimiseks otsustati järgnevalt vaadelda embrüonaalsetes kehaes ka kolme lootelehe – ektodermi, mesodermi ja endodermi – markergeenide ekspressiooni, selgitamaks, kas need geenid võiks samas ajapunktis olla H9 embrüonaalsetes kehaes ekspresseeritud kõrgemal tasemel kui H1 embrüonaalsetes kehaes.

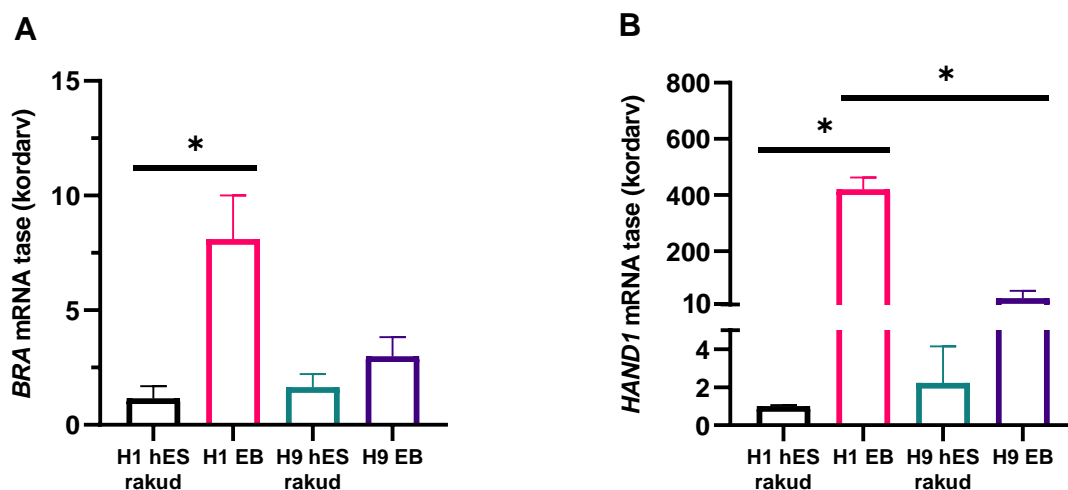


**Joonis 8.** Neuraalse suuna markergeenide *PAX6* (A) ja *OTX2* (B) ekspressioon H1 ja H9 hES rakkude diferentseerumisel embrüonaalseteks kehaes. mRNA tasemed mõõdeti qPCR meetodil ning normaliseeriti *TBP* suhtes. Tulemus põhineb kahel iseseisval korduskatsel (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ).

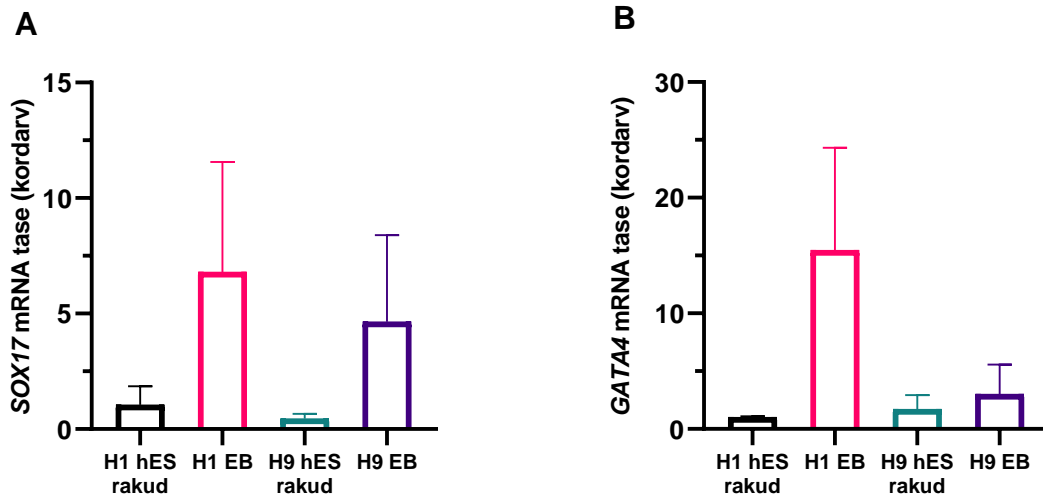
qPCR analüüsi tulemusena selgus, et neuraalse suuna markergeenide *PAX6* ja *OTX2* ekspressioon reguleeritakse embrüonaalsetes kehaes mõlema rakuliini puhul üles. Seejuures tõusis H9 embrüonaalsetes kehaes nende geenide ekspressioon märkimisväärselt kõrgemale

tasemele kui H1 embrüonaalsetes kehaes (Joonis 8). Võrreldes hES rakkudega tõusis diferentseerumise käigus *PAX6* ekspressioon H1 rakkudes 400 korda ning H9 rakkudes 880 korda, *OTX2* ekspressioon H1 rakkudes 23 korda ja H9 rakkudes 39 korda. Saadud tulemus on kooskõlas Tsankov jt. (2015) uuringuga, kus leiti, et H9 embrüonaalsetes kehaes aktiveeriti neuraalse suuna markergeenide ekspressioon kiiremini kui H1 embrüonaalsetes kehaes. Geenide *PAX6* ja *OTX2* ulatuslikum ülesregulatsioon H9 rakkude diferentseerumisel toetab hüpoteesi, et H9 rakud diferentseeruvad H1 rakkudest neuraalsesse suunda kiiremini.

Embrüonaalsete kehaes moodustumisel võis märgata ka mesodermaalse suuna markergeenide *BRA* ja *HAND1* mRNA taseme tõusu. H1 rakkude diferentseerumisel tõusis *BRA* ekspressioon ligi 7 korda (Joonis 9A) ning *HAND1* ekspressioon umbes 420 korda (Joonis 9B). H9 rakkude diferentseerumisel oli märgata tõusutrendi mõlema uuritava mesodermaalse markergeeni ekspressioonis, kuid saadud tulemused ei olnud statistiliselt olulised. See viitab asjaolule, et H1 rakud diferentseeruvad mesodermaalsesse suunda H9 rakkudest kiiremini. H1 ja H9 embrüonaalsetes kehaes ekspresseeriti ka endodermaalse suuna markereid *SOX17* ja *GATA4* (Joonis 10), kuid seda väga madalal tasemel. Lisaks ei olnud embrüonaalsetes kehaes detekteeritud *SOX17* ja *GATA4* mRNA tase statistiliselt olulisel määral erinev hES rakkudes ekspresseeritavast.



**Joonis 9. Mesodermaalse suuna markergeenide *BRA* (A) ja *HAND1* (B) ekspressioon H1 ja H9 hES rakkude diferentseerumisel embrüonaalseteks kehaes (EB). mRNA tasemed mõõdeti qPCR meetodil ning normaliseeriti *TBP* suhtes. Tulemus põhineb kahel iseseisval korduskatsel (\* $p < 0,05$ ).**



**Joonis 10. Endodermaalse suuna markergeenide *SOX17* (A) ja *GATA4* (B) ekspressioon H1 ja H9 hES rakkude diferentseerumisel embrüonaalseteks kehadeks (EB), mRNA tasemed mõõdeti qPCR meetodil ning normaliseeriti *TBP* suhtes. Tulemus põhineb kahel iseseisval korduskatsel.**

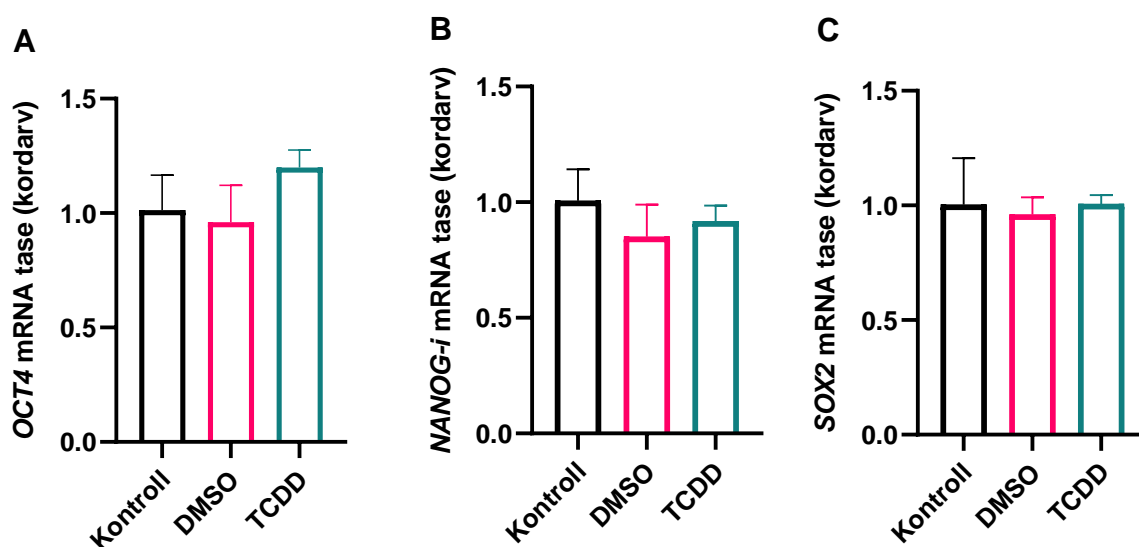
Geeniekspressiooni analüüsi tulemused näitavad, et H1 ja H9 rakkude diferentseerumisel embrüonaalseteks kehadeks reguleeritakse viie päeva jooksul tugevalt üles neuraalse suuna ning H1 rakuliinis mõningal määral ka mesodermaalse suuna markergeenide ekspressioon, kuid endodermi markergeenide ekspressioon jääb hES rakkudega võrreldavale tasemele. Selline lootelehtede markergeenide ekspressiooni dünaamika ühtib Tsankov jt. (2015) uuringus näidatuga, kus leiti, et nii H1 kui ka H9 embrüonaalsete kehade moodustumisel suurenes diferentseerumispotentsiaal järk-järgult. Seejuures kulges areng algselt kiiremini neuraalses suunas (neuroektodermi markergeenide tugev induktsioon tuvastati embrüonaalsetes kehaes 5. päeval), seejärel järk-järgult mesodermaalses suunas ning endodermaalsesse suunda diferentseerumine leidis aset teistest suundadest veelgi hiljem. Kokkuvõtvalt võib saadud tulemustest järeldada, et H9 rakud diferentseeruvad H1 rakkudest kiiremini neuraalsesse suunda ning kuigi neuraalne arengusuund on mõlemas rakuliinis algselt eelistatud, diferentseeruvad H1 rakud H9 rakkudest kiiremini mesodermaalsesse suunda. Endodermaalsesse suunda diferentseerumine leiab embrüonaalsetes kehaes aset hilisemates ajapunktides, mida käesolevas töös ei vaadeldud.

### **3.2. TCDD toime H9 hES rakkude pluripotentsusmarkerite ja arüülsüivesinike retseptori ekspressioonile**

Meie laboris on varasemalt läbi viidud eksperiment, kus H9 hES rakkudes aktiveeriti AHR-i nii lühiajaliselt (24 tundi) kui ka pikaajaliselt (7 päeva) TCDD-ga ning seejärel uuriti volutsütomeetriaal AHR-i liigse aktiveerimise mõju pluripotentsusmarkerite ekspressioonile

(Hermann, 2013). Katse tulemusena leiti, et nii lühiajalisel kui pikaajalisel töötusel TCDD-ga ei esinenud hES rakkudes pluripotentsusmarkerite OCT4 ja NANOG valgu tasemetes olulisi muutuseid. Eelnimetatud eksperimenti on läbi viidud vaid ühes korduses, sealjuures ei analüüsitud SOX2 taset. Seega otsustati käesolevas magistritöös hinnata kolmes bioloogilises korduses TCDD mõju OCT4, SOX2 ja NANOG-i valgu ja mRNA tasemetele, aga ka *AHR*-i enda ekspressioonile.

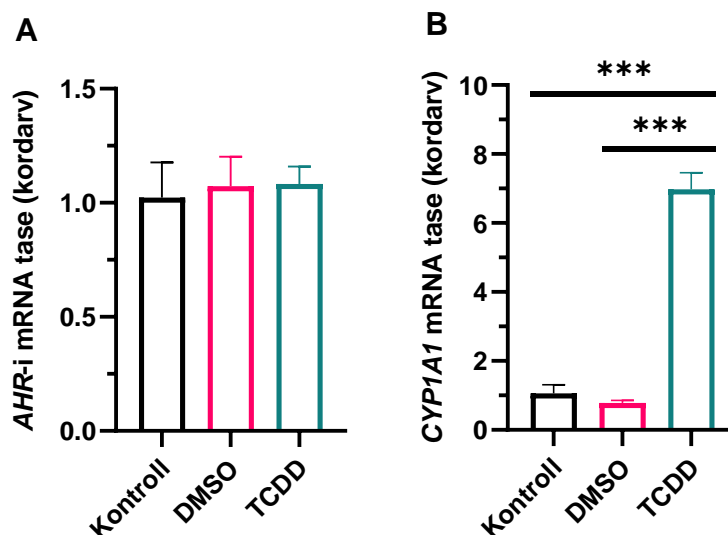
hES rakke töödeldi kolme ööpäeva jooksul 10 nM TCDD-ga ning kontrollina kasutati TCDD lahustit DMSO-d, mida lisati rakkude kasvusöötmesse TCDD-ga võrdses koguses (0,0064%). Pluripotentsusmarkerite mRNA tasemete uurimiseks viidi läbi qPCR analüüs. Kolme korduskatse tulemusena leiti, et TCDD töötuse tagajärjel ei muutunud H9 hES rakkudes *OCT4* ega *NANOG*-i ekspressioon (Joonis 11A,B), mis on kooskõlas varasemalt näidatuga (Hermann, 2013). Uue infona selgus, et lisaks ei muutunud TCDD töötuse tagajärjel H9 hES rakkudes ka *SOX2* ekspressioon (Joonis 11C). Käesolevas töös vaadeldi ka TCDD toimet diferentseerumise markergeenide ekspressioonile (Lisa 2), kuid statistiliselt olulisi muutuseid ei tuvastatud, mis viitab sellele, et TCDD ei soodusta hES rakkude diferentseerumist.



**Joonis 11. Pluripotentsusmarkerite *OCT4* (A), *NANOG*-i (B) ja *SOX2* (C) ekspressioon H9 hES rakkude töötusel 10 nM TCDD-ga.** hES rakke töödeldi kolme ööpäeva jooksul 10 nM TCDD, vastavas koguses DMSO-ga või ilma kemikaalideta. mRNA tasemed mõõdeti qPCR meetodil ning normaliseeriti *TBP* suhtes. Tulemus põhineb kolmel iseseisval korduskatsel.

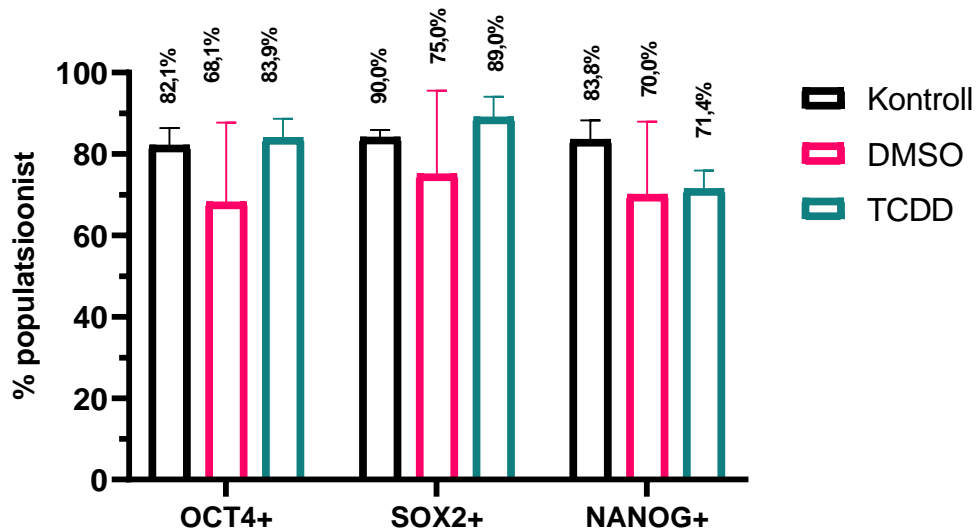
On teada, et TCDD töötus võib erinevates rakkudes kutsuda esile muutusi *AHR*-i ekspressioonis. Näiteks on demonstreeritud inimese sekretoorse faasi endomeetriumi rakkudes 24-tunnisel töötusel 10 nM TCDD-ga *AHR*-i mRNA taseme tõusu (Pitt jt., 2001). Sellest tulenevalt uuriti, kas *AHR*-i aktiveerimine TCDD-ga võiks ka H9 hES rakkudes kutsuda esile

muutusi *AHR*-i ekspressioonis. Samuti otsustati kontrollida 10 nM TCDD tõhusust *AHR*-i signaaliraja aktiveerimisel. Selleks vaadeldi muutusi *AHR*-i sihtmärkgeeni *CYP1A1* ekspressioonis. Katsesest selgus, et TCDD töötuse tagajärjel ei esine hES rakkudes *AHR*-i ekspressioonis muutusi, küll aga tõusis TCDD mõjul *CYP1A1* ekspressioon umbes seitse korda, mis kinnitab TCDD poolt indutseeritud *AHR*-i signaaliraja aktivatsiooni (Joonis 12).



**Joonis 12. *AHR*-i (A) ja tema sihtmärkgeeni *CYP1A1* (B) ekspressioon H9 hES rakkude töötusel 10 nM TCDD-ga.** hES rakke töödeldi kolme ööpäeva jooksul 10 nM TCDD, vastavas koguses DMSO-ga või ilma kemikaalideta. mRNA tasemed mõõdeti qPCR meetodil ning normaliseeriti *TBP* suhtes. Tulemus põhineb kolmel iseseisval korduskatsel (\*\*\*)  $p < 0,001$ .

