

TARTU ÜLIKOOL

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

**Arüülsüsivesinike retseptori ekspressioon hiire munasarja
granuloosarakkudes folliikulite küpsemisel**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Inge Varik

Juhendajad

MSc Indrek Teino

MSc Antti Matvere

TARTU 2018

“Arüülsüivesinike retseptori ekspressioon hiire munasarja granuloosarakkudes folliikulite küpsemisel”

Hiire munasari koosneb folliikulitest, mille areng ja kasv on koordineeritud mitmete gonadotropiinide ja steroidhormoonide poolt. Arüülsüivesinike retseptor (Ahr) on transkriptsioonifaktor, mis on eelkõige tuntud mitmete keskkonnakemikaalide, näiteks dioksiinide metaboliseerijana, kuid lisaks sellele on näidatud Ahr-i olulisust reproduktiivorganites, sealhulgas munasarjas.

Varasemad uuringud on näidanud, et *Ahr*-i ekspressioon on gonadotropiinidest sõltuv. Sellest tulenevalt püstitati antud bakalaureusetöö eesmärgiks uurida Ahr-i lokalisatsiooni hiire munasarja folliikulites gonadotropiini PMSG mõjul ja seejärel uurida, missuguse signaaliraja kaudu on vahendatud PMSG toime *Ahr*-i ekspressioonile. Bakalaureusetöö katsete tulemusena selgus, et Ahr on ülesreguleeritud suurtes antraalsetes folliikulites. Veel leiti, et proteiinkinaas A signaaliraja aktivatsioon põhjustab granuloosarakkudes arüülsüivesinike retseptori allaregulatsiooni nii mRNA kui ka valgu tasemel *in vitro*.

Märksõnad: arüülsüivesinike retseptor, munasari, granuloosarakud, PMSG, proteiinkinaas A

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

„Expression of the aryl hydrocarbon receptor in murine granulosa cells during the maturation of ovarian follicles“

Murine ovaries are composed of follicles – the growth and development of which is coordinated by several gonadotropins and steroid hormones. The aryl hydrocarbon receptor (Ahr) is a transcription factor which is mostly known for metabolizing several environmental chemicals, e.g. dioxins. In addition, the importance of Ahr in reproductive organs (including ovaries) has been shown.

Previous research has demonstrated that the expression of *Ahr* is gonadotropin-dependent. Therefore, the purpose of the current thesis was to examine the localization of Ahr in murine ovarian follicles during follicle maturation in response to gonadotropin PMSG and to investigate which signaling pathways modulate the expression of *Ahr*. The results of this thesis show that Ahr is upregulated in large antral follicles. Furthermore, it was found that the activation of protein kinase A signaling pathway downregulates aryl hydrocarbon receptor mRNA and protein levels in granulosa cells *in vitro*.

Keywords: aryl hydrocarbon receptor, ovary, granulosa cells, PMSG, protein kinase A

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

SISUKORD

SISUKORD	3
KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1.1. Munasarja areng ning follikulogenees	7
1.2. Follikulogeneesi hormonaalne regulatsioon	9
1.3. Gonadotropiinid ja nende retseptorid.....	10
1.4. Kesksed signaalirajad munasarjas	10
1.5. Arüüsüsivesinike retseptor.....	11
1.6. AHR-i struktuur	12
1.7. AHR-i klassikaline signaalirada	13
1.8. Ahr-i seos reproduktsiooniga.....	14
1.9. <i>Ahr</i> -i ekspressiooni regulatsioon munasarjas	15
2. EKSPERIMENTAALOSA	17
2.1. Töö eesmärgid.....	17
2.2. Materjal ja meetodika	17
2.2.1. Rakud, söötmed, kemikaalid	17
2.2.2. Primaarsete granuloosarakkude eraldamine.....	17
2.2.3. RNA eraldamine.....	18
2.2.4. cDNA süntees.....	18
2.2.5. qPCR	19
2.2.6. Genotüpiseerimine	20
2.2.7. Koelõikude valmistamine.....	21
2.2.8. Immunofluorestsents	21
2.2.9. SDS-PAGE ja <i>Western blot</i>	22
2.2.10. Andmete statistiline analüüs.....	23
2.3. Tulemused.....	24

2.3.1. Ahr-i vastaste antikehade spetsiifilisuse kontrollimine.....	24
2.3.2. PMSG mõju Ahr-i valgu tasemele <i>in vivo</i>	26
2.3.3. PKA signaaliraja mõju <i>Ahr</i> -i mRNA ekspressioonile <i>in vitro</i>	26
2.3.4. PKA signaaliraja mõju follikulogeneesi markergeenide ekspressioonile <i>in vitro</i> ..	29
2.3.5. PKA signaaliraja mõju Ahr-i valgu tasemele <i>in vitro</i>	30
2.3.6. PMSG mõju p-CREB-i valgu tasemele <i>in vivo</i>	31
2.3.7. PKC signaaliraja mõju <i>Ahr</i> -i mRNA ekspressioonile <i>in vitro</i>	32
2.3.8. PKC signaaliraja mõju follikulogeneesi markergeenide ekspressioonile <i>in vitro</i> ...	33
2.4. Arutelu	34
KOKKUVÕTE	38
SUMMARY	39
TÄNUSÕNAD	40
KIRJANDUSE LOETELU	41
KASUTATUD VEEBIAADRESSID	47
LISAD	48
Lisa 1. Loomkatsete luba	48
Lisa 2. PKA signaaliraja mõju Ahr-i valgu tasemele granuloosarakkudes <i>in vitro</i>	50
Lisa 3. PKA signaaliraja mõju p-CREB-i valgu tasemele granuloosarakkudes <i>in vitro</i>	51
LIHTLITSENTS.....	52