Kuna muutused geeniekspressioonis ei ole alati otseses vastavuses muutustega valgu tasemetes, otsustati voolutsütomeetria abil uurida TCDD toimet H9 hES rakkude pluripotentsusele. Eksperimendi tulemusena selgus, et TCDD töötuse tagajärjel ei esinenud pluripotentsusmarkereid ekspresseerivate rakkude osakaalus muutuseid (Joonis 13). Sarnaselt käesolevas töös saadud tulemustele demonstreerisid hiljuti ka Fu jt. (2019), et hES rakkude kolmepäevane töötus TCDD-ga ei mõjutanud pluripotentsusmarkerite *NANOG*, *OCT4* ega *SOX2* ekspressiooni ega ka rakkude morfoloogiat. Sarnaselt ei täheldatud käesolevas töös TCDD mõjul silmatorkavaid muutuseid hES rakkude morfoloogias (andmeid pole näidatud). Voolutsütomeetrial saadud tulemused on kooskõlas geeniekspressiooni andmetega ning viitavad sellele, et *AHR*-i signaaliraja aktiveerimine 10 nM TCDD-ga ei mõjuta hES rakkude pluripotentsust.



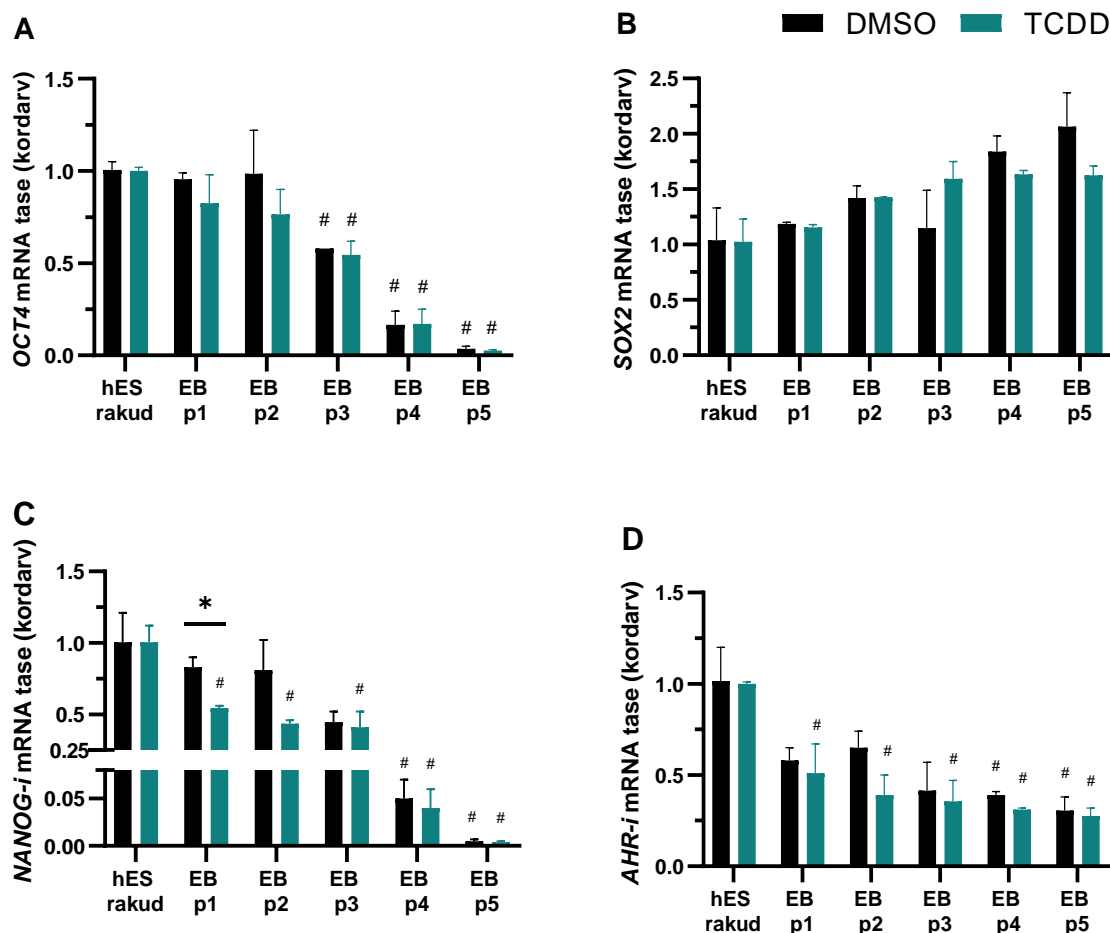
**Joonis 13. TCDD mõju H9 hES rakkude pluripotentsusmarkerite OCT4, SOX2 ja NANOG-i tasemele.** Joonisel on esitatud voolutsütomeetrial analüüsitud positiivsete rakkude hulk protsendina üldpopulatsioonist töötlemata rakkudes (kontroll), pärast kolm päeva kestvat töötlust 10 nM TCDD-ga või vastavas koguses DMSO-ga. Tulemus põhineb kolmel iseseisval korduskatsel.

### 3.3. TCDD toime H9 embrüonaalsete kehade diferentseerumisele

Teadmine, et kokkupuude TCDD-ga kutsub populatsioonis esile sünnidefektide sagenemist (Ngo jt., 2006), annab põhjust uurida, kas ja kuidas võiks TCDD embrüo arengu käigus avaldada mõju pluripotentsete rakkude varasele diferentseerumisele ning sellega kaasnevale pluripotentsuse vähenemisele. Kuna AHR-i signaaliraja liigne aktiveerimine ei avaldanud hES rakkude pluripotentsusele olulist efekti, on võimalik, et TCDD toime pluripotentsusmarkerite ekspressioonile avaldub alles diferentseerumise käigus. Seetõttu otsustati järgnevalt uurida TCDD toimet embrüonaalsetele kehadele, milles toimub spontaanne diferentseerumine. Varasemalt on näidatud, et kolmepäevane hES rakkude eeltötlus TCDD-ga põhjustab häireid edasisel diferentseerumisel (Fu jt., 2019). Sellest tulenevalt töödeldi hES rakke kolm päeva 10 nM TCDD-ga ning seejärel passeriti need embrüonaalsete kehade moodustumiseks suspensioonikultuuri. EB-sid kultiveeriti TCDD juuresolekul viis päeva, lüüesides osa neist igal päeval.

Kuna diferentseerumise alustamiseks on vajalik pluripotentsusmarkerite allaregulatsioon, otsustati kõigepealt vaadelda, missugust mõju avaldab TCDD embrüonaalsete kehade diferentseerumisel just nende geenide ekspressioonile. Eksperimendi tulemusena selgus, et TCDD ei mõjuta olulisel määral embrüonaalsetes kehades pluripotentsusmarkerite ekspressiooni dünaamikat. Nii DMSO kui TCDD-ga töödeldud embrüonaalsetes kehades nähti

viie päeva jooksul *OCT4* ja *NANOG*-i ekspressiooni võrdväärsed langust ning *SOX2* ekspressiooni püsima jäämist (Joonis 14A-C). Embrüonaalsete kehade moodustumise esimesel päeval võis küll märgata TCDD mõjul kontrolliga võrreldes *NANOG*-i mRNA taseme vähenemist umbes 35% võrra, kuid hilisemates ajapunktides antud efekt kadus (Joonis 14C). Kuigi TCDD ei avaldanud hilisemates diferentseerumise ajapunktides jätkuvat *NANOG*-i mRNA taset langetavat efekti, ei saa välistada, et see omab varases diferentseerumise etapis füsioloogilist tähtsust.

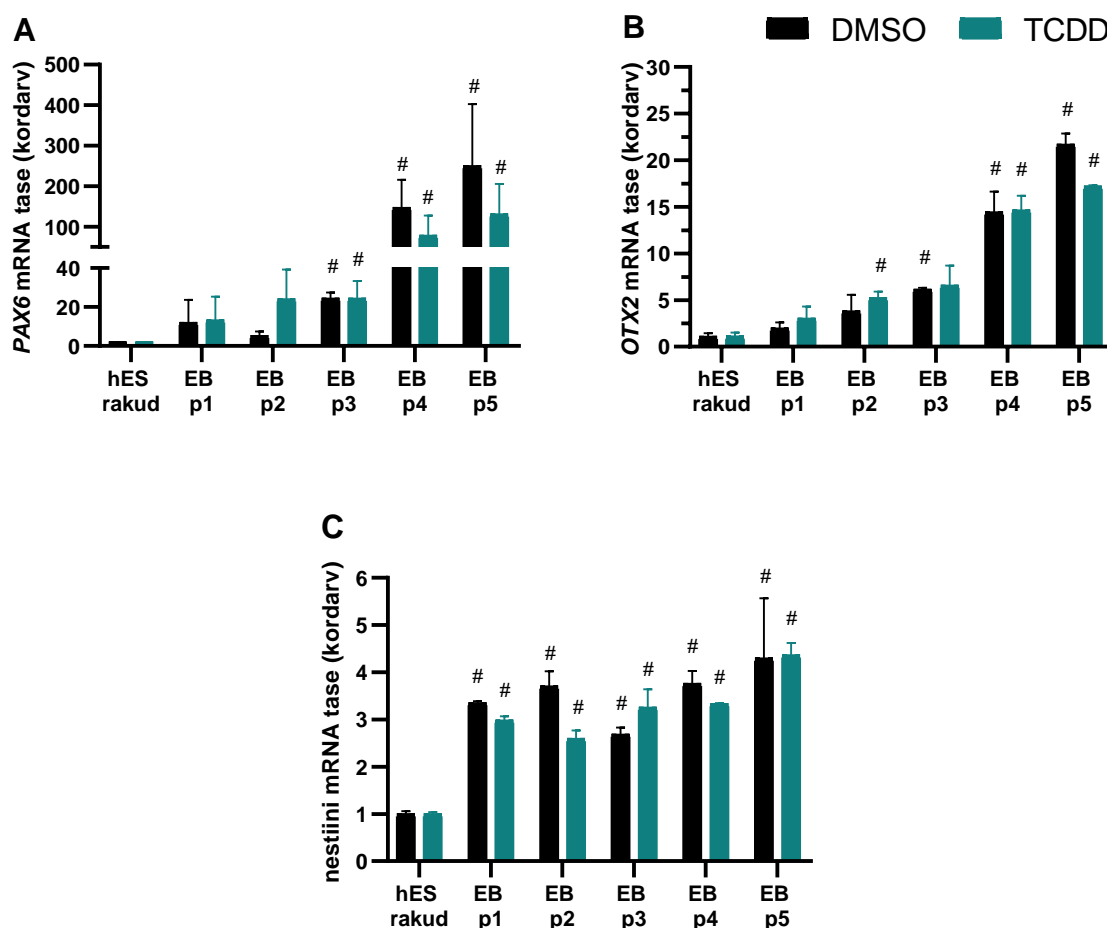


**Joonis 14. Pluripotentsusmarkerite *OCT4* (A), *SOX2* (B) ja *NANOG*-i (C) ning *AHR*-i (D) ekspressioon H9 embrüonaalsete kehade diferentseerumisel TCDD juuresolekul. hES rakke töödeldi kolme ööpäeva jooksul 10 nM TCDD või vastavas koguses DMSO-ga ning seejärel moodustati embrüonaalsed kehad, mida kasvatati koekultuuris viis päeva TCDD või DMSO juuresolekul. Joonisel on mRNA tasemed esitatud kordarvuna vastava töötlusega hES rakkude proovi suhtes. Tulemus põhineb kahel iseseisval korduskatsel (\* $p < 0,05$ , # $p < 0,05$  vs hES rakud).**

Eelnevalt läbi viidud eksperimendi tulemusena teame, et TCDD ei mõjuta hES rakkudes arüüsüivesinike retseptori ekspressiooni. Küll aga puuduvad seni andmed selle kohta, kas ja millist mõju avaldab TCDD *AHR*-i ekspressioonile embrüonaalsete kehade diferentseerumisel, seega otsustati järgnevalt leida vastus sellele küsimusele. Katse tulemustest selgus, et *AHR*-i

mRNA tase hakkab embrüonaalsetes kehaes langema juba alates esimesest päevast, kuid TCDD sellele mingit mõju ei avaldanud (Joonis 14D).

Kuna TCDD ei mõjuta rakkude diferentseerumist läbi muutuste pluripotentsusmarkerite ekspressioonis, otsustati edasi uurida TCDD mõju diferentseerumisele, vaadeldes lootelehtede markergeenide ekspressiooni. Selleks uuriti kõigepealt neuraalse suuna markergeenide *PAX6*, *OTX2* ja nestiini ekspressiooni dünaamikat. Eksperimendi tulemusena selgus, et TCDD ei põhjusta neuraalse suuna markergeenide ekspressioonis statistiliselt olulisi muutuseid, küll aga võis embrüonaalsetes kehaes märgata langustrendi diferentseerumise teisel päeval nestiini ekspressioonis ning viiendal diferentseerumise päeval *OTX2* ekspressioonis (Joonis 15). Saadud tulemustele toetudes paistab TCDD efekt varasele neuraalsele diferentseerumisele olevat minimaalne, kuid on võimalik, et TCDD mõju avaldub hoopis muude neuraalseks diferentseerumiseks vajalike geenide ekspressioonile, mida käesolevas töös ei vaadeldud.



**Joonis 15. Neuraalse suuna markergeenide *PAX6* (A), *OTX2* (B) ja nestiini (C) ekspressioon H9 embrüonaalsetes kehaes diferentseerumisel TCDD juuresolekul.** hES rakke töödeldi kolme ööpäeva jooksul 10 nM TCDD või vastavas koguses DMSO-ga ning seejärel moodustati embrüonaalsed kehaes, mida kasvatati koekultuuris viis päeva TCDD või DMSO juuresolekul. Joonisel on mRNA tasemed esitatud kordarvuna vastava töötlushaiga hES rakkude proovi suhtes. Tulemus põhineb kahel iseseisval korduskatsel (# $p < 0,05$  vs hES rakud).

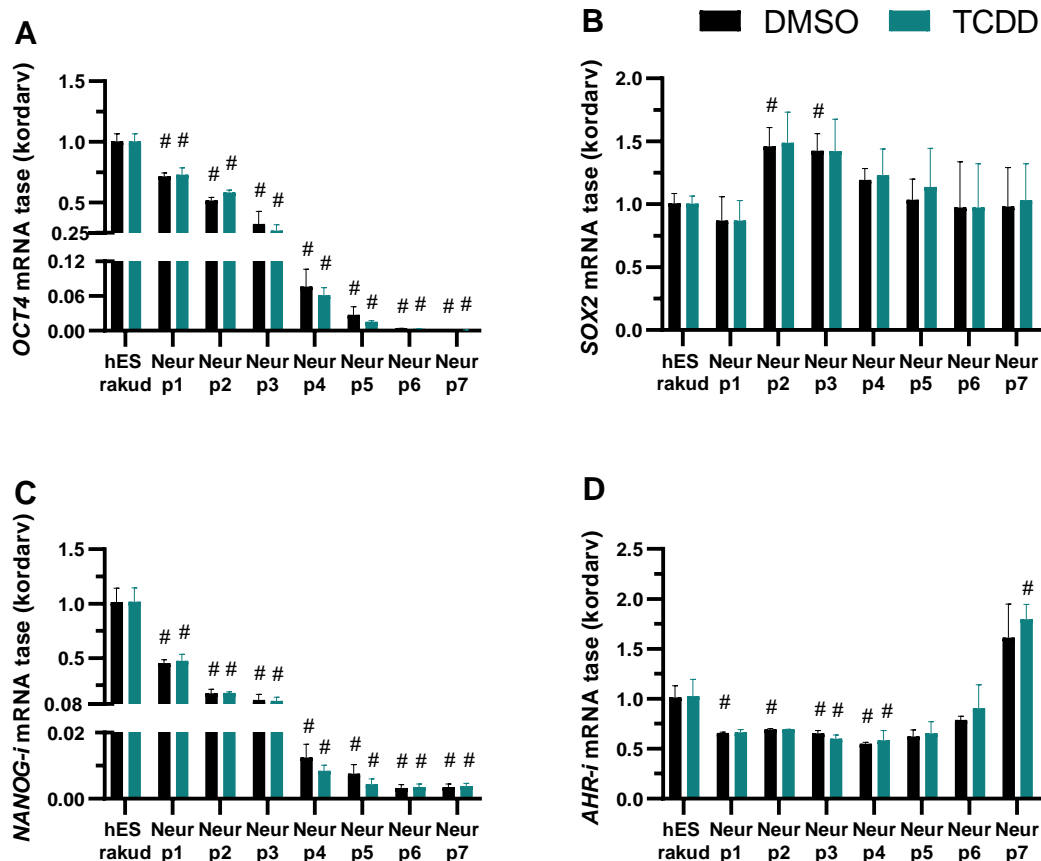
Lisaks neuraalse suuna markergeenidele vaadeldi embrüonaalsete kehade diferentseerumisel ka mesodermi ning endodermi markergeenide ekspressiooni (vt Lisa 3). Embrüonaalsete kehade diferentseerumise esimesel päeval võis märgata TCDD poolset statistiliselt olulist inhibeerivat mõju mesodermaalse markergeeni *HAND1* ekspressioonile (Lisa 3B), kuid edasisel diferentseerumisel efekt kadus. Kuna nii mesodermaalse kui endodermaalse suuna markergeene ekspresseeriti embrüonaalsetes kehas viie päeva jooksul väga madalal tasemel, on keeruline lõplikult järeldada, kas TCDD avaldas nende geenide ekspressioonile täiendavat inhibeerivat mõju. Samas ei ilmnenud saadud tulemustest, et TCDD-l oleks nimetatud markergeenide ekspressiooni suurendav ehk diferentseerumist soodustav efekt. Embrüonaalseid kehasid uurides jäi leidmata ühene vastus küsimusele, kuidas mõjutab TCDD hES rakkude diferentseerumist erinevatesse arengusuundadesse, kuid vastusele aitaks potentsiaalselt lähemale jõuda see, kui vaadelda hES rakkude diferentseerumist igas arengusuunas eraldiseisvalt.

### **3.4. TCDD toime H9 hES rakkude varajasele neuraalsele diferentseerumisele**

Embrüonaalsed kehad on heaks mudeliks varase embrüonaalse arengu uurimiseks, kuna neis leiavad aset embrüos *in vivo* toimuvaga analoogsed morfogeneetilised sündmused (Eiraku jt., 2011). Kuna embrüonaalsed kehad koosnevad heterogeensest rakupopulatsioonist, sisaldades kolme lootelehte diferentseerunud rakke, on embrüonaalseid kehasid uurides keeruline teha konkreetsete arengusuundade kohta eraldiseisvaid järeldusi. Uurimaks, missugust mõju avaldab TCDD töötlus hES rakkude diferentseerumisele neuraalses, mesodermaalses ning endodermaalses suunas, võeti kasutusele kommertsiaalsed diferentseerimissöötmed, millega on võimalik hES rakke diferentseerida vastavalt kas neuraalseteks eellasrakkudeks, varajase mesodermi või definitiivse endodermi rakkudeks.

Hiire mudelil on näidatud, et aktiveerides TCDD-ga varases embrüonaalses arengus Ahr-i signaalirada, avaldub püsiv mõju kesknärvisüsteemile, kutsudes amügdala hüperaktivatsiooni ja eesajukoore hüpoaktivatsiooni tõttu esile ebanormaalset sotsiaalset käitumist (Endo jt., 2012). Samuti on näidatud, et Ahr-i liigne aktiveerimine neuronites häirib hiire arenevas hipokampuses neuronaalset migratsiooni (Kimura jt., 2017). Seni on aga võrdlemisi vähe teada, kas ja kuidas mõjutab AHR-i liigne aktiveerimine inimese varast neuraalset arengut. Seetõttu otsustati järgnevalt uurida TCDD toimet hES rakkude diferentseerumisel neuraalseteks eellasrakkudeks.

Geeniekspressiooni analüüsi tulemusena märgati ootuspärast *OCT4* ja *NANOG*-i allaregulatsiooni ning neuraalseks arenguks vajaliku *SOX2* ekspressiooni püsima jäämist (Joonis 16), mis kinnitab hES rakkude diferentseerumist neuraalses suunas. Neuraalseteks ellasrakkudeks diferentseerumisel täheldati, et nii nagu ka embrüonaalsetes kehaes (Joonis 14), ei põhjustanud TCDD töötlus muutusi pluripotentsusmarkerite *OCT4*, *SOX2* ja *NANOG* ekspressiooni dünaamikas. Saadud tulemus kinnitab, et TCDD ei mõjuta neuraalses suunas diferentseerumist läbi pluripotentsusmarkerite regulatsiooni.

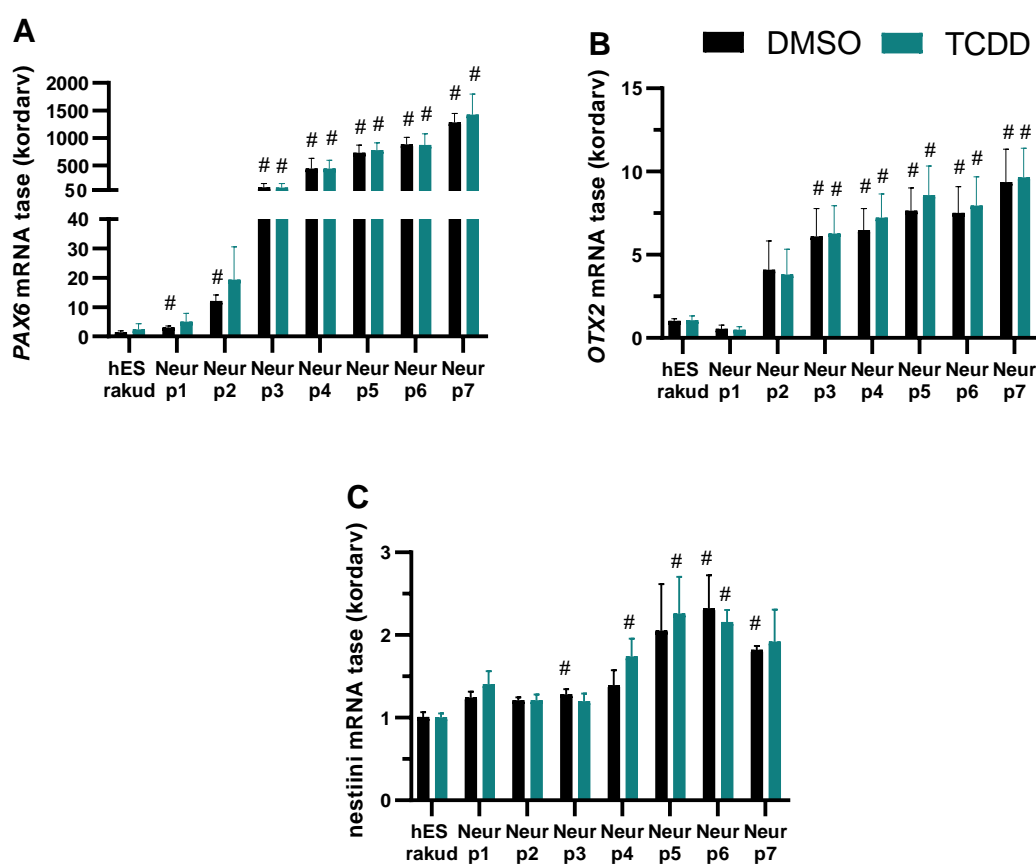


**Joonis 16.** Pluripotentsusmarkerite *OCT4* (A), *SOX2* (B) ja *NANOG*-i (C) ning *AHR*-i (D) ekspressioon H9 hES rakkude varajasel neuraalsel diferentseerumisel TCDD juuresolekul. hES rakke töödeldi kolme ööpäeva jooksul 10 nM TCDD või vastavas koguses DMSO-ga ning seejärel diferentseeriti neid DMSO või TCDD juuresolekul neuraalses (Neur) suunas seitse päeva. Joonisel on mRNA tasemed esitatud kordarvuna vastava töötlusega hES rakkude proovi suhtes. Tulemus põhineb kolmel iseseisval korduskatsel (# $p < 0,05$  vs hES rakud).

Järgnevalt vaadeldi ka TCDD mõju *AHR*-i ekspressioonile. Selgus, et TCDD toimel ei erinenud seitsmepäevase diferentseerumise käigus *AHR*-i ekspressioon kontrollrakkudes tuvastatust (Joonis 16D). Sarnaselt meie laboris eelnevalt näidatule (Pajusaar, 2018) vähenes *AHR*-i ekspressioon oluliselt juba diferentseerumise esimesel päeval, tõustes seitsmendaks päevaks hES rakkudes ekspresseeritavast tasemest kõrgemale. Diferentseerumise käigus täheldati

TCDD toimel AHR-i sihtmärkgeeni *CYP1A1* ülesregulatsiooni, mis kinnitas TCDD-poolset AHR-i aktivatsiooni (Lisa 4).

Järgnevalt uuriti TCDD mõju neuraalse suuna markergeenide ekspressioonile. Alates kolmandast diferentseerumise päevast võis märgata kõigi kolme suunamarkeri ekspressiooni tõusu, mis andis lisaks rakkude morfoloogia vaatlemisele kinnitust, et neuraalses suunas diferentseerumine oli aset leidnud. Katse tulemusena selgus, et sarnaselt embrüonaalsete kehade analüüsimisel saadud tulemustele (Joonis 15) ei põhjusta TCDD diferentseerumise käigus muutusi ei *PAX6*, *OTX2* ega ka nestiini ekspressioonis (Joonis 17).



**Joonis 17. Suunaspetsiifiliste markergeenide *PAX6* (A), *OTX2* (B) ja nestiini (C) ekspressioon H9 hES rakkude varajasel neuraalsel diferentseerumisel TCDD juuresolekul.** hES rakke töödeldi kolme ööpäeva jooksul 10 nM TCDD või vastavas koguses DMSO-ga ning seejärel diferentseeriti neid TCDD või DMSO juuresolekul neuraalses (Neur) suunas seitse päeva. Joonisel on mRNA tasemed esitatud kordarvuna vastava töötlusega hES rakkude proovi suhtes. Tulemus põhineb kolmel iseseisval korduskatsel ( $\#p < 0,05$  vs hES rakud).

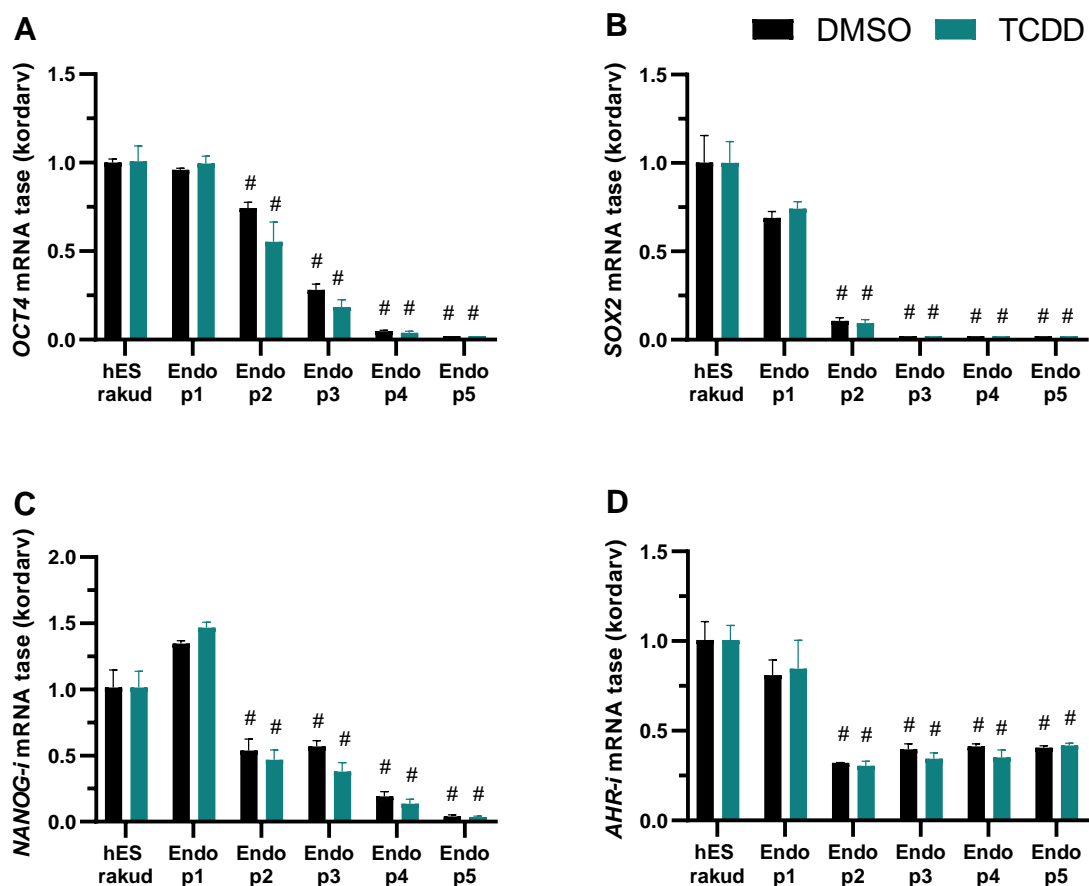
TCDD mõju hES rakkude neuraalsele diferentseerumisele on hiljuti uurinud ka Sarma jt. (2019). Antud uuringus töödeldi hES rakke või neist moodustatud üheksa päeva kasvatatud embrüonaalseid kehasid 24 h jooksul 10 nM TCDD-ga ning jätkati diferentseerimisega neuraalse induktsiooni söötmes, lisamata seejuures TCDD-d. Katse tulemusena nähti, et

embrüonaalsete kehade staadiumis läbi viidud TCDD töötlus suurendas diferentseerumise 25. päevaks neuraalsete rosettide (neuraalsete eellasrakkude kogumikud) arvukust. Samas ei mõjutanud hES rakkude töötlemine TCDD-ga edasisel neuraalsel diferentseerumisel neuraalsete rosettide arvukust. Sarma jt. (2019) uurisid ka 28. diferentseerumise päeval spetsiifiliste suunamarkerite ekspressiooni. Nende analüüs näitas, et TCDD-ga töödeldud embrüonaalsete kehade neuraalses suunas diferentseerimisel tõusis nestiini, *MAP2* (mikrotuubul-assotsieeruv valk 2) ja *TH* (türoksiini hüdroksülaas) ekspressioon. Samas ei täheldatud sellist efekti, kui hES rakke töödeldi TCDD-ga. Nendest tulemustest lähtudes on ilmne, et TCDD avaldab toimet kindlas ajalises aknas ning nagu ka käesolevas töös demonstreeriti, ei paista TCDD oluliselt mõjutavat hES rakkude neuraalsesse suunda diferentseerumise võimekust. Kirjanduse andmetele toetudes on siiski selge, et kokkupuude TCDD-ga mõjutab neuraalset arengut hilisemates arenguetappides. On võimalik, et embrüonaalsete kehade töötlus TCDD-ga avaldab neuraalsele arengule märkimisväärsemat mõju, kuna embrüonaalsetes kehaes sisalduvad neuraalsed tüvirakud on TCDD poolt aktiveeritud AHR-i signaliseerimise suhtes tundlikumad kui hES rakud.

### **3.5. TCDD toime H9 hES rakkude varajasele endodermaalsele diferentseerumisele**

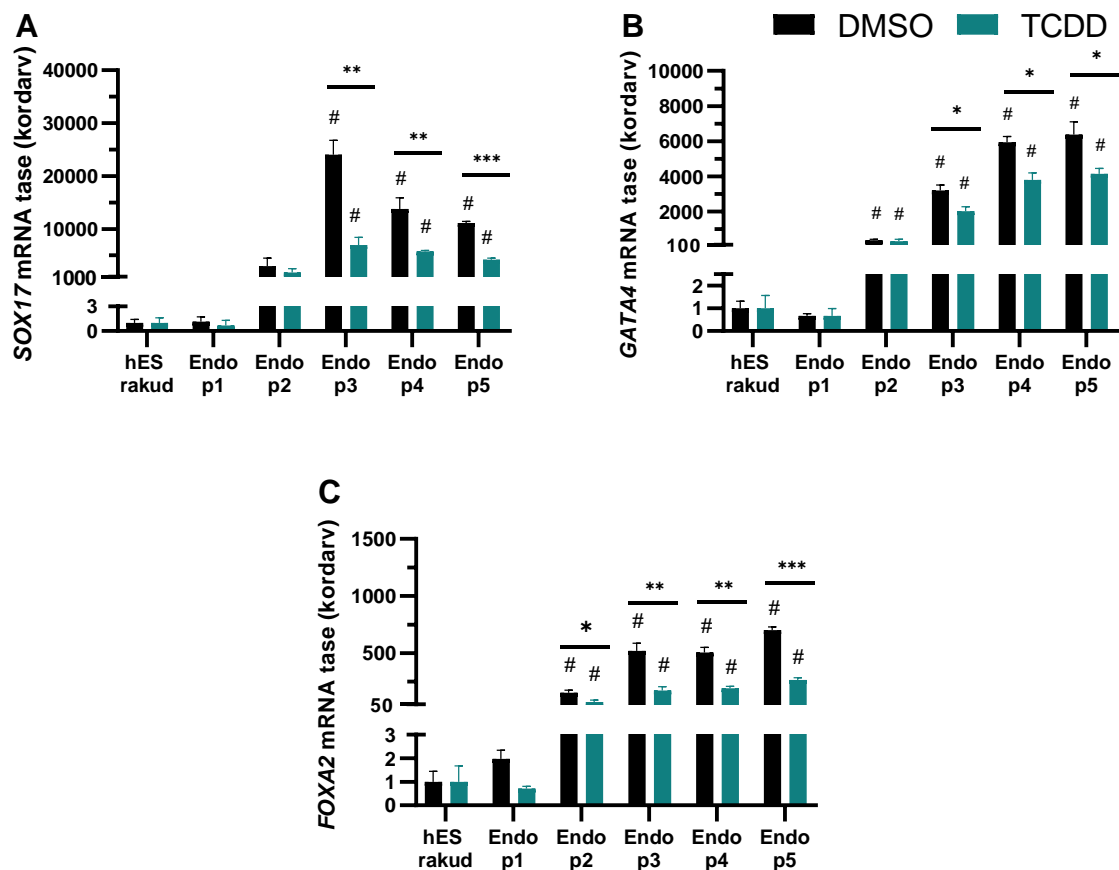
Hiljuti demonstreerisid Kubi jt. (2019), et TCDD töötlus vähendab hES rakkude pankrease eellasrakkudeks diferentseerumise tõhusust, viidates sellele, et varase arengu käigus võib kokkupuude TCDD-ga potentsiaalselt kahjustada pankrease normaalset funktsiooni ja arengut. Läbiviidud uuring annab põhjust lähemalt selgitada, kas ja kuidas võib TCDD mõjutada varajast endodermaalset diferentseerumist.