Kasutatud lühendid

AHR – arüüsüsivesinike retseptor (*Aryl Hydrocarbon Receptor*)

AHRR – AHR-i repressor (*AHR repressor*)

ARNT – AHR-i tuuma translokaator (*AHR nuclear translocator*)

AhrKO – AHR-i *knock-out*

bHLH – aluseline heeliks-ling-heeliks motiiv (*Basic Helix-Loop-Helix*)

BMP4 – luu morfogeenne valk 4 (*Bone Morphogenic Protein 4*)

BSA – veise seerumi albumiin (*Bovine Serum Albumin*)

cAMP – tsükliline adenosiinmonofosfaat (*cyclic Adenosine Monophosphate*)

CREB – cAMP vastuselemendiga seonduv valk (*cAMP Response Element-Binding Protein*)

ED – embrüonaalne päev (*Embryonic Day*)

ERK – ekstratsellulaarselt reguleeritud kinaas (*Extracellular Regulated Kinase*)

FBS – veise loote seerum (*Fetal Bovine Serum*)

FSH – folliikuleid stimuleeriv hormoon (*Follicle Stimulating Hormone*)

FSHR – FSH retseptor (*Follicle Stimulating Hormone Receptor*)

GnRH – gonadotropiine vabastav hormoon (*Gonadotropin Releasing Hormone*)

hCG – inimese koorioni gonadotropiin (*Human Chorionic Gonadotropin*)

HSP90 – kuumašokivalk 90 (*Heat Shock Protein 90*)

IF - immunofluorestsentsanalüüs

LH – luteiniseeriv hormoon (*Luteinizing Hormone*)

LHCGR – luteiniseeriva hormooni/koorini gonadotropiini retseptor (*Luteinizing Hormone / Choriogonadotropin Receptor*)

MAPK – mitogeen-aktiveeritud proteiinkinaas (*Mitogen-Activated Protein Kinase*)

NLS – tuuma lokalisatsiooni signaal (*Nuclear Localization Signal*)

NGS – tavaline kitse seerum (*Normal Goat Serum*)

PAS A/B – Per-Arnt-Sim domään A/B

PI3K – fosfatidüülinositol-4,5-bisfosfaat 3-kinaas (*Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase*)

PMA – forboolmüristaatatsetaat (*Phorbol Myristate Acetate*)

PMSG – tiine mära seerumi gonadotropiin (*Pregnant Mare's Serum Gonadotropin*)

PKA – proteiinkinaas A (*Protein Kinase A*)

RÜ – rahvusvaheline ühik

XRE – ksenobiootiline vastuselement (*Xenobiotic Response Element*)

Sissejuhatus

Arüülsüivesinike retseptor (AHR) on ligand-aktiveeritav transkriptsioonifaktor, mis on peamiselt tuntud kui mitmete keskkonnas leiduvate ksenobiootiliste ühendite, näiteks dioksiinide, toksilisuse vahendaja. Lisaks AHR-i toksikoloogilisele tähtsusele on viimastel aastakümnetel leitud tõestust AHR-i endogeense funktsiooni kohta reproduktiivsüsteemis, kaasa arvatud munasarjas. Varasemad uuringud on viidanud AHR-i olulisusele follikulogeneesis – nimelt on *Ahr*KO hiirtel näidatud vähenenud viljakust, aeglasemat folliikulite kasvu ning vähenenud vastuvõtlikkust gonadotropiinidele.

Seda, kas ja kuidas mõjutavad munasarjas keskse tähtsusega gonadotropiinid *Ahr*-i ekspressiooni folliikulite küpsemise käigus, on seni vähe uuritud. Varasemalt on hiire preovulatoorsetes granuloosarakkudes näidatud, et luteiniseeriv hormoon avaldab *Ahr*-i ekspressioonile represserivat mõju. Hiljuti on selgunud, et *Ahr*-i ekspressiooni reguleeritakse gonadotropiinide toimel ka reproduktiivtsükli follikulaarses faasis. Nimelt on täheldatud, et folliikulite küpsemist esile kutsuv gonadotropiin PMSG osaleb hiire munasarjas *Ahr*-i ekspressiooni positiivses regulatsioonis. Selle kohta, kuidas PMSG mõju *Ahr*-ile täpsemalt avaldub ning millistes munasarja folliikulites *Ahr*-i ülesregulatsioon aset leiab, varasemad andmed puuduvad.

Käesoleva töö eesmärgiks oli välja selgitada, missugustes hiire munasarja folliikulites on *Ahr* PMSG mõjul ülesreguleeritud ning uurida, missuguste signaaliradade kaudu võiks hiire granuloosarakkudes olla vahendatud PMSG mõju *Ahr*-ile.

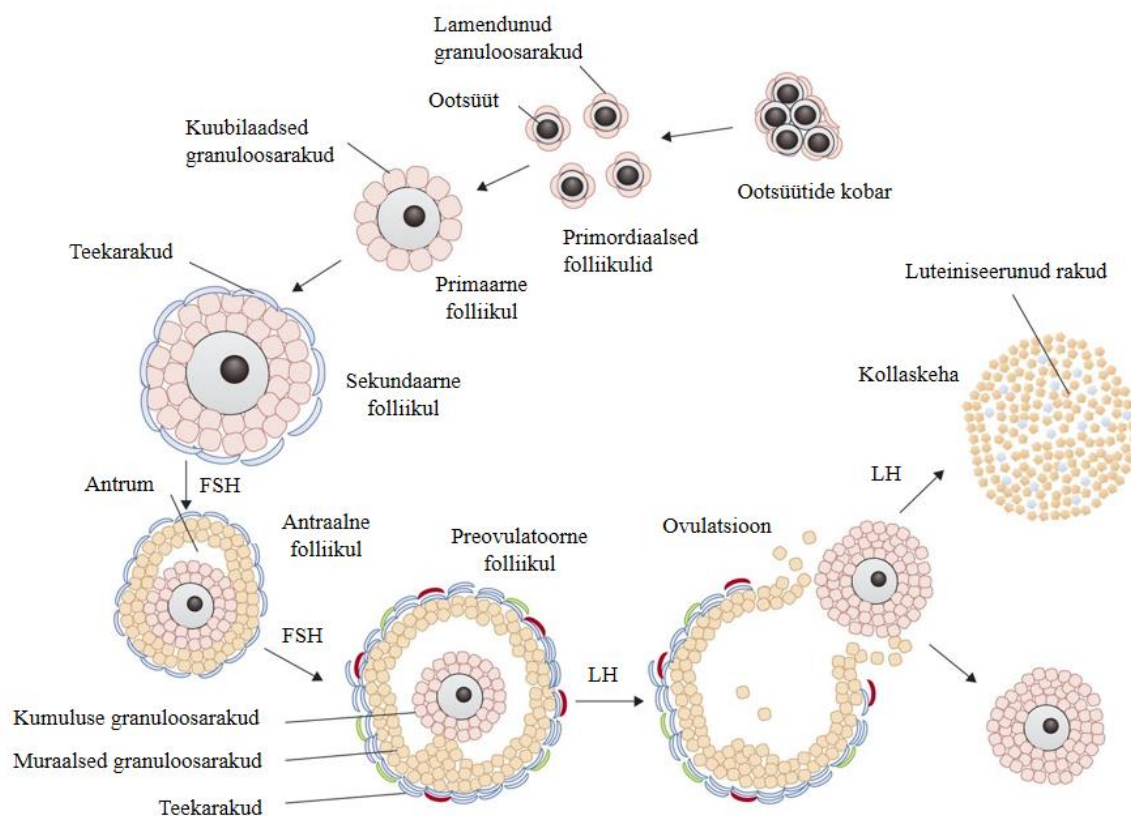
1. Kirjanduse ülevaade

1.1. Munasarja areng ning follikulogenees

Imetajate sugurakkude areng saab alguse väikesest eellasrakkude populatsioonist, mida nimetatakse primordiaalseks idutee rakkudeks. Hiire primordiaalse idutee rakkude areng algab 6,25 embrüonaalsel päeval (ingl. k. *embryonic day* – ED) epiblastis paiknevast pluripotentsest rakupopulatsioonist vastusena kasvufaktorile BMP4 (luu morfogeenne valk 4), mida sekreteeritakse läheduses paiknevast ekstraembrüonaalsest ektodermist (Lawson jt., 1999; Ohinata jt., 2005). Formeerunud primordiaalsed idutee rakud migreeruvad ED 8,5 embrüonaalsesse endodermi, millest saab alguse tagasoole areng. Järgnevalt idutee rakud proliferuuvad ja migreeruvad ED 10,5–11,5 dorsaalselt piki tagasoole endodermi genitaalvalli suunas, kus vastavalt embrüo soole algab munasarjade või testiste areng (Tam ja Snow, 1981).

Emaste hiirte primordiaalsetest idutee rakkudest saavad genitaalvallis mitoosi käigus oogoonid, mis jäävad mittetäieliku tsütokineesi tõttu rakuliste sildadega omavahel ühendatuks (Pepling ja Spradling, 1998). Oogoonid sisenevad retinoolhappe toimel meioosi, mille käigus tekivad primaarsed ootsüütid (Bowles jt., 2006). Umbes kaks kolmandikku primaarsetest ootsüütidest lähevad apoptoosi ning allesjäänud ootsüüdid arestitakse 17,5 ED meioosi esimeses diploteenis. Granuloosarakkude eellased ühinevad enne sündi oogoonide kobaraga ning osalevad rakuvaheliste ühenduste lagundamises ja sünnijärgses primordiaalsete folliikulite moodustamises (Pepling ja Spradling, 2001).

Folliikulid on munasarja peamised funktsionaalsed komponendid, mis koosnevad ootsüüdist ja seda ümbritsevast granuloosa- ning teekarakkude kihist. Follikulogeneesi käigus suurenevad ootsüüdid oma mõõtmetelt ning ootsüüti ümbritsevate somaatiliste rakkude arv kasvab. Seitsme päeva vanustel hiirtel on osad primordiaalsed folliikulid arenenud primaarseteks folliikuliteks, milles kuubilaadsed granuloosarakud ümbritsevad ootsüüti 1 – 2 kihina (Joonis 1). Kahe nädala vanustel hiirtel esinevad mõned sekundaarsed folliikulid, milles proliferuunud granuloosarakud katavad ootsüüti 2 – 3 kihina, mis on omakorda ümbritsetud teekarakkudega. Kolme kuni nelja nädala vanuste hiirte sekundaarsed folliikulid on ümbritsetud veel rohkemate granuloosarakukihtidega ning nende munasarjas on erinevates arengustaadiumites folliikuleid – primordiaalsetest preantraalseteni. Enne hiire suguküpsuse saavutamist ei arene munasarja folliikulid preantraalsest arengustaadiumist edasi (Peters, 1969).