Endodermaalsel diferentseerumisel nähti ootuspärast pluripotentsusmarkerite *OCT4*, *SOX2* ja *NANOG* allaregulatsiooni, seejuures ei täheldatud TCDD mõju geeniekspressioonile üheski ajapunktis (Joonis 18A-C), mis viitab taaskord sellele, et TCDD ei mõjuta diferentseerumist läbi pluripotentsusmarkerite ekspressiooni regulatsiooni. *AHR*-i ekspressiooni dünaamika oli kooskõlas varasemalt meie laboris demonstreeritud tulemustega (Pajusaar, 2018), vähenedes oluliselt juba teiseks päevaks ning püsidis antud tasemel viienda päevani (Joonis 18D). Nii nagu ka neuraalsel diferentseerumisel (Joonis 16D), ei avaldanud TCDD endodermaalsel diferentseerimisel *AHR*-i ekspressioonile olulist mõju.



**Joonis 18.** Pluripotentsusmarkerite *OCT4* (A), *SOX2* (B) ja *NANOG-i* (C) ning *AHR-i* (D) ekspressioon H9 hES rakkude varajasel endodermaalsel diferentseerumisel TCDD juuresolekul. hES rakke töödeldi kolme ööpäeva jooksul 10 nM TCDD või vastavas koguses DMSO-ga ning seejärel diferentseeriti neid TCDD või DMSO juuresolekul endodermaalses (Endo) suunas viis päeva. Joonisel on mRNA tasemed esitatud kordarvuna vastava töötlusega hES rakkude proovi suhtes. Tulemus põhineb kolmel iseseisval korduskatsel ( $\#p < 0,05$  vs hES rakud).

Diferentseerumise käigus tuvastati endodermaalse suuna markergeenide *SOX17*, *GATA4* ja *FOXA2* ekspressiooni ulatuslik tõus hiljemalt kolmandaks päevaks (Joonis 19). Huvitaval kombel selgus, et TCDD toimel väheneb kõigi vaadeldud endodermaalsete markergeenide ekspressioon. *SOX17* mRNA taseme langus sai alguse diferentseerumise kolmandal päeval, vähenedes umbes 3,5 korda ning püsis saavutatud tasemel viienda päevani. *GATA4* mRNA taseme langus sai alguse samuti kolmandal diferentseerumise päeval, saavutamata katse lõpuks kontrollrakkudega võrreldavat taset. *FOXA2* mRNA taseme langus algas diferentseerumise teisel päeval ning püsis saavutatud tasemel viienda päevani.

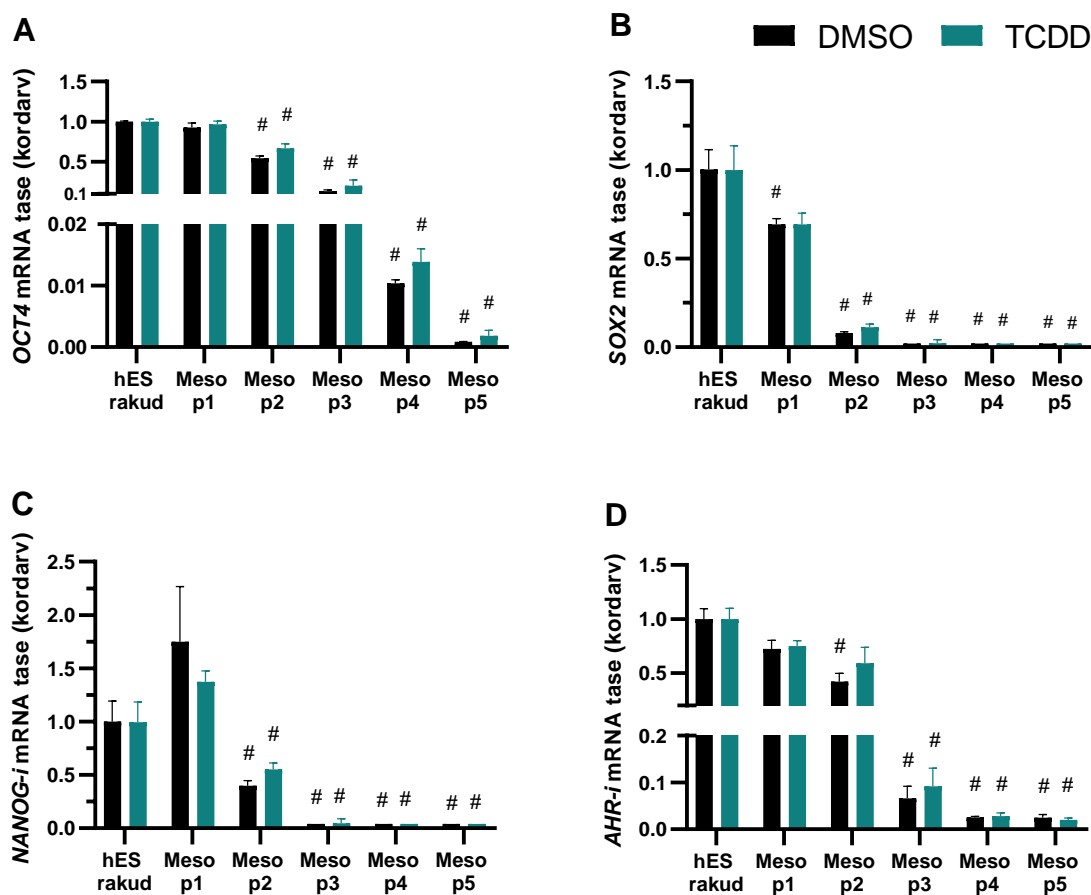


**Joonis 19. Suunaspetsiifiliste markergeenide *SOX17* (A), *GATA4* (B) ja *FOXA2* (C) ekspressioon H9 hES rakkude varajasel endodermaalsel diferentseerumisel TCDD juuresolekul.** hES rakke töödeldi kolme ööpäeva jooksul 10 nM TCDD või vastavas koguses DMSO-ga ning seejärel diferentseeriti neid TCDD või DMSO juuresolekul endodermaalses (Endo) suunas viis päeva. Joonisel on mRNA tasemed esitatud kordarvuna vastava töötlusega hES rakkude proovi suhtes. Tulemus põhineb kolmel iseseisval korduskatsel (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , # $p < 0,05$  vs hES rakud).

Saadud tulemused on kooskõlas Kubi jt., 2019 poolt publitseeritud tulemustega, kus kasvatati hES rakke TCDD juuresolekul kaks nädalat ning diferentseeriti seejärel definitiivsesse endodermi. Sarnaselt käesolevas töös näidatule demonstreerisid artikli autorid TCDD toimel kolmandal diferentseerumise päeval *SOX17* taseme langust. *FOXA2* ekspressioonis märgati TCDD toimel langustrendi, kuid saadud tulemus ei olnud autorite sõnul statistiliselt oluline. Küll aga tuvastasid artikli autorid mES rakkude diferentseerimisel definitiivsesse endodermi TCDD toimel *Foxa2* mRNA taseme langust. Rakkude diferentseerumisel ei täheldatud käesolevas töös TCDD toimel erilisi morfoloogilisi muutuseid kontrollrakkudega võrreldes (andmeid pole näidatud). Sellegipoolest näitasid sooritatud eksperimendid, et TCDD avaldab endodermaalseks diferentseerumiseks vajalike geenide ekspressioonile repressiivset toimet, mõjutades tõenäoliselt seeläbi edasise arengu käigus endodermaalset päritolu organite väljakujunemist.

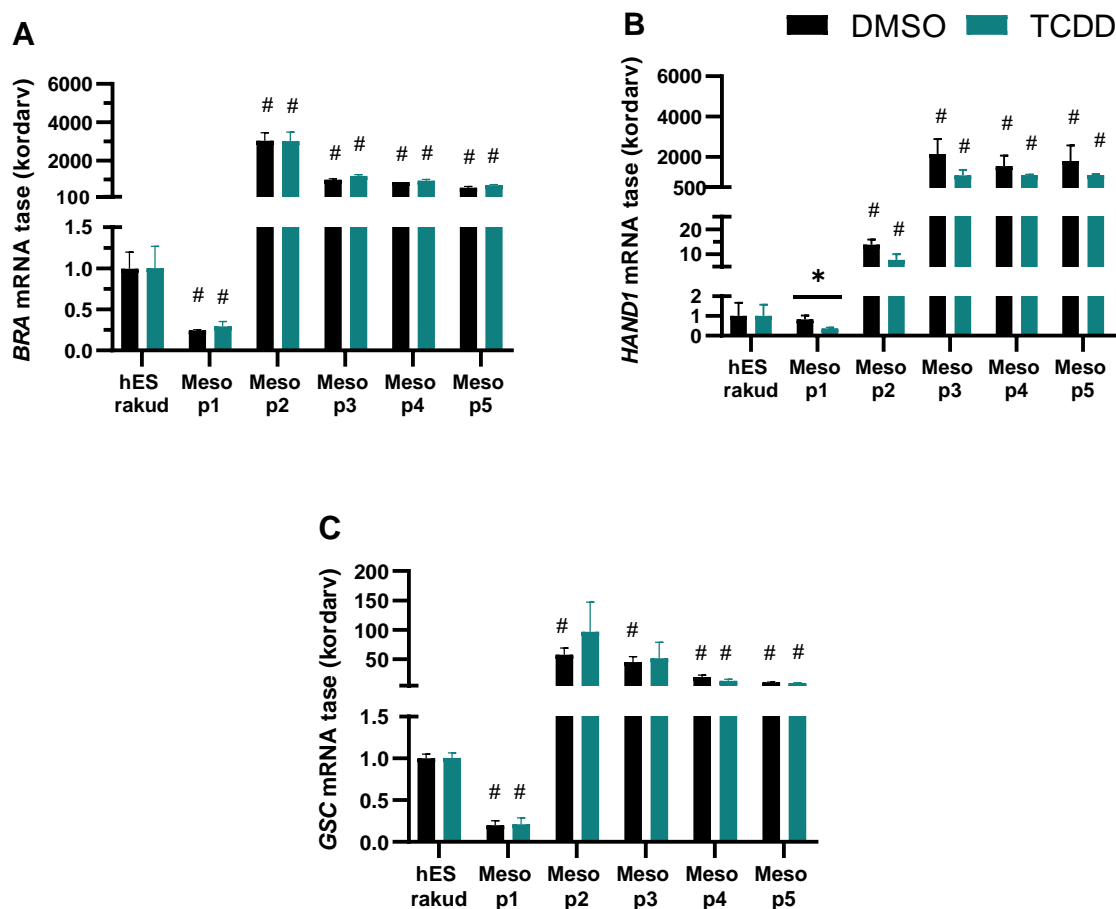
### 3.6. TCDD toime H9 hES rakkude varajasele mesodermaalsele diferentseerumisele

Epidemioloogiliste uuringute tulemusena on näidatud, et tavapärasest kõrgemas kontsentratsioonis TCDD-ga kokku puutunud populatsioonis suureneb vastündinute seas kaasasündinud südamedefektide esinemissagedus (Revich jt., 2001). Lisaks on hiire mudelil näidatud, et TCDD manustamine tiinele emasloomale kutsub arenevas lootes esile kardiovaskulaarseid häireid, mis soodustavad arengu jätkudes täiskasvanueas südamehaiguste välja kujunemist (Carreira jt., 2015). On võimalik, et TCDD-poolne südame ebanormaalset arengut esile kutsuv toime saab alguse juba väga varases arengus, näiteks varases mesodermis. Sellest tulenevalt otsustati uurida TCDD mõju hES rakkude diferentseerumisel varajase mesodermaalse suuna rakkudeks. Selleks kasvatati hES rakke esmalt kommertsiaalses mesodermaalset diferentseerumist indutseerivas söötmes.



**Joonis 20.** Pluripotentsusmarkerite *OCT4* (A), *SOX2* (B) ja *NANOG*-i (C) ning *AHR*-i (D) ekspressioon H9 hES rakkude varajasel mesodermaalsel diferentseerumisel TCDD juuresolekul. hES rakke töödeldi kolme ööpäeva jooksul 10 nM TCDD või vastavas koguses DMSO-ga ning seejärel diferentseeriti neid TCDD või DMSO juuresolekul mesodermaalses (Meso) suunas viis päeva. Joonisel on mRNA tasemed esitatud kordarvuna vastava töötlushaigusega hES rakkude proovi suhtes. Tulemus põhineb kolmel iseseisval korduskatsel (#p < 0,05 vs hES rakud).

Mesodermaalse diferentseerumise käigus langes ootuspäraselt pluripotentsusmarkerite *OCT4*, *SOX2* ja *NANOG* ekspressioon (Joonis 20A-C), kuid nii nagu ka teistes arengusuundades, ei kutsunud TCDD töötlus esile muutusi pluripotentsust reguleerivate geenide ekspressioonis. Sarnaselt varasemalt meie laboris näidatule (Pajusaar, 2018) vähenes *AHR*-i ekspressioon mesodermaalsel diferentseerumisel oluliselt juba teiseks päevaks ning alates neljandast päevast võis täheldada hES rakkudega võrreldes ekspressiooni 20-kordset langust (Joonis 20D). Nii nagu teisteski arengusuundades, ei esinenud TCDD toimet viiepäevasel diferentseerumisel *AHR*-i ekspressioonis kontrolliga võrreldes olulisi muutusi.



**Joonis 21. Suunaspetsiifiliste markergeenide *BRA* (A), *HAND1* (B) ja *GSC* (C) ekspressioon H9 hES rakkude varajasel mesodermaalsel diferentseerumisel TCDD juuresolekul.** hES rakke töödeldi kolme ööpäeva jooksul 10 nM TCDD või vastavas koguses DMSO-ga ning seejärel diferentseeriti neid TCDD või DMSO juuresolekul varajasel mesodermaalsel (Meso) suunas viis päeva. Joonisel on mRNA tasemed esitatud kordarvuna vastava töötlusega hES rakkude proovi suhtes. Tulemus põhineb kolmel iseseisval korduskatsel (\* $p < 0,05$ , # $p < 0,05$  vs hES rakud).

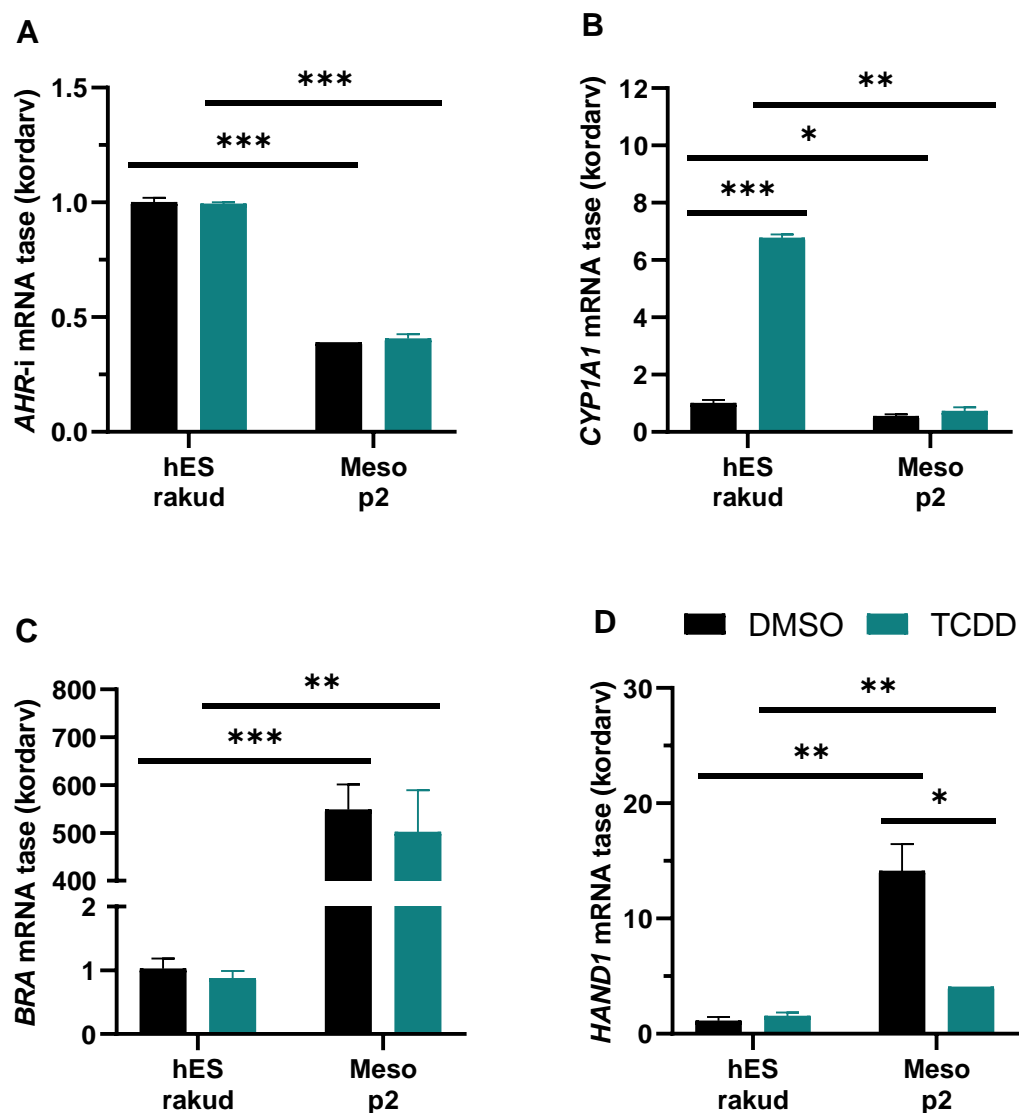
Uurimaks, kas ja kuidas mõjutab TCDD mesodermaalset diferentseerumist, vaadeldi mesodermi markergeenide *BRA*, *HAND1* ja *GSC* ekspressiooni. Geeniekspressiooni analüüs näitas, et mesodermaalse diferentseerumise esimesel päeval langeb TCDD toimet *HAND1* ekspressioon umbes kaks korda, kuid diferentseerumise jätkudes oli TCDD-ga töödeldud

rakkudes *HAND1* ekspressioon võrreldav kontrollrakkudes ekspresseeritud tasemetega (Joonis 21). TCDD toimel ei täheldatud mesodermi markergeenide *BRA* ega *GSC* ekspressioonis muutusi üheski ajapunktis. Saadud tulemus on vastuolus Fu jt. (2019) poolt avaldatud artikliga, kus demonstreeriti hES rakke mesodermaalses suunas diferentseerides TCDD toimel teisel päeval *BRA* ja *GSC* ekspressiooni olulist langust, viidates AHR-i signaaliraja aktiveerimise represserivale mõjule mesodermaalsel diferentseerumisel.