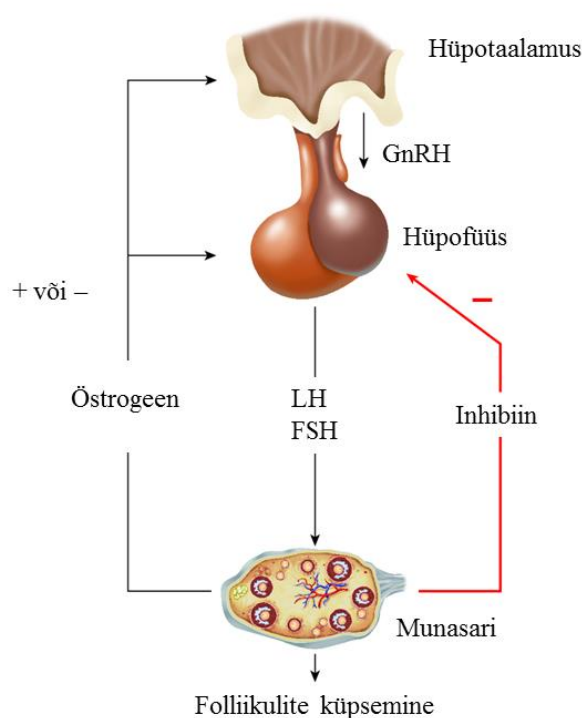
Joonis 1. Munasarja folliikulite arenguetapid. Kohandatud Georges jt. (2014) järgi.

Puberteedieas on antraalsete folliikulite väljakujunemises keskne roll folliikuleid stimuleerival hormoonil (FSH) (Kumar jt., 1997), mille toime avaldub granuloosarakkude pinnal paiknevatele FSH retseptoritele (FSHR) seondumisel (Richards ja Midgley, 1976). FSH toimel arenevad preantraalsetest folliikulitest preovulatoorsed ehk Graafi folliikulid, millele on iseloomulik folliikulisisese õõnsuse ehk antrumi olemasolu (Spears jt., 1998). Graafi folliikulites eristuvad muraalsete ja kumuluse granuloosarakkude populatsioonid, mis erinevad omavahel gonadotropiinidega interakteerumise poolest (Khamsi ja Roberge, 2001).

Kõikidest munasarja folliikulitest ovuleerub vaid väike protsent. Näiteks inimeste puhul on seitsmendal eluaastal munasarjades umbes 300 000 ootsüüti (Baker, 1963), millest elu jooksul ovuleerub ligikaudu 400 (Hardy jt., 2000). Ülejäänud folliikulid degenerereeruvad protsessi käigus, mida nimetatakse atreesiaks (Numazawa ja Kawashima, 1982). Pärast ootsüüdi ovuleerumist luteiniseeruva hormooni (LH) toimel areneb allesjäänud folliikulist kollaskeha (*corpus luteum*), mis hakkab tootma normaalse raseduse kujunemiseks vajalikku hormooni – progesterooni (Khan-Dawood jt., 1989; Plant ja Zeleznik, 2014). Täiskasvanud hiirte östraaltsükkel vältab 4 – 5 päeva, millest follikulaarne faas kestab 2 päeva ning luteaalne faas 2 – 3 päeva (Hau jt., 1994; Nelson jt., 1982).

1.2. Follikulogeneesi hormonaalne regulatsioon

Folliikulite areng munasarjas on mitmete steroidsete suguhormoonide (androgeenide ja östrogeenide) ning gonadotropiinide (FSH ja LH) poolt reguleeritud protsess. Puberteedieas aktiveerub hüpotaalamus-hüpofüüs-munasari telg ning selle tagajärjel toimuvad muutused hormonaalses aktiivsuses ja kujunevad välja sekundaarsed sootunnused (Peper jt., 2010). Hüpotaalamuses hakatakse tootma gonadotropiine vabastavat hormooni (GnRH), mis on üks peamisi steroidogeneesi regulaatoreid. GnRH mõjutab hüpofüüsi eessagaras olevaid rakke, mis omavad GnRH retseptoreid, ning seejärel hakatakse neis rakkudes sünteesima ja sekreteerima gonadotropiine (Rispoli ja Nett, 2005). GnRH süntees toimub hüpotaalamuses impulssidena – kõrgem GnRH impulsi sagedus kutsub esile LH sünteesi ning madalam indutseerib FSH tootmist (Jayes jt., 1997; Meredith jt., 1998) (Joonis 2).



Joonis 2. Hüpotaalamus-hüpofüüs-munasari telg. Kohandatud Hoffman jt. (2016) järgi.

FSH ja LH on munasarjas teineteist täiendava funktsiooniga gonadotropiinid. LH stimuleerib antraalsete folliikulite teekarakkudes androgeenide sünteesi, viimastest omakorda toodetakse granuloosarakkudes FSH toimel östrogeene, peamiselt östradiooli (Smyth jt., 1995). Varases folliikulite küpsemise faasis kontrollib madalas kontsentratsioonis östradiool läbi negatiivse tagasiside mehhanismi FSH ja LH sekretsiooni nii hüpotaalamuse kui ka hüpofüüsi kaudu (Shaw jt., 2010). Lisaks sellele reguleerib FSH sekretsiooni negatiivse tagasiside mehhanismiga inhibiitiin, mida toodetakse munasarja granuloosa- ja teekarakkudes (Hayes jt., 1998).

Folliikulite küpsemise käigus granuloosarakud prolifereeruvad ning seetõttu suureneb östradioli produktsioon. Rotis on näidatud, et kõrgema östradioli kontsentratsiooni juures suureneb hüpofüüsi eessagaras GnRH retseptoreid ekspresseerivate rakkude hulk, mis läbi on soodustatud aktiivsem gonadotropiinide sekretsioon, mis omakorda viib veelgi suuremas koguses östradioli tootmiseni (Quinones-Jenab jt., 1996). Sellise positiivse tagasiside mehhanismiga indutseeritakse järsk LH kontsentratsiooni tõus, mille lõpptulemuseks on munaraku ovulatsioon (Plant ja Zeleznik, 2014).

1.3. Gonadotropiinid ja nende retseptorid

FSH ning LH on glükoproteiinsed gonadotropiinid, mis koosnevad kahest erinevast subühikust – hüpofüüsi glükoproteiinide seas konserveerunud α -subühikust ning unikaalsest β -subühikust, mis määrab gonadotropiini seondumise spetsiifilisuse (NCBI). Gonadotropiinid avaldavad oma mõju läbi raku pinnal olevate retseptorite aktiveerimise (Pierce ja Parsons, 1981).

FSH ja LH retseptorid kuuluvad G-valguga seotud retseptorite perekonda. Mõlema retseptori aktiveerimiseks on vajalik ligandi seondumine retseptori ekstratsellulaarse leutsiinirikka domääniga N-terminuses (Braun jt., 1991). Ligandi seondumine oma retseptorile aktiveerib G-valgu, mis indutseerib adenülaattsüklaasi vahendusel tsükliilise adenosiinmonofosfaadi (cAMP) kontsentratsiooni tõusu ning selle tulemusena aktiveeritakse proteiinkinaas A (PKA) signaalirada (DeManno jt., 1999; Simoni jt., 1997). Gonadotropiinid aktiveerivad läbi oma retseptorite ka teisi signaaliradu. On näidatud, et FSH seondumine FSH retseptorile indutseerib ERK, p38 MAPK ja PI3K signaaliradade aktivatsiooni (Cottom jt., 2003; Gonzalez-Robayna jt., 2000; Maizels jt., 1998).

FSH olulisust munasarjas tõestab asjaolu, et emased FSH retseptori *knock-out* hiired on viljatud, nende munasarjad on tavapärasest väiksemad ning folliikulid ei arene preantraalsest staadiumist edasi (Abel jt., 2000). FSH retseptoreid ekspresseeritakse küpsevate folliikulite granuloosarakkude pinnal kõigis follikulogeneesi etappides. LH retseptoreid seevastu ekspresseeritakse nii teekarakkudes, preovulatoorsete folliikulite granuloosarakkudes, kollaskehas kui ka munasarja interstitsiaalses koes (Camp jt., 1991).

1.4. Kesksed signaalirajad munasarjas

Granuloosarakkude proliferatsiooni ning folliikulite küpsemise protsessiga kaasneb FSH mõjul paljude sihtmärkgeenide aktivatsioon (Escamilla-Hernandez jt., 2008). FSH-sõltuva signaliseerimise poolt tekitatud peamiseks rakusiseseks signaaliks on cAMP, mis aktiveerib

cAMP-sõltuvat PKA-d (Knecht ja Catt, 1982). PKA fosforüleerib rakkudes mitmeid substraate, näiteks cAMP vastuselemendiga seonduvat valku CREB (*cAMP response element binding protein*) (Delghandi jt., 2005) ja histooni H3 (DeManno jt., 1999).

PKA signaaliraja vajalikkust on näidatud mitmetes munasarja küpsemisega kaasnevates protsessides, sealhulgas granuloosarakkude proliferatsioonil ja diferentseerumisel (Han jt., 2013; Puri jt., 2016). On leitud, et PKA signaalirada on piisav enamike FSH poolt stimuleeritud granuloosarakkude diferentseerumisel vajalike geenide aktivatsiooniks, kuid aromataasi, LH retseptori ja mitmete muude FSH poolt indutseeritud geenide optimaalse ekspressiooni jaoks on viidatud ka teiste signaaliradade aktivatsiooni vajalikkusele (Escamilla-Hernandez jt., 2008). Näiteks on Zeleznik jt. (2003) näidanud, et FSH poolt indutseeritud aromataasi ja LH retseptori geenide transkriptsiooni aktiveerimiseks on vajalik PI3K/AKT (proteiinkinaas B) signaliseerimine.