Kontrollimaks, kas meie laboris saadud tulemused erinevad Fu jt. (2019) poolt raporteeritust meetodiliste erinevuste tõttu, otsustati eksperimenti korrata, järgides nimetatud artikli autorite poolt kirjeldatud protokoll. hES rakke kasvatati kolm päeva 10 nM TCDD või vastavas koguses DMSO-ga. Seejärel diferentseeriti rakke TCDD juuresolekul kaks päeva mesodermaalses suunas, kasutades spetsiaalset diferentseerimissöödet [RPMI 1640 sööde (Corning), 1X B-27 supplement (Thermo Fisher Scientific), 5 µM CHIR-99021 (Sigma-Aldrich)].

Diferentseerumise toimumise kontrollimiseks vaadeldi pluripotentsusmarkerite ekspressiooni ning leiti, et teiseks diferentseerumise päevaks oli langenud nii *OCT4*, *SOX2* kui ka *NANOG*-i mRNA tase (andmeid pole näidatud). Sarnaselt eelnevalt kasutatud diferentseerimisskeemi tulemustele (Joonis 20D) langes mesodermaalse diferentseerumise teisel päeval *AHR*-i ekspressioon üle 50% (Joonis 22A). See kinnitab, et *AHR*-i allaregulatsioon mesodermaalsel diferentseerumisel ei tulene kommertsiaalsest söötimest, vaid tegemist on bioloogiliselt ühese efektiga. TCDD mõjul tuvastati hES rakkudes *CYP1A1* ülesregulatsioon, kuid diferentseerumise käigus langes *CYP1A1* ekspressioon olulisel määral (Joonis 22B), mille põhjuseks on tõenäoliselt samaaegselt aset leidev *AHR*-i allaregulatsioon.

Mesodermaalses suunas diferentseerumise toimumist kinnitas *BRA* ja *HAND1* ekspressiooni ülesregulatsioon (Joonis 22C,D), seejuures täheldati TCDD toimel teisel päeval *HAND1* ekspressiooni langust. Samas ei esinenud sarnaselt kommertsiaalse diferentseerimissöötme läbi viidud eksperimendile TCDD toimel muutusi *BRA* ekspressioonis (Joonis 22A). *GSC* mRNA tasemed olid aga allpool detekteerimispiiri (andmeid pole näidatud). Meie laboris saadud tulemused võivad erineda Fu jt. (2019) poolt demonstreeritust hES rakuliinide bioloogilise variatsiooni tõttu. Hiljuti on näidatud, et ka samad rakuliinid võivad erinevates laborites geeniekspressiooni osas varieeruda (Ben-David jt., 2018), mistõttu pole üllatav ka meie tulemuste erinevus võrreldes eelnevalt publitseerituga. Sellegipoolest tundub, et TCDD avaldab mesodermaalsele diferentseerumisele represserivat mõju, kuid täpsemad mehhanismid vajavad veel uurimist.

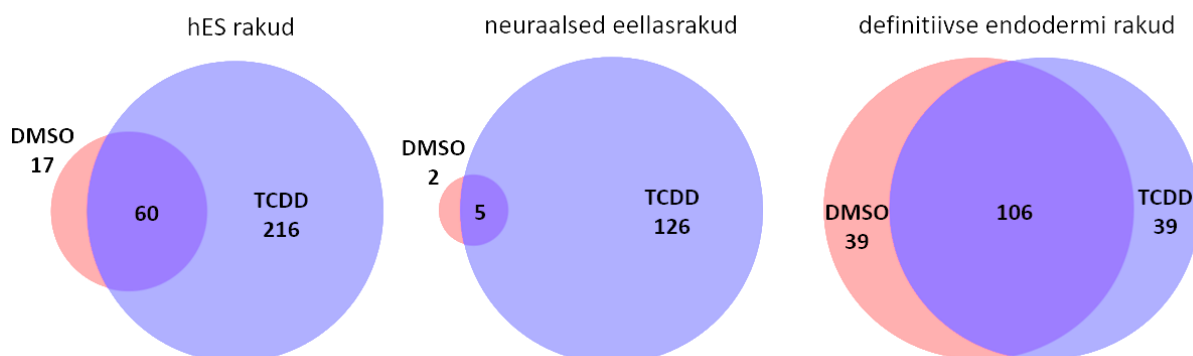


Joonis 22. *AHR-i* (A) ja tema sihtmärgeeni *CYP1A1* (B) ning suunaspetsiifiliste markergeenide *BRACHYURY* (C) ja *HAND1* (D) ekspressioon H9 hES rakkude varajasel mesodermaalsel diferentseerumisel TCDD juuresolekul, kasutades Fu jt. (2019) kirjeldatud diferentseerimissöödet. hES rakke töödeldi kolme ööpäeva jooksul 10 nM TCDD või vastavas koguses DMSO-ga ning seejärel diferentseeriti neid TCDD või DMSO juuresolekul mesodermaalses (Meso) suunas kaks päeva. Tulemus põhineb kolmel iseseisval korduskatsel (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , # $p < 0,05$  vs hES rakud).

### 3.7. Arüülsüivesinike retseptori seondumiskohtade identifitseerimine ChIP-seq meetodil

Uurimaks arüülsüivesinike retseptori ülegenoomset seondumist inimese embrüonaalsetes tüvirakkudes, teostati kromatiini immunosadestamise ja sellele järgnev sekveneerimise analüüs (ChIP-seq). Saamaks selgust, kas diferentseerumise käigus seondub AHR potentsiaalselt diferentseerumist reguleerivate geenide regulaatorsetele aladele, teostati sekveneerimine ka neuraalsete eellasrakkude ja definitiivse endodermi rakkude immunosadestatud kromatiiniga.

Kuna mesodermaalses suunas diferentseerumisel väheneb AHR-i ekspressioon nii mRNA kui ka valgu tasemel üle 90% (Pajusaar, 2018), otsustati selles suunas diferentseeritud rakkudes AHR-i seondumist mitte uurida.



**Joonis 23. AHR-i seondumiskohtade arv DMSO ja TCDD-ga töödeldud proovides.** hES rakke, seitse päeva varajases neuraalses ning viis päeva definitiivses endodermaalses suunas diferentseeritud rakke töödeldi 90 minutit 100 nM TCDD-ga või vastavas koguses DMSO-ga ning seejärel teostati CHIP-seq analüüs. Joonisel on kujutatud DMSO ja TCDD töötusel leitud AHR-i seondumiskohtade arv ja nende kattuvused.

AHR-i seondumiskohtade kattuvuse analüüs näitas, et hES rakkudes ja neuraalsetes eellasrakkudes suureneb TCDD toimetel AHR-i seondumine genoomsetele aladele (Joonis 23). Definiitivse endodermi rakkudes märgati aga AHR-i seondumist paljudele regioonidele ka TCDD juuresolekuta, viidates AHR-i endogeense signaaliraja suuremale aktiivsusele.

Motiiv			
Konsensusjärjestus	NCACGCG(A/T)GCN	CGGCACGC	CGCACGCAN
z-skoor	75,48	57,27	57,27

**Joonis 24. CHIP-seq proovide kõige sagedasemad seondumismotiivid.** Joonisel on toodud motiivianalüüsi tulemused, mis on saadud kõigi CHIP-seq andmete ühisosa põhjal. Z-skooriga näidati iga proovi statistilist olulisust. N tähistab mis tahes nukleotiidi.

Varasemalt on näidatud, et AHR seondub enamasti konsensusaidile 5'-GCGTG-3' (Swanson jt., 1995). Tuvastamaks, kas antud seondumismotiiv on ka käesolevas töös saadud andmestikus kõige sagedamini esindatud, teostati motiivotsing veebipõhise programmiga Trawler. Otsingu tulemus andis kõige sagedamini esinevaks motiiviks NCACGCG(A/T)GCN, kus N tähistab

mistahes nukleotiidi. Motiivi visuaalsel kujutisel (Joonis 24) on näha konsensussaidi 5'-GCGTG-3' esinemist. Lisaks prevaleeris kolmes kõige sagedamini esinevas motiivis järjestus 5'-CACGC-3', mis on 5'-GCGTG-3' pöördjärjestuseks. Kirjanduse andmetel on 5'-CACGC-3' samuti tuntud ksenobiootilise vastuselemendi (XRE) konsensussaidina, millelt indutseeritakse TCDD toimel transkriptsiooni madalama efektiivsusega kui konsensussaidilt 5'-GCGTG-3' (Li jt., 2014).

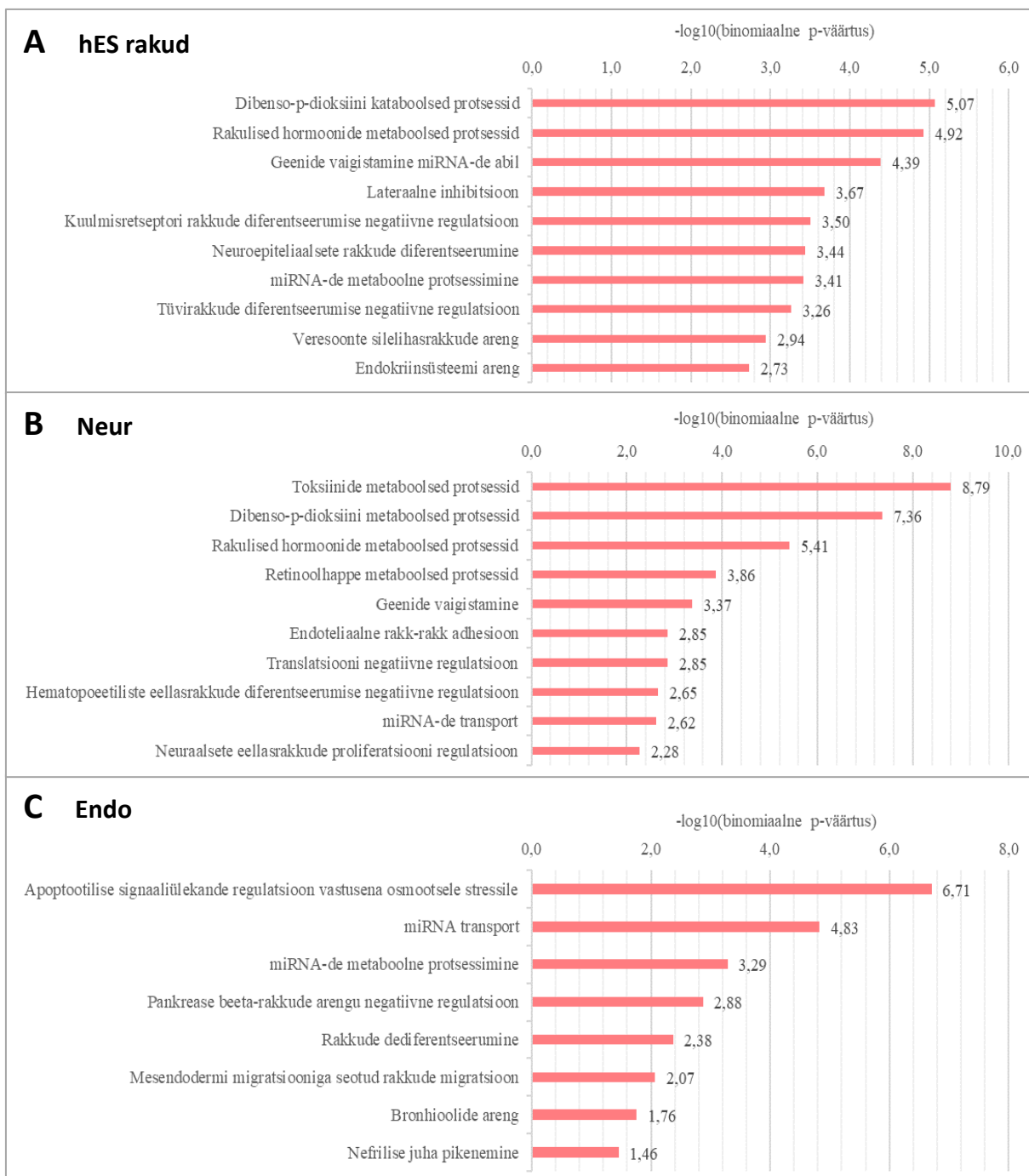
Mõistmaks täpsemalt AHR-i bioloogilist rolli hES rakkudes ja diferentseerunud rakkudes, viidi läbi geeniontoologia analüüs. hES rakkude puhul seostati AHR-i seondumist miRNA-de metaboolse protsessimisega ning miRNA-de poolt vahendatud geenivaigistamisega (Joonis 25A). Huvitaval kombel tuvastasime ChIP-seq andmeid analüüsidest AHR-i seondumise *miR-302B* geeni lähedusse (Joonis 26A). Kirjanduse andmetel on *miR-302* promootoralas tuvastatud kaks AHR-i seondumismotiivi ning leitud, et AHR-i aktiveerimine soodustab *miR-302* ekspressiooni (Hu jt., 2013b). Lisaks on näidatud, et *miR-302* soodustab OCT4 positiivset regulatsiooni, säilitades seeläbi rakkude pluripotentsust (Hu jt., 2013a). Sellest lähtuvalt ilmneb, et AHR võib kaudselt läbi *miR-302* ekspressiooni regulatsiooni säilitada hES rakkude pluripotentsust.

hES rakkudes tuvastati AHR-i seondumine ka *HAND1* geeni lähedusse (Joonis 26B). Saadud tulemuse olulisust iseloomustab asjaolu, et eelnevalt läbi viidud eksperimendis nähti mesodermaalsel diferentseerumisel TCDD toimel *HAND1* ekspressiooni langust (Joonis 21D). See viitab asjaolule, et AHR-i seondumine *HAND1* geeni reguleerivale alale võib olla repressiivse toimega. On võimalik, et mesodermaalse diferentseerumise käigus täheldatud *AHR*-i allaregulatsioon (Joonis 20D) on vajalik selleks, et vältida AHR-i repressiivset mõju mesodermaalsele diferentseerumisele.

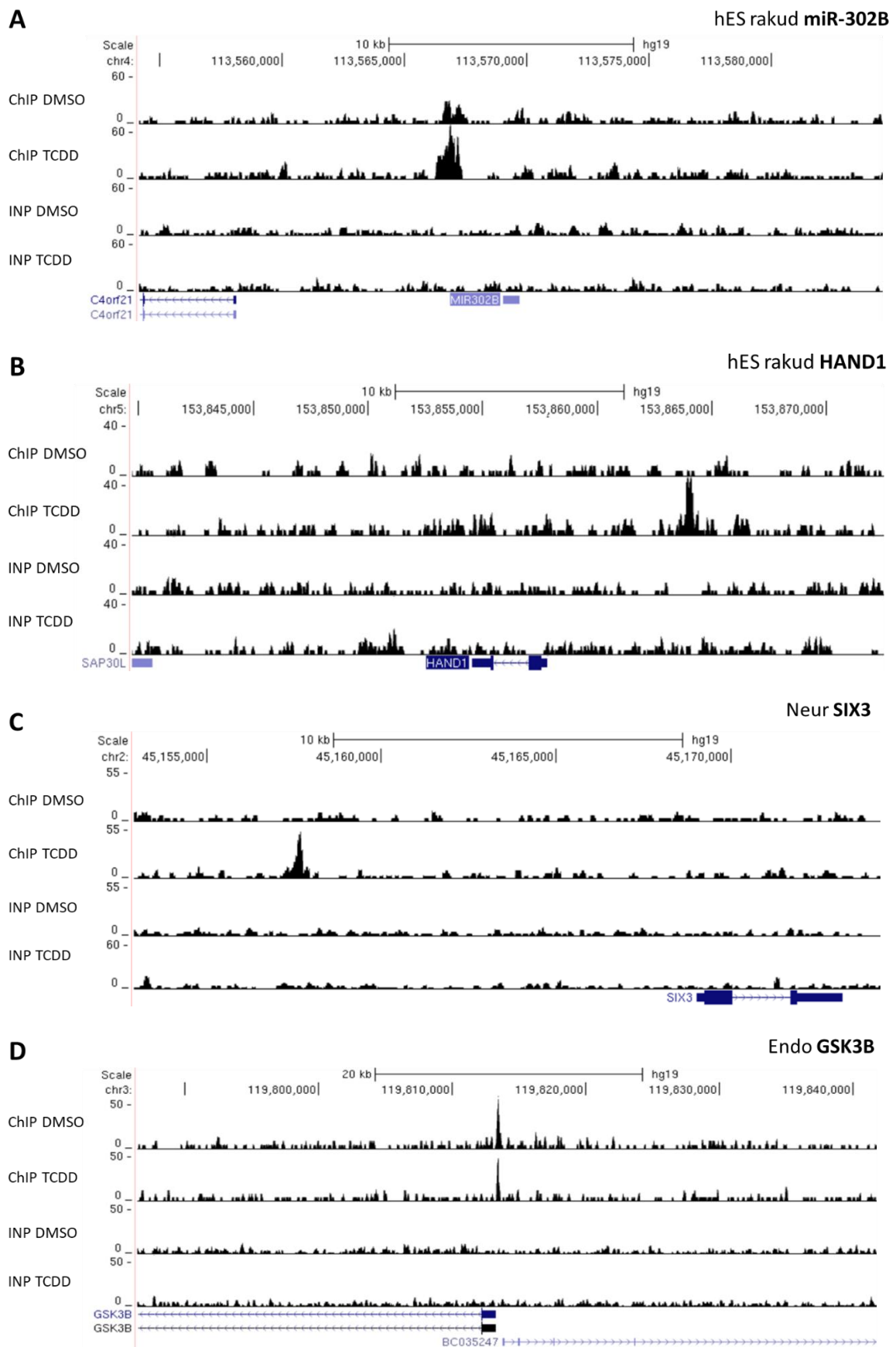
Neuraalsetes eellasrakkudes seostati AHR-i seondumist neuraalsete eellasrakkude proliferatsiooni regulatsiooniga (Joonis 25B), kuna tuvastati seondumised *CDH2*, *CDON*, *FOXG1*, *GLI2*, *LYN* ja *SIX3* (Joonis 26C) geenide läheduses. Käesoleva töö kirjutamise hetkel pole teadaolevalt varem AHR-i aktivatsiooni mõju loetletud geenide ekspressioonile vaadeldud, kuid mõistmaks AHR-i olulisust neuraalses arengus, oleks tulevikus kindlasti huvitav neid seoseid lähemalt uurida.