Lisaks PKA signaalirajale peetakse munasarjas oluliseks ka proteiinkinaas C (PKC) signaalirada. Kuigi FSH ja LH mõjul ei indutseerita märkimisväärset PKC aktivatsiooni, on siiski PKC signaalirada vajalik folliikulite arenguks ning ovulatsiooni toimumiseks (Sriraman jt., 2008). Varasemad uuringud on näidanud, et PKC antagonisti toimel on küülikus ja rotis ovulatsiooni toimumine blokeeritud (Kaufman jt., 1992; Shimamoto jt., 1993). PKC olulisust munasarjas tõestab veelgi asjaolu, et selle signaaliraja blokeerimisel granuloosarakkudes *in vitro* inhibeeritakse ovulatsiooni toimumiseks kriitilise tähtsusega geeni *Ptgs2* ekspressiooni (Morris ja Richards, 1995). Lisaks sellele on PKC vajalik granuloosarakkudes mitmete LH poolt indutseeritud geenide – *Pgr* ja *Prkg2* – ekspressiooniks (Sriraman jt., 2003, 2006). Minegishi jt. (1997) on näidanud, et lühiajalisel FSH mõjul (6 tundi) represseeritakse roti granuloosarakkudes *in vitro* PKC signaaliraja kaudu *Fshr*-i ekspressiooni, kuid hormooni pikaajalisel mõjul (24 tundi) toimub läbi cAMP kaskaadi *Fshr*-i ülesregulatsioon.

1.5. Arüülsüivesinike retseptor

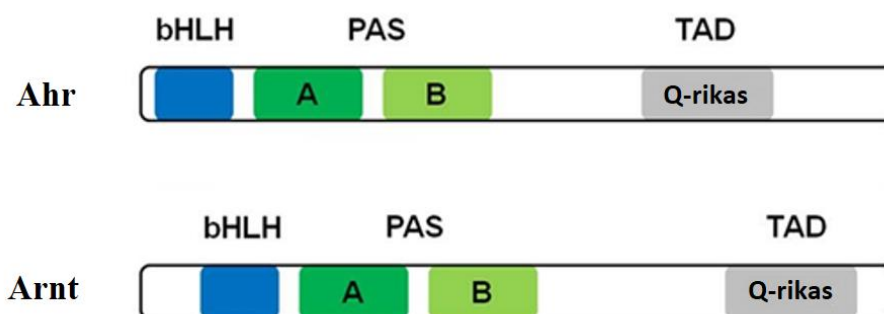
Arüülsüivesinike retseptor (AHR) on ligand-sõltuv transkriptsioonifaktor, mis on peamiselt tuntud keskkonnas levivate saasteainete (näiteks dioksiinide) metabolismi vahendajana. AHR-i ligandideks on mitmed halogeensed aromaatsed süivesinikud ning polütsükliilised aromaatsed süivesinikud, kuid esineb ka looduslikke ligande (Denison ja Heath-Pagliuso, 1998). Üheks uurituimaks AHR-i ligandiks on halogeenne aromaadne ühend TCDD ehk 2,3,7,8-tetraklorodibenso-*p*-dioksiin. Ligandi seondu misel AHR-iga indutseeritakse mitmete sihtmärkgeenide, sealhulgas ksenobiootikumide lagundamisel osalevate tsütokroom P450 perekonda kuuluvate geenide ekspressioon (Denison jt., 1988). Varasemalt on täheldatud, et

AHR-i signaalirada aktiveeritakse ka eksogeensete ligandide puudumisel, mis viitab AHR-i endogeensete ligandide olemasolule (Singh jt., 1996). Viimase 20 aasta jooksul on leitud, et AHR-i aktiveerivad mitmed endogeensed molekulid, näiteks indigo, indirubiin, künureniin, arahhidoonhappe metaboliit lipoksiin A₄, mitmed prostaglandiinid jne (Adachi jt., 2001; Mezrich jt., 2010; Schaldach jt., 1999; Seidel jt., 2001).

Peale AHR-i toksikoloogilise funktsiooni on täheldatud selle valgu olulisust mitmetes füsioloogilistes protsessides. Hiire embrüonaalse arengu käigus on *Ahr*-i ekspressioon ruumiliselt ja ajaliselt spetsiifiline ning seotud regioonidega, kus toimub kiire rakkude proliferatsioon ja diferentseerumine (Abbott jt., 1995). *Ahr*-i füsioloogilist olulisust on palju uuritud, kasutades *Ahr*-i *knock-out* hiiri (*AhrKO*). *AhrKO* hiirtel esineb mitmeid maksadefekte, samuti on nende maks keskmisest väiksema suurusega (Schmidt jt., 1996). Lisaks on *AhrKO* hiirtel täheldatud mitmeid immunoloogilisi defekte – nende põrnas on vähenenud B- ja T-lümfotsüütide arvukus (Fernandez-Salguero jt., 1997) ning nende naiivsed T-rakud pole reguleerivate T-rakkude genereerimisel niivõrd efektiivsed kui metsiktüüpi hiirtel (Kimura jt., 2008). Veel on näidatud AHR-i seost mitmete vähitüüpidega. Näiteks on inimese puhul AHR-i üleekspressiooni seostatud tumorigeneesiga rinnakasvaja (Yang jt., 2008) ning hepatotsellulaarse kartsinoomi kudedes (Liu jt., 2013).

1.6. AHR-i struktuur

Arüülsüivesinike retseptor on aluseline valk, mis kuulub heeliks-ling-heeliks (bHLH) Per-Arnt-Sim (PAS) tüüpi transkriptsioonifaktorite perekonda (Wu jt., 2013). Hiire *Ahr* on 95 kDa suurune valk, mis koosneb 848 aminohappe jäägist (Uniprot).

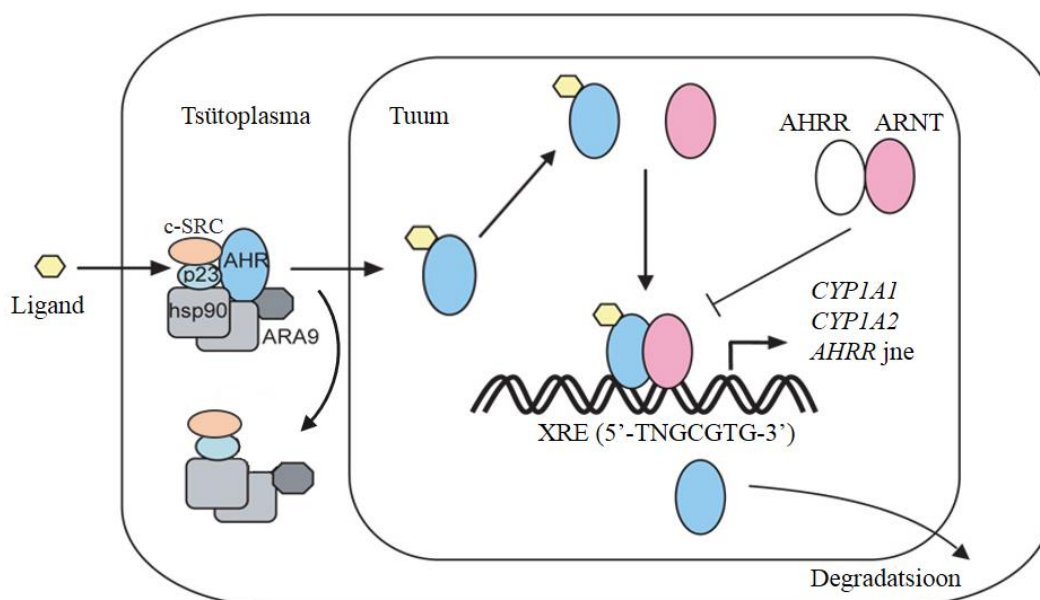


Joonis 3. Hiire *Ahr*-i ja *Arnt*-i valgu domääne struktuur. bHLH – aluseline heeliks-ling-heeliks domään; PAS – Per-Arnt-Sim domään; Q-rikas – glutamiinirikas regioon; TAD – transaktiivatsiooni domään. Kohandatud Wu jt. (2013) järgi.

AHR-i konserveerunud N-terminaalne bHLH domään on vajalik valk-valk interaktsioonide toimumiseks ning DNA-ga seondumiseks. Konserveerunud PAS domäänid (PAS-A ja PAS-B) osalevad AHR-i tuuma translokaatoriga (ARNT) heterodimerisatsioonil. PAS-B domään osaleb veel ka ligandiga seondumisel (Fukunaga jt., 1995). Ahr-i valgu C-terminaalne regioon on vajalik transaktivatsiooniks (Ramadoss ja Perdew, 2005) (Joonis 3).

1.7. AHR-i klassikaline signaalirada

Ligandita AHR paikneb tsütoplasmas ning on kompleksis erinevate *chaperon*-valkudega, mille hulka kuuluvad kaks HSP90 kuumašokivalku, *co-chaperon* p23, proteiinkinaas c-SRC ning XAP2 (tuntud ka kui ARA9 või AIP1) (Carver ja Bradfield, 1997; Denis jt., 1988; Enan ja Matsumura, 1996; Nair jt., 1996) (Joonis 4). AHR-i seondumisel ligandiga toimub AHR-i struktuuris konformatsiooniline muutus ning avaneb tuuma lokaliseerimise signaal (NLS) (Ikuta jt., 1998). Selle tulemusena vabaneb AHR-ligand kompleks *chaperon*-valkudest (Mimura ja Fujii-Kuriyama, 2003), liigub tuuma ning seondub seal ARNT-iga (Reyes jt., 1992). AHR-ARNT heterodimeer seondub tuumas ksenobiootilisele vastuselemendile (XRE) (nimetatakse ka dioksiini vastuselemendiks ehk DRE), tundes ära konsensusjärjestuse 5'-TNGCGTG-3', ning indutseerib seeläbi AHR-i sihtmärkgeenide ekspressiooni (Li jt., 2014). Üheks kõige paremini uuritud AHR-i sihtmärkgeeniks on tsütokroom P450 perekonda kuuluv geen *CYP1A1* (Israel ja Whitlock, 1984).



Joonis 4. AHR-i klassikaline signaalirada. Kohandatud Nguyen ja Bradfield (2008) järgi.

AHR-i sihtmärkgeenide hulka kuulub muuhulgas ka *AHRR* (arüülsüivesinike retseptori repressor). *AHRR* valk konkureerib AHR-iga, moodustades heterodimeeri ARNT-iga. Kui *AHRR*-ARNT kompleks on moodustunud, seondub see XRE järjestusele ja käitub transkriptsioonilise repressorina, inhibeerides AHR-i seondumist oma sihtmärkgeenide promootorjärjestusele (Mimura ja Fujii-Kuriyama, 2003; Mimura jt, 1999). Dimeriseerumata AHR eksporditakse tuumast ning lagundatakse proteasoomis (Davarinos ja Pollenz, 1999).