Definiitvise endodermi rakkudes seostati AHR-i seondumist pankrease beetarakkude arengu negatiivse regulatsiooniga (Joonis 25C), kuna tuvastati seondumine *GSK3B* geeni lähedusse (Joonis 26D). Seejuures tuvastati seondumine nii TCDD toimel kui ka AHR-i endogeensel aktivatsioonil. Kirjanduse andmetel hoiab *GSK3B* aktiivsus beetarakkude kasvu kontrolli all

ning GSK3B puudumisel suureneb prolifereerumise intensiivistumise tõttu beetarakkude arvukus (Liu jt., 2010). Varasemalt on inimese mitteväikerakulise kopsuvähi rakkudes näidatud, et AHR-i vaigistamine kutsub esile *GSK3B* ekspressiooni vähenemist, mis viitab sellele, et AHR võib olla vajalik *GSK3B* ekspressiooni säilitamiseks (Li jt., 2017). Küll puuduvad seni andmed, kuidas mõjutab *GSK3B* ekspressiooni AHR-i aktivatsioon, seega oleks nende seoste uurimine endodermaalse arengu seisukohast põnevaks uurimisobjektiks.



**Joonis 25. AHR-i seondumisalade funktsionaalne seotus erinevate bioloogiste protsessidega. hES rakkude (A), neuraalsete eellasrakkude (B) ja definitiivse endodermi rakkude (C) ChIP-seq andmestikule teostati geeniontoogia analüüs.**



**Joonis 26.** UCSC veebilehitsejas visualiseeriti AHR-i seondumiskohad hES rakkudes *miR-302B* geeni (A) ja *HAND1* geeni (B), neuralsetes eellasrakkudes *SIX3* geeni (C) ning definitiivse endodermi rakkudes *GSK3B* geeni (D) läheduses. INP – *input* proov.

## Kokkuvõte

Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli eeskätt uurida arüülsüivesinike retseptori (AHR) agonisti TCDD toimet inimese embrüonaalsete tüvirakkude pluripotentsusele ja diferentseerumisele. Lisaks võrreldi *AHR*-i ekspressiooni H9 ja H1 hES rakkudes ning nende diferentseerumisel. Samuti seati eesmärgiks tuvastada hES rakkudes ning diferentseeritud rakkudes AHR-i seondumiskohti, leidmaks potentsiaalseid mehhanisme, mille kaudu AHR-i aktivatsioon võiks diferentseerumist mõjutada.

Töö esimeses osas selgus, et H9 ja H1 rakuliinide diferentseerumisel embrüonaalseteks kehadeks on *AHR*-i ekspressiooni dünaamika sarnane. See-eest nende diferentseerumispotentsiaal on mõnevõrra erinev. Mõlema rakuliini puhul toimub diferentseerumine eelistatult neuraalsesse suunda, seejuures tuvastati H9 embrüonaalsetes kehades kiiremat neuraalse suuna markeregeenide ülesregulatsiooni. Samuti täheldati, et H1 rakud diferentseeruvad H9 rakkudest kiiremini mesodermaalsesse suunda.

Eksperimentaalsed andmed näitasid, et TCDD ei avalda hES rakkudes ega ka diferentseerumise käigus mõju pluripotentsusmarkerite ekspressioonile. Küll aga tuvastati ChIP-seq analüüsil hES rakkudes AHR-i seondumine *miR-302* lähedusse, mille ekspressioon on vajalik pluripotentsuse säilitamiseks. Saadud tulemus viitab sellele, et AHR võib pluripotentsust kaudselt siiski reguleerida, kuid täpsemad mehhanismid vajavad veel selgitamist.

Käesolevas töös leiti, et TCDD avaldab endodermaalsele diferentseerumisele represserivat toimet. Neuraalsel diferentseerumisel ei täheldatud TCDD toimel suunamarkerite ekspressioonis olulisi muutusi, kuid sellegipoolest ei saa lõplikult välistada, et TCDD mõjutab varast neuraalset arengut läbi selliste geenide reguleerimise, mida käesolevas töös ei uuritud. Kuigi mesodermaalsel diferentseerumisel saadud tulemused erinevad mõningates aspektides kirjanduse andmetest, tundub siiski, et TCDD avaldab varajasele mesodermaalsele diferentseerumisele represserivat mõju. Lisaks tuvastati ChIP-seq analüüsil uudseid AHR-i potentsiaalseid sihtmärkgeene, nagu näiteks *SIX3*, *HAND1* ja *GSK3B*.

Kokkuvõttes näitavad käesoleva töö tulemused, et TCDD ei avalda otsest mõju hES rakkude pluripotentsusele, kuid on võimeline represserima varajast diferentseerumist. Selgitamaks täpsemaid molekulaarseid mehhanisme, mille kaudu TCDD mõjutab rakkude diferentseerumist erinevates suundades, on järgnevalt plaanis analüüsida läbi viidud RNA sekveneerimise andmeid. Nende tulemuste kõrnutamine ChIP-seq andmetega annab täiendavat informatsiooni, kuidas TCDD võiks läbi AHR-i diferentseerumist mõjutada.

# **„Effects of the aryl hydrocarbon receptor agonist on pluripotency and differentiation of human embryonic stem cells“**

Inge Varik

## Summary

Aryl hydrocarbon receptor (AHR) is a ligand-activated transcription factor that binds with high affinity to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) and leads to numerous toxicological outcomes. It has been shown that exposure to dioxins (including TCDD) even at low doses may increase the incidence of birth defects in the population. Therefore, it is undoubtedly important to investigate at which stages of development and through which mechanisms dioxins cause developmental disruptions. The effects of dioxins on human embryonic development can be mimicked by using human embryonic stem cells (hESCs) which can develop into all cell types of the body.

The aim of this study was to elucidate the effect of the aryl hydrocarbon receptor agonist TCDD on human embryonic stem cell pluripotency and early neural, mesodermal and endodermal differentiation. Another goal was to compare the expression of *AHR* in H9 and H1 hESC cell lines and during their differentiation. In addition, the genomic binding of AHR in pluripotent human embryonic stem cells and their differentiated progeny was analyzed to identify which genes could potentially be regulated by AHR during embryonic development.

In the first part of this thesis, it was found that the dynamics of AHR expression is similar in H9 and H1 cell lines. In contrast, the differentiation potential of these cell lines is somewhat different. In both cell lines, neural differentiation was initially preferred. Higher expression of neural marker genes was detected in H9 embryoid bodies which indicates faster neural induction. In addition, faster mesodermal induction was observed in H1 hESCs.

Experimental data showed that TCDD did not affect the expression of pluripotency markers in hESCs or during their differentiation. However, ChIP-seq analysis revealed binding of AHR in hESCs in the vicinity of *miR-302* which has been shown to regulate pluripotency. This indicates that AHR may indirectly regulate pluripotency.

The results of the current thesis show that TCDD has a repressive effect on endodermal differentiation. No significant changes in the expression of neural markers due to TCDD exposure were observed in neural differentiation. However, it cannot be definitively ruled out that TCDD affects early neural development by regulating genes which were not investigated

in this thesis. Although the results obtained for mesodermal differentiation differ from what has been previously shown in another lab, TCDD still appears to exert repressive effect on early mesodermal differentiation.

In summary, the results of this thesis show that TCDD does not affect the pluripotency of hESCs but is able to repress early differentiation. In order to elucidate the more precise molecular mechanisms through which TCDD influences differentiation into different lineages, the next plan is to analyze the obtained RNA sequencing data. Combining these results with ChIP-seq data will provide additional information on how TCDD could affect differentiation.

## **Tänuõnad**

Eelkõige sooviksin tänada oma juhendajat Indrek Teinot, kes oli käesoleva magistritöö valmimisel suureks abiks. Olen tänulik Annika Treile, kes oli alati abivalmis ning tagas, et eksperimentideks jaguks tüvirakke. Tänu kuuluvad ka Dmitri Lubenetsile, kes abistas voolutsütomeetria eksperimentidega. Soovin tänada veel Martin Pooki, kes andis nii eksperimentide läbiviimise kui analüüsi osas mõningaid näpunäiteid. Suured tänuõnad kuuluvad kindlasti ka Antti Matverele ja Tõnis Orgile, kes aitasid ChIP-i eksperimentidega.

## Kirjanduse loetelu

Abeyta, M.J., Clark, A.T., Rodriguez, R.T., Bodnar, M.S., Pera, R.A.R. ja Firpo, M.T. (2004). Unique gene expression signatures of independently-derived human embryonic stem cell lines. *Hum. Mol. Genet.* *13*, 601–608.

Adachi, J., Mori, Y., Matsui, S., Takigami, H., Fujino, J., Kitagawa, H., Miller, C.A., Kato, T., Saeki, K. ja Matsuda, T. (2001). Indirubin and indigo are potent aryl hydrocarbon receptor ligands present in human urine. *J. Biol. Chem.* *276*, 31475–31478.

Adachi, K., Suemori, H., Yasuda, S., Nakatsuji, N. ja Kawase, E. (2010). Role of SOX2 in maintaining pluripotency of human embryonic stem cells. *Genes Cells* *15*, 455–470.

Ashida, H., Fukuda, I., Yamashita, T. ja Kanazawa, K. (2000). Flavones and flavonols at dietary levels inhibit a transformation of aryl hydrocarbon receptor induced by dioxin. *FEBS Lett.* *476*, 213–217.

Avilion, A.A., Nicolis, S.K., Pevny, L.H., Perez, L., Vivian, N. ja Lovell-Badge, R. (2003). Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev.* *17*, 126–140.

Baba, T., Mimura, J., Nakamura, N., Harada, N., Yamamoto, M., Morohashi, K. ja Fujii-Kuriyama, Y. (2005). Intrinsic function of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor as a key factor in female reproduction. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 10040–10051.

Becker, K.A., Ghule, P.N., Therrien, J.A., Lian, J.B., Stein, J.L., Wijnen, A.J. van ja Stein, G.S. (2006). Self-renewal of human embryonic stem cells is supported by a shortened G1 cell cycle phase. *J. Cell. Physiol.* *209*, 883–893.

Ben-David, U., Siranosian, B., Ha, G., ... Nag, A. (2018). Genetic and transcriptional evolution alters cancer cell line drug response. *Nature*, *560*(7718), 325-330.

Bernardo, A. S., Faial, T., Gardner, L., ... Bardwell, L. (2011). BRACHYURY and CDX2 mediate BMP-induced differentiation of human and mouse pluripotent stem cells into embryonic and extraembryonic lineages. *Cell stem cell*, *9*(2), 144-155.

Bertazzi, P.A., Consonni, D., Bachetti, S., Rubagotti, M., Baccarelli, A., Zocchetti, C. ja Pesatori, A.C. (2001). Health Effects of Dioxin Exposure: A 20-Year Mortality Study. *Am. J. Epidemiol.* *153*, 1031–1044.

Boitano, A. E., Wang, J., Romeo, R., ... Schultz, P. G. (2010). Aryl hydrocarbon receptor antagonists promote the expansion of human hematopoietic stem cells. *Science*, *329*(5997), 1345-1348.

Boyer, L. A., Lee, T. I., Cole, M. F.,... Gifford, D. K. (2005). Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *cell*, *122*(6), 947-956.

Brimble, S.N., Zeng, X., Weiler, D.A., Luo, Y., Liu, Y., Lyons, I.G., Freed, W.J., Robins, A.J., Rao, M.S. ja Schulz, T.C. (2004). Karyotypic Stability, Genotyping, Differentiation, Feeder-Free Maintenance, and Gene Expression Sampling in Three Human Embryonic Stem Cell Lines Derived Prior to August 9, 2001. *Stem Cells Dev.* *13*, 585–597.

- Brink, S.C. van den, Baillie-Johnson, P., Balayo, T., Hadjantonakis, A.-K., Nowotschin, S., Turner, D.A. ja Arias, A.M. (2014). Symmetry breaking, germ layer specification and axial organisation in aggregates of mouse embryonic stem cells. *Development* *141*, 4231–4242.
- Cai, J., DelaForest, A., Fisher, J., Urick, A., Wagner, T., Twaroski, K., Cayo, M., Nagaoka, M. ja Duncan, S.A. (2014). Protocol for directed differentiation of human pluripotent stem cells toward a hepatocyte fate. *StemBook*.
- Carreira, V. S., Fan, Y., Kurita, H., ... Medvedovic, M. (2015). Disruption of Ah receptor signaling during mouse development leads to abnormal cardiac structure and function in the adult. *PloS one*, *10*(11).
- Carver, L.A. ja Bradfield, C.A. (1997). Ligand-dependent interaction of the aryl hydrocarbon receptor with a novel immunophilin homolog in vivo. *J. Biol. Chem.* *272*, 11452–11456.
- Casper, R.F., Quesne, M., Rogers, I.M., Shirota, T., Jolivet, A., Milgrom, E. ja Savouret, J.-F. (1999). Resveratrol Has Antagonist Activity on the Aryl Hydrocarbon Receptor: Implications for Prevention of Dioxin Toxicity. *Mol. Pharmacol.* *56*, 784–790.
- Chazaud, C., Yamanaka, Y., Pawson, T. ja Rossant, J. (2006). Early Lineage Segregation between Epiblast and Primitive Endoderm in Mouse Blastocysts through the Grb2-MAPK Pathway. *Dev. Cell* *10*, 615–624.
- Condic, M.L. (2014). Totipotency: What It Is and What It Is Not. *Stem Cells Dev.* *23*, 796–812.
- Cowan, C. A., Klimanskaya, I., McMahon, J., ... Melton, D. A. (2004). Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts. *New England Journal of Medicine*, *350*(13), 1353–1356.
- Dakhore, S., Nayer, B. ja Hasegawa, K. (2018). Human Pluripotent Stem Cell Culture: Current Status, Challenges, and Advancement. *Stem Cells Int.* *2018*.
- D'Amour, K.A., Agulnick, A.D., Eliazer, S., Kelly, O.G., Kroon, E. ja Baetge, E.E. (2005). Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm. *Nat. Biotechnol.* *23*, 1534–1541.
- Dang, L. T., Tondl, M., Chiu, M. H. H., ... Drvodelic, M. J. (2018). TrawlerWeb: an online de novo motif discovery tool for next-generation sequencing datasets. *BMC genomics*, *19*(1), 238.
- Davarinos, N.A. ja Pollenz, R.S. (1999). Aryl hydrocarbon receptor imported into the nucleus following ligand binding is rapidly degraded via the cytoplasmic proteasome following nuclear export. *J. Biol. Chem.* *274*, 28708–28715.
- Denison, M.S. ja Nagy, S.R. (2003). Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *43*, 309–334.
- Dhara, S.K. ja Stice, S.L. (2008). Neural differentiation of human embryonic stem cells. *J. Cell. Biochem.* *105*, 633–640.
- Dolwick, K.M., Schmidt, J.V., Carver, L.A., Swanson, H.I. ja Bradfield, C.A. (1993). Cloning and expression of a human Ah receptor cDNA. *Mol. Pharmacol.* *44*, 911–917.

- Duncan, D.M., Burgess, E.A. ja Duncan, I. (1998). Control of distal antennal identity and tarsal development in *Drosophila* by spineless–aristapedia, a homolog of the mammalian dioxin receptor. *Genes Dev.* *12*, 1290–1303.
- Dunham, I., Birney, E., Lajoie, B. R., ... Dekker, J. (2012). An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome.
- Eiraku, M., Takata, N., Ishibashi, H., Kawada, M., Sakakura, E., Okuda, S., Sekiguchi, K., Adachi, T. ja Sasai, Y. (2011). Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture. *Nature* *472*, 51–56.
- Enan, E. ja Matsumura, F. (1996). Identification of c-Src as the integral component of the cytosolic Ah receptor complex, transducing the signal of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) through the protein phosphorylation pathway. *Biochem. Pharmacol.* *52*, 1599–1612.
- Endo, T., Kakeyama, M., Uemura, Y., Haijima, A., Okuno, H., Bito, H. ja Tohyama, C. (2012). Executive function deficits and social-behavioral abnormality in mice exposed to a low dose of dioxin in utero and via lactation. *PLoS One* *7*, e50741.
- Eskenazi, B., Warner, M., Mocarelli, P., ... Olive, D. (2002). Serum dioxin concentrations and menstrual cycle characteristics. *American journal of epidemiology*, *156*(4), 383-392.
- Evans, M.J. ja Kaufman, M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* *292*, 154–156.
- Evseenko, D., Zhu, Y., Schenke-Layland, K., ... Crooks, G. M. (2010). Mapping the first stages of mesoderm commitment during differentiation of human embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(31), 13742-13747.
- Fernandez-Salguero, P.M., Ward, J.M., Sundberg, J.P. ja Gonzalez, F.J. (1997). Lesions of aryl-hydrocarbon receptor–deficient mice. *Vet. Pathol.* *34*, 605–614.
- Fleming, T.P. (1987). A quantitative analysis of cell allocation to trophectoderm and inner cell mass in the mouse blastocyst. *Dev. Biol.* *119*, 520–531.
- Fu, H., Wang, L., Wang, J., Bennett, B.D., Li, J.-L., Zhao, B. ja Hu, G. (2019). Dioxin and AHR impairs mesoderm gene expression and cardiac differentiation in human embryonic stem cells. *Sci. Total Environ.* *651*, 1038–1046.
- Fukunaga, B.N., Probst, M.R., Reisz-Porszasz, S. ja Hankinson, O. (1995). Identification of functional domains of the aryl hydrocarbon receptor. *J. Biol. Chem.* *270*, 29270–29278.
- Gadue, P., Huber, T.L., Nostro, M.C., Kattman, S. ja Keller, G.M. (2005). Germ layer induction from embryonic stem cells. *Exp. Hematol.* *33*, 955–964.
- Gilbert, S.F. (2000). *Early Mammalian Development*. *Dev. Biol.* 6th Ed.
- Gramatzki, D., Pantazis, G., Schittenhelm, J., Tabatabai, G., Köhle, C., Wick, W., Schwarz, M., Weller, M. ja Tritzler, I. (2009). Aryl hydrocarbon receptor inhibition downregulates the TGF-beta/Smad pathway in human glioblastoma cells. *Oncogene* *28*, 2593–2605.
- Gu, Y.-Z., Hogenesch, J.B. ja Bradfield, C.A. (2000). The PAS Superfamily: Sensors of Environmental and Developmental Signals. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *40*, 519–561.

- Hahn, M.E. (2002). Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution. *Chem. Biol. Interact.* *141*, 131–160.
- Heimler, I., Trewin, A.L., Chaffin, C.L., Rawlins, R.G. ja Hutz, R.J. (1998). Modulation of ovarian follicle maturation and effects on apoptotic cell death in Holtzman rats exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in utero and lactationally. *Reprod. Toxicol.* *12*, 69–73.
- Heins, N., Englund, M.C.O., Sjöblom, C., Dahl, U., Tønning, A., Bergh, C., Lindahl, A., Hanson, C. ja Semb, H. (2004). Derivation, characterization, and differentiation of human embryonic stem cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* *22*, 367–376.
- Hentze, H., Soong, P.L., Wang, S.T., Phillips, B.W., Putti, T.C. ja Dunn, N.R. (2009). Teratoma formation by human embryonic stem cells: Evaluation of essential parameters for future safety studies. *Stem Cell Res.* *2*, 198–210.
- Hermann, H. (2013). Arüülsüivesinike retseptori roll inimese embrüonaalsete tüvirakkude pluripotentsusmarkerite ekspressioonis ning rakutsükli regulatsioonis. *Bakalaureusetöö. Tartu Ülikool.*
- Hoffman, L.M. ja Carpenter, M.K. (2005). Characterization and culture of human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* *23*, 699–708.
- Hu, S., Wilson, K.D., Ghosh, Z., Han, L., Wang, Y., Lan, F., Ransohoff, K.J., Burridge, P. ja Wu, J.C. (2013a). MicroRNA-302 increases reprogramming efficiency via repression of NR2F2. *Stem Cells Dayt. Ohio* *31*, 259–268.
- Hu, W., Zhao, J. ja Pei, G. (2013b). Activation of Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) by Tranilast, an Anti-allergy Drug, Promotes miR-302 Expression and Cell Reprogramming. *J. Biol. Chem.* *288*, 22972–22984.
- Hughes, C.S., Postovit, L.M. ja Lajoie, G.A. (2010). Matrigel: A complex protein mixture required for optimal growth of cell culture. *PROTEOMICS* *10*, 1886–1890.
- Hyslop, L., Stojkovic, M., Armstrong, L., Walter, T., Stojkovic, P., Przyborski, S., Herbert, M., Murdoch, A., Strachan, T. ja Lako, M. (2005). Downregulation of NANOG induces differentiation of human embryonic stem cells to extraembryonic lineages. *Stem Cells Dayt. Ohio* *23*, 1035–1043.
- Ikuta, T., Eguchi, H., Tachibana, T., Yoneda, Y. ja Kawajiri, K. (1998). Nuclear localization and export signals of the human aryl hydrocarbon receptor. *J. Biol. Chem.* *273*, 2895–2904.
- Israel, D.I. ja Whitlock, J.P. (1984). Regulation of cytochrome P1-450 gene transcription by 2,3,7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in wild type and variant mouse hepatoma cells. *J. Biol. Chem.* *259*, 5400–5402.
- Itskovitz-Eldor, J., Schuldiner, M., Karsenti, D., Eden, A., Yanuka, O., Amit, M., Soreq, H. ja Benvenisty, N. (2000). Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. *Mol. Med. Camb. Mass* *6*, 88–95.
- James, D., Levine, A.J., Besser, D. ja Hemmati-Brivanlou, A. (2005). TGFbeta/activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells. *Dev. Camb. Engl.* *132*, 1273–1282.

- Jiang, Y., Wang, K., Fang, R. ja Zheng, J. (2010). Expression of Aryl Hydrocarbon Receptor in Human Placentas and Fetal Tissues. *J. Histochem. Cytochem.* *58*, 679–685.
- Keller, G. (2005). Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine. *Genes Dev.* *19*, 1129–1155.
- Kent, W.J., Sugnet, C.W., Furey, T.S., Roskin, K.M., Pringle, T.H., Zahler, A.M. ja Haussler, D. (2002). The human genome browser at UCSC. *Genome Res.* *12*, 996–1006.
- Kerkvliet, N.I., Stepan, L.B., Vorachek, W., Oda, S., Farrer, D., Wong, C.P., Pham, D. ja Mourich, D.V. (2009). Activation of aryl hydrocarbon receptor by TCDD prevents diabetes in NOD mice and increases Foxp3+ T cells in pancreatic lymph nodes. *Immunotherapy* *1*, 539–547.
- Kim, N., Piatyszek, M., Prowse, K., Harley, C., West, M., Ho, P., Coviello, G., Wright, W., Weinrich, S. ja Shay, J. (1994). Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* *266*, 2011–2015.
- Kimura, E., Kubo, K.-I., Endo, T., Nakajima, K., Kakeyama, M. ja Tohyama, C. (2017). Excessive activation of AhR signaling disrupts neuronal migration in the hippocampal CA1 region in the developing mouse. *J. Toxicol. Sci.* *42*, 25–30.
- Kleinman, H.K. ja Martin, G.R. (2005). Matrigel: Basement membrane matrix with biological activity. *Semin. Cancer Biol.* *15*, 378–386.
- Ko, C.-I., Wang, Q., Fan, Y., Xia, Y. ja 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.
- Ko, C.-I., Fan, Y., de Gannes, M., Wang, Q., Xia, Y. ja Puga, A. (2016). Repression of the Aryl Hydrocarbon Receptor Is Required to Maintain Mitotic Progression and Prevent Loss of Pluripotency of Embryonic Stem Cells. *STEM CELLS* *34*, 2825–2839.
- Koliopanos, A., Kleeff, J., Xiao, Y., Safe, S., Zimmermann, A., Büchler, M.W. ja Friess, H. (2002). Increased arylhydrocarbon receptor expression offers a potential therapeutic target for pancreatic cancer. *Oncogene* *21*, 6059–6070.
- Kopper, O. ja Benvenisty, N. (2012). Stepwise differentiation of human embryonic stem cells into early endoderm derivatives and their molecular characterization. *Stem Cell Res.* *8*, 335–345.
- Kroon, E., Martinson, L. A., Kadoya, K., ... Agulnick, A. D. (2008). Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo. *Nature biotechnology*, *26*(4), 443–452.
- Kubi, J.A., Chen, A.C.H., Fong, S.W., Lai, K.P., Wong, C.K.C., Yeung, W.S.B., Lee, K.F. ja Lee, Y.L. (2019). Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on the differentiation of embryonic stem cells towards pancreatic lineage and pancreatic beta cell function. *Environ. Int.* *130*, 104885.
- Kumar, M.B., Ramadoss, P., Reen, R.K., Heuvel, J.P.V. ja Perdew, G.H. (2001). The Q-rich Subdomain of the Human AhReceptor Transactivation Domain Is Required for Dioxin-mediated Transcriptional Activity. *J. Biol. Chem.* *276*, 42302–42310.

- Langmead, B. ja Salzberg, S.L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods* 9, 357–359.
- Larsen, K.B., Lutterodt, M.C., Møllgård, K. ja Møller, M. (2010). Expression of the Homeobox Genes OTX2 and OTX1 in the Early Developing Human Brain: *J. Histochem. Cytochem.*
- Lee, J.B., Song, J.M., Lee, J.E., Park, J.H., Kim, S.J., Kang, S.M., Kwon, J.N., Kim, M.K., Roh, S.I. ja Yoon, H.S. (2004). Available human feeder cells for the maintenance of human embryonic stem cells. *Reproduction* 128, 727–735.
- Li, C.-H., Liu, C.-W., Tsai, C.-H., Peng, Y.-J., Yang, Y.-H., Liao, P.-L., Lee, C.-C., Cheng, Y.-W. ja Kang, J.-J. (2017). Cytoplasmic aryl hydrocarbon receptor regulates glycogen synthase kinase 3 beta, accelerates vimentin degradation, and suppresses epithelial–mesenchymal transition in non-small cell lung cancer cells. *Arch. Toxicol.* 91, 2165–2178.
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G. ja Durbin, R. (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25, 2078–2079.
- Li, S., Pei, X., Zhang, W., Xie, H.Q. ja Zhao, B. (2014). Functional analysis of the dioxin response elements (DREs) of the murine CYP1A1 gene promoter: beyond the core DRE sequence. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 6475–6487.
- Liu, T., Ortiz, J. A., Taing, L., ... Pape, U. J. (2011). Cistrome: an integrative platform for transcriptional regulation studies. *Genome biology*, 12(8), R83.
- Liu, Y., Tanabe, K., Baronnier, D., Patel, S., Woodgett, J., Cras-Méneur, C. ja Permutt, M.A. (2010). Conditional ablation of Gsk-3 $\beta$  in islet beta cells results in expanded mass and resistance to fat feeding-induced diabetes in mice. *Diabetologia* 53, 2600–2610.
- Livak, K.J. ja Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2 $^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods* 25, 402–408.
- Mezrich, J.D., Fechner, J.H., Zhang, X., Johnson, B.P., Burlingham, W.J. ja Bradfield, C.A. (2010). An interaction between kynurenine and the aryl hydrocarbon receptor can generate regulatory T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 185, 3190–3198.
- Mimura, J. ja Fujii-Kuriyama, Y. (2003). Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 1619, 263–268.
- Mimura, J., Ema, M., Sogawa, K. ja Fujii-Kuriyama, Y. (1999). Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function. *Genes Dev.* 13, 20–25.
- Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., Maruyama, M., Maeda, M. ja Yamanaka, S. (2003). The Homeoprotein Nanog Is Required for Maintenance of Pluripotency in Mouse Epiblast and ES Cells. *Cell* 113, 631–642.
- Monostory, K., Pascussi, J.M., Kóbori, L. ja Dvorak, Z. (2009). Hormonal regulation of CYP1A expression. *Drug Metab. Rev.*
- Morán, F.M., VandeVoort, C.A., Overstreet, J.W., Lasley, B.L. ja Conley, A.J. (2003). Molecular target of endocrine disruption in human luteinizing granulosa cells by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin: inhibition of estradiol secretion due to decreased 17 $\alpha$ -hydroxylase/17,20-lyase cytochrome P450 expression. *Endocrinology* 144, 467–473.

- Muraki, K., Nyhan, K., Han, L. ja Murnane, J.P. (2012). Mechanisms of telomere loss and their consequences for chromosome instability. *Front. Oncol.* 2.
- Nacarino-Palma, A., Merino, J.M. ja Fernández-Salguero, P.M. (2020). The Aryl Hydrocarbon Receptor Promotes Differentiation During Mouse Preimplantational Embryo Development. *BioRxiv* 2020.04.07.026047.
- Nagy, A., Rossant, J., Nagy, R., Abramow-Newerly, W. ja Roder, J.C. (1993). Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 8424–8428.
- Nair, S.C., Toran, E.J., Rimerman, R.A., Hjermstad, S., Smithgall, T.E. ja Smith, D.F. (1996). A pathway of multi-chaperone interactions common to diverse regulatory proteins: estrogen receptor, Fes tyrosine kinase, heat shock transcription factor Hsf1, and the aryl hydrocarbon receptor. *Cell Stress Chaperones* 1, 237–250.
- Nebert, D.W., Dalton, T.P., Okey, A.B. ja Gonzalez, F.J. (2004). Role of Aryl Hydrocarbon Receptor-mediated Induction of the CYP1 Enzymes in Environmental Toxicity and Cancer. *J. Biol. Chem.* 279, 23847–23850.
- Ngo, A.D., Taylor, R., Roberts, C.L. ja Nguyen, T.V. (2006). Association between Agent Orange and birth defects: systematic review and meta-analysis. *Int. J. Epidemiol.* 35, 1220–1230.
- Nichols, J., Zevnik, B., Anastasiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Schöler, H. ja 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. ja Smith, A.G. (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat. Genet.* 24, 372–376.
- Oh, S.K., Kim, H.S., Park, Y.B., Seol, H.W., Kim, Y.Y., Cho, M.S., Ku, S.Y., Choi, Y.M., Kim, D.-W. ja Moon, S.Y. (2005). Methods for Expansion of Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells* 23, 605–609.
- Ohtake, F., Baba, A., Takada, I., ... Fujii-Kuriyama, Y. (2007). Dioxin receptor is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase. *Nature*, 446(7135), 562-566.
- Ortega, N.M., Winblad, N., Plaza Reyes, A. ja Lanner, F. (2018). Functional genetics of early human development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 52, 1–6.
- Pagliuca, F.W., Millman, J.R., Gürtler, M., Segel, M., Van Dervort, A., Ryu, J.H., Peterson, Q.P., Greiner, D. ja Melton, D.A. (2014). Generation of functional human pancreatic  $\beta$  cells in vitro. *Cell* 159, 428–439.
- Pajusaar, L. (2018). Arüülsüivesinike retseptori ekspressioon inimese embrüonaalsete tüvirakkude diferentseerumisel ekto-, endo- ning mesodermaalses suunas. Bakalaureusetöö. Tartu Ülikool.
- Peng, T.-L., Chen, J., Mao, W., Liu, X., Tao, Y., Chen, L.-Z. ja Chen, M.-H. (2009). Potential therapeutic significance of increased expression of aryl hydrocarbon receptor in human gastric cancer. *World J. Gastroenterol. WJG* 15, 1719–1729.

- Pitt, J.A., Feng, L., Abbott, B.D., Schmid, J., Batt, R.E., Costich, T.G., Koury, S.T. ja Bofinger, D.P. (2001). Expression of AhR and ARNT mRNA in Cultured Human Endometrial Explants Exposed to TCDD. *Toxicol. Sci.* 62, 289–298.
- Quinlan, A.R. ja Hall, I.M. (2010). BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 26, 841–842.
- Ramírez, F., Ryan, D.P., Grüning, B., Bhardwaj, V., Kilpert, F., Richter, A.S., Heyne, S., Dündar, F. ja Manke, T. (2016). deepTools2: a next generation web server for deep-sequencing data analysis. *Nucleic Acids Res.* 44, W160-165.
- Reubinoff, B.E., Pera, M.F., Fong, C.-Y., Trounson, A. ja Bongso, A. (2000). Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat. Biotechnol.* 18, 399–404.
- Revich, B., Aksel, E., Ushakova, T., Ivanova, I., Zhuchenko, N., Klyuev, N., Brodsky, B. ja Sotskov, Y. (2001). Dioxin exposure and public health in Chapaevsk, Russia. *Chemosphere* 43, 951–966.
- Reyes, H., Reisz-Porszasz, S. ja Hankinson, O. (1992). Identification of the Ah receptor nuclear translocator protein (Arnt) as a component of the DNA binding form of the Ah receptor. *Science* 256, 1193–1195.
- Riley, P., Anaon-Cartwright, L. ja Cross, J.C. (1998). The Hand1 bHLH transcription factor is essential for placentation and cardiac morphogenesis. *Nat. Genet.* 18, 271–275.
- Rodda, D.J., Chew, J.-L., Lim, L.-H., Loh, Y.-H., Wang, B., Ng, H.-H. ja Robson, P. (2005). Transcriptional Regulation of Nanog by OCT4 and SOX2. *J. Biol. Chem.* 280, 24731–24737.
- Rosler, E.S., Fisk, G.J., Ares, X., Irving, J., Miura, T., Rao, M.S. ja Carpenter, M.K. (2004). Long-term culture of human embryonic stem cells in feeder-free conditions. *Dev. Dyn.* 229, 259–274.
- Rothhammer, V. ja Quintana, F.J. (2019). The aryl hydrocarbon receptor: an environmental sensor integrating immune responses in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 19, 184–197.
- Sarma, S.N., Nagano, R. ja Ohsako, S. (2019). Tyroxine Hydroxylase-Positive Neuronal Cell Population is Increased by Temporal Dioxin Exposure at Early Stage of Differentiation from Human Embryonic Stem Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 20.
- Sathananthan, H., Pera, M. ja Trounson, A. (2002). The fine structure of human embryonic stem cells. *Reprod. Biomed. Online* 4, 56–61.
- Schaldach, C.M., Riby, J. ja Bjeldanes, L.F. (1999). Lipoxin A4: a new class of ligand for the Ah receptor. *Biochemistry* 38, 7594–7600.
- Schwartz, P.H., Brick, D.J., Nethercott, H.E. ja Stover, A.E. (2011). Traditional Human Embryonic Stem Cell Culture. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 767, 107–123.
- Sharpless, N.E. ja DePinho, R.A. (2007). How stem cells age and why this makes us grow old. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 703–713.
- Shenghui, H., Nakada, D. ja Morrison, S.J. (2009). Mechanisms of Stem Cell Self-Renewal. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 25, 377–406.

- Simanainen, U., Adamsson, A., Tuomisto, J.T., Miettinen, H.M., Toppari, J., Tuomisto, J. ja Viluksela, M. (2004). Adult 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin (TCDD) Exposure and Effects on Male Reproductive Organs in Three Differentially TCDD-Susceptible Rat Lines. *Toxicol. Sci.* 81, 401–407.
- Singh, K.P., Garrett, R.W., Casado, F.L. ja Gasiewicz, T.A. (2011). Aryl hydrocarbon receptor-null allele mice have hematopoietic stem/progenitor cells with abnormal characteristics and functions. *Stem Cells Dev.* 20, 769–784.
- Singh, V.K., Saini, A., Kalsan, M., Kumar, N. ja Chandra, R. (2016). Describing the Stem Cell Potency: The Various Methods of Functional Assessment and In silico Diagnostics. *Front. Cell Dev. Biol.* 4.
- Swanson, H.I., Chan, W.K. ja Bradfield, C.A. (1995). DNA Binding Specificities and Pairing Rules of the Ah Receptor, ARNT, and SIM Proteins. *J. Biol. Chem.* 270, 26292–26302.
- Tabrizi, G.A., Böse, K., Reimann, Y. ja Kessel, M. (2013). Geminin Is Required for the Maintenance of Pluripotency. *PLOS One* 8, e73826.
- Tada, S., Era, T., Furusawa, C., Sakurai, H., Nishikawa, S., Kinoshita, M., Nakao, K., Chiba, T. ja Nishikawa, S.-I. (2005). Characterization of mesendoderm: a diverging point of the definitive endoderm and mesoderm in embryonic stem cell differentiation culture. *Development* 132, 4363–4374.
- Takahashi, K. ja Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* 126, 663–676.
- Task, K., Jaramillo, M. ja Banerjee, I. (2012). Population Based Model of Human Embryonic Stem Cell (hESC) Differentiation during Endoderm Induction. *PLOS ONE* 7, e32975.
- Taylor, C.J., Bolton, E.M., Pocock, S., Sharples, L.D., Pedersen, R.A. ja Bradley, J.A. (2005). Banking on human embryonic stem cells: estimating the number of donor cell lines needed for HLA matching. *The Lancet* 366, 2019–2025.
- Theunissen, T.W. ja Jaenisch, R. (2017). Mechanisms of gene regulation in human embryos and pluripotent stem cells. *Dev. Camb. Engl.* 144, 4496–4509.
- Thomson, J.A. (1998). Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science* 282, 1145–1147.
- Thomson, M., Liu, S.J., Zou, L.-N., Smith, Z., Meissner, A. ja Ramanathan, S. (2011a). Pluripotency circuit members mediate germ layer fate choice of embryonic stem cells. *Cell* 145, 875–889.
- Thomson, M., Liu, S.J., Zou, L.-N., Smith, Z., Meissner, A. ja Ramanathan, S. (2011b). Pluripotency Factors in Embryonic Stem Cells Regulate Differentiation into Germ Layers. *Cell* 145, 875–889.
- Tsankov, A.M., Akopian, V., Pop, R., Chetty, S., Gifford, C.A., Daheron, L., Tsankova, N.M. ja Meissner, A. (2015). A qPCR ScoreCard quantifies the differentiation potential of human pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol.* 33, 1182–1192.
- Uudeküll, K. (2016). Arüülsüivesinike retseptori ekspressioon inimese embrüonaalsete tüvirakkude varasel diferentseerumisel. Bakalaureusetöö. Tartu Ülikool.

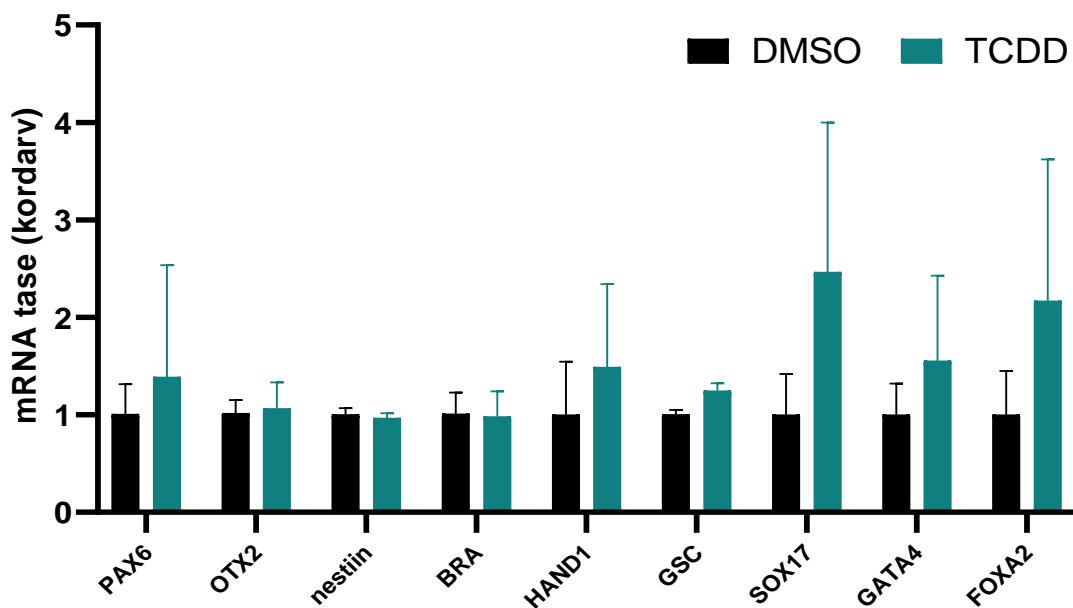
- Veldhoen, M., Hirota, K., Christensen, J., O'Garra, A. ja Stockinger, B. (2009). Natural agonists for aryl hydrocarbon receptor in culture medium are essential for optimal differentiation of Th17 T cells. *J. Exp. Med.* *206*, 43–49.
- Wang, L., Cerdan, C., Menendez, P. ja Bhatia, M. (2006). Derivation and characterization of hematopoietic cells from human embryonic stem cells. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *331*, 179–200.
- Wright, W.E., Piatyszek, M.A., Rainey, W.E., Byrd, W. ja Shay, J.W. (1996). Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev. Genet.* *18*, 173–179.
- Xu, C., Inokuma, M.S., Denham, J., Golds, K., Kundu, P., Gold, J.D. ja Carpenter, M.K. (2001). Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* *19*, 971–974.
- Yamamoto, T., Hatabayashi, K., Arita, M., ... Kawamata, S. (2019). Kynurenine signaling through the aryl hydrocarbon receptor maintains the undifferentiated state of human embryonic stem cells. *Science signaling*, *12*(587).
- Zhang, S.-C., Wernig, M., Duncan, I.D., Brüstle, O. ja Thomson, J.A. (2001). In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* *19*, 1129–1133.
- Zhang, X., Huang, C. T., Chen, J. ... Bondarenko, G. I. (2010). Pax6 is a human neuroectoderm cell fate determinant. *Cell stem cell*, *7*(1), 90-100.
- Zhang, Y., Liu, T., Meyer, C.A. ... Liu, X. S. (2008). Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome biology*, *9*(9), R137.

## **Kasutatud veebiaadressid**

1. ClinicalTrials.gov – <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03406962> (kasutatud 20.04.2020)
2. NCBI a – <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5460> (kasutatud 09.04.2020)
3. NIH Central Resource for Grants and Funding Information – [https://grants.nih.gov/stem\\_cells/registry/current.htm](https://grants.nih.gov/stem_cells/registry/current.htm) (kasutatud 11.04.2020)
4. Uniprot a – <https://www.uniprot.org/uniprot/Q01860> (kasutatud 11.04.2020)
5. Uniprot b – <https://www.uniprot.org/uniprot/Q9H9S0> (kasutatud 11.04.2020)
6. Uniprot c – <https://www.uniprot.org/uniprot/P48431> (kasutatud 11.04.2020)
7. Uniprot d – <https://www.uniprot.org/uniprot/P35869> (kasutatud 19.04.2020)

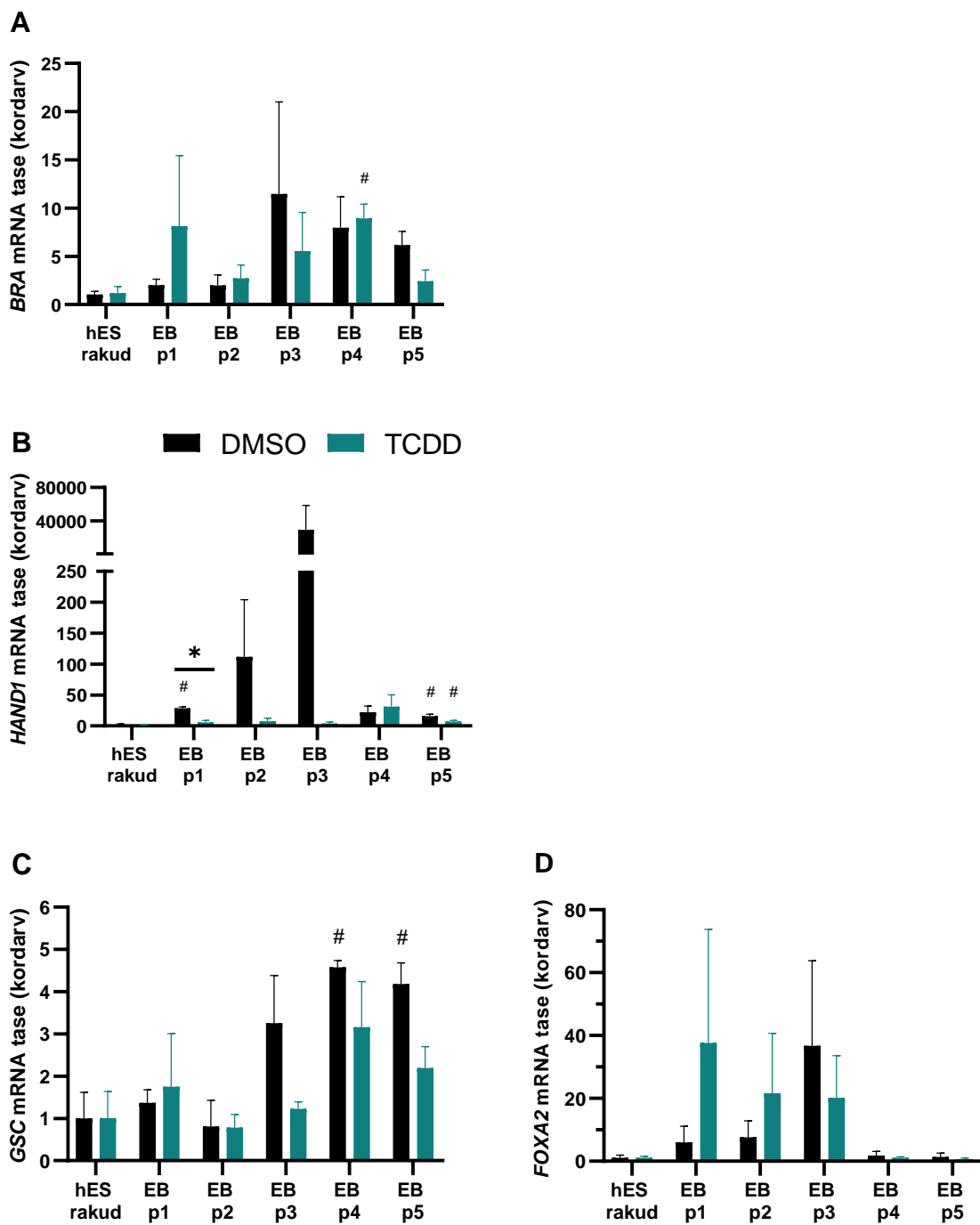


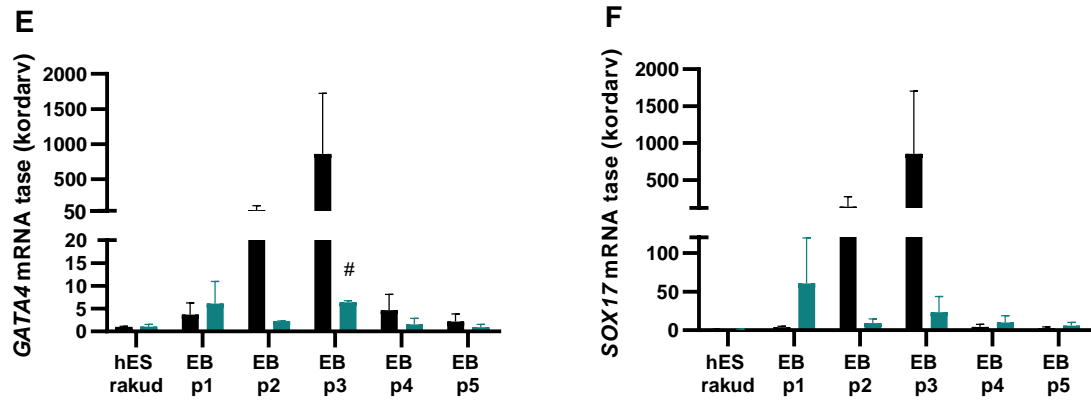
**Lisa 2. TCDD toime diferentseerumise markergeenide ekspressioonile hES rakkudes**



**Joonis 27. TCDD toime diferentseerumise markergeenide ekspressioonile hES rakkudes.** hES rakke töödeldi kolme ööpäeva jooksul 10 nM TCDD või vastavas koguses DMSO-ga. mRNA tasemed mõõdeti qPCR meetodil ning normaliseeriti *TBP* suhtes. Geenide ekspressioonitasemed on mõõdetud kolme korduskatse tulemusena.

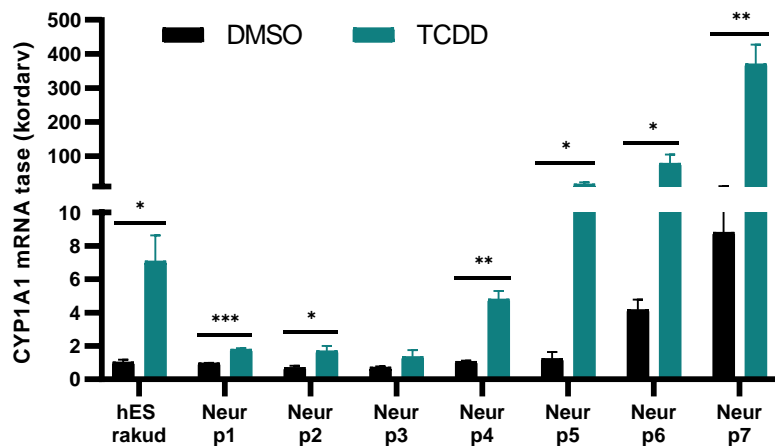
**Lisa 3. Mesodermi ja endodermi markergeenide ekspressioon H9 embrüonaalsete kehade diferentseerumisel TCDD juuresolekul**





**Joonis 28. Mesodermi markergeenide *BRA* (A), *HAND1* (B) ja *GSC* (C) ning endodermi markergeenide *FOXA2* (D), *GATA4* (E) ja *SOX17* (F) ekspressioon H9 embrüonaalsete kehade diferentseerumisel TCDD juuresolekul. hES rakke töödeldi kolme ööpäeva jooksul 10 nM TCDD või vastavas koguses DMSO-ga ning seejärel moodustati embrüonaalsed kehad, mida kasvatati koekultuuris TCDD või DMSO juuresolekul viis päeva. Joonisel on mRNA tasemed esitatud kordarvuna vastava töötlustega hES rakkude proovi suhtes. Tulemus põhineb kahel iseseisval korduskatsel (\*p < 0,05, #p < 0,05 vs hES rakud).**

**Lisa 4. TCDD toime AHR-i sihtmärkgeeni ekspressioonile varajasel neuraalsel diferentseerumisel**



**Joonis 29. *CYP1A1* ekspressioon H9 hES rakkude varajasel neuraalsel diferentseerumisel TCDD juuresolekul.** hES rakke töödeldi kolme ööpäeva jooksul 10 nM TCDD või vastavas koguses DMSO-ga ning seejärel diferentseeriti neid DMSO või TCDD juuresolekul neuraalses (Neur) suunas seitse päeva. Joonisel on mRNA tasemed esitatud kordarvuna vastava töötusega hES rakkude proovi suhtes. Tulemus põhineb kolmel iseseisval korduskatsel (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ).

## **Lihlitsents**

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

Mina, Inge Varik,

annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihlitsentsi) minu loodud teose

„Arüülsüivesinike retseptori agonisti toime inimese embrüonaalsete tüvirakkude pluripotentsusele ja diferentseerumisele“,

mille juhendaja on Indrek Teino,

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, alates **01.06.2021** kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

Kinnitan, et lihlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Inge Varik

**11.06.2020**