1.8. Ahr-i seos reproduktsiooniga

Ahr on tähtis nii follikulogeneesis, steroidogeneesis kui ka ovulatsiooni regulatsioonis. Hiirtel on täheldatud mitmeid reproduktiivseid häireid nii Ahr-i puudumisel kui ka Ahr-i signaaliraja aktivatsioonil TCDD mõjul (Hernández-Ochoa jt., 2009). Lisaks on Ahr-il tähtis roll ka munasarja folliikulite kasvu reguleerimises. Nimelt on *Ahr*KO hiirtel täheldatud väiksemat preantraalsete ja antraalsete folliikulite arvukust võrreldes metsiktüüpi (WT) hiirtega (Benedict jt., 2000). Samuti kasvavad *Ahr*KO hiirte munasarja folliikulid *in vitro* aeglasemalt vähenenud granuloosarakkude proliferatsiooni tõttu (Barnett jt, 2007b). Bussmann jt. (2006) on näidanud, et Ahr soodustab östrogenide koosmõjul roti granuloosarakkude proliferatsiooni, osaledes seeläbi folliikulite kasvu reguleerimises.

Eelnevad uuringud on näidanud, et *Ahr*KO ja WT hiired ei erine FSH ja LH taseme poolest, kuid *Ahr*KO hiirte munasarjas ekspresseeritakse *Fshr*-i ja *Lhcgr*-i (LH retseptor) madalamal tasemel kui WT hiirtes. Seetõttu on *Ahr*KO hiired vähem vastuvõtlikud gonadotropiinide toimele, mis viitab Ahr-i olulisusele gonadotropiinse vastuse reguleerimisel (Barnett jt., 2007a). Meie laboris on varem näidatud, et Ahr reguleerib *Fshr*-i ekspressiooni, seondudes selle geeni promootori *E-box* järjestusele (Teino jt., 2012). Ahr-i osalus FSH retseptori geeni ekspressiooni regulatsioonil tõestab veelgi Ahr-i olulisust folliikulite küpsemise protsessis.

Folliikulite küpsemise ja ovulatsiooni toimumise tagamiseks toodetakse munasarjas gonadotropiinide stimulatsiooni tulemusel steroidhormoone. Näiteks indutseeritakse FSH toimel granuloosarakkudes aromataasi geeni (*Cyp19a1*) ekspressioon, mis osaleb östradioli sünteesil (Whitelaw jt., 1992). Mitmed uuringud on viidanud sellele, et Ahr mõjutab antraalsetes folliikulites steroidhormoonide tootmise võimekust. Puberteediealistel *Ahr*KO hiirtel on täheldatud antraalsetes folliikulites vähenenud östradioli sünteesi võrreldes WT hiirtega (Barnett jt., 2007a). Baba jt. (2005) on hiire granuloosarakkudes näidanud, et Ahr aktiveerib *Cyp19a1* ekspressiooni, seondudes selle promootorile. Lisaks on leitud, et aktiveerides Ahr-i signaalirada TCDD toimel *in vitro* väheneb roti granuloosarakkudes FSH poolt indutseeritud aromataasi aktiivsus (Dasmahapatra jt, 2000). Kuna östradiol on

folliikulite küpsemisel oluliseks steroidhormooniks, siis läbi östradioli produktsiooni reguleerimise järeldeb ka *Ahr*-i keskne tähtsus follikulogeneesis.

1.9. *Ahr*-i ekspressiooni regulatsioon munasarjas

Leitud on mõningaid tõendeid selle kohta, et *Ahr*-i ekspressiooni reguleeritakse gonadotropiinide poolt. Näiteks on makaagi munasarja perioovulatoorsetes granuloosarakkudes nähtud LH analoogi hCG (inimese koorini gonadotropiin) manustamisel 12 tunni järgselt *Ahr*-i mRNA taseme tõusu (Chaffin jt., 1999). Samas on Chaffin jt. (2000) näidanud, et roti munasarjas toimub preovulatoorses faasis *Ahr*-i mRNA allaregulatsioon. Varasemalt on meie laboris leitud kinnitust, et hCG mõjul toimub ka hiire preovulatoorsetes granuloosarakkudes arüüsüsivesinike retseptori allaregulatsioon nii mRNA kui ka valgu tasemel (Teino jt., 2014).

Seni on vähe uuritud, kuidas reguleeritakse hiires *Ahr*-i ekspressiooni folliikulite küpsemise käigus *in vivo*. Uurimaks geeniekspressiooni folliikulite küpsemisel, kasutatakse tihti FSH-le analoogset hormooni PMSG (tiine mära seerumi gonadotropiin), millel esineb ka mõningane LH aktiivsus (Christakos ja Bahl, 1979). PMSG-d kasutatakse erinevates organismides superovulatsiooni ja folliikulite küpsemise esile kutsumiseks. Hiire puhul on teada, et 48 tunni jooksul PMSG manustamise järgselt kasvavad munasarja folliikulid preovulatoorse staadiumini (Baba jt., 2005).

Antti Matvere magistritöös selgus, et 48 tundi pärast hiirte süstimist PMSG-ga tõusis *Ahr*-i valgu tase granuloosarakkudes keskmiselt 7 korda ning mRNA tase 4 korda. Lisaks sellele näitasid *Ahr*-i valgu dünaamika katsed, et valgu taseme tõusu on märgata alates 24 tunnist pärast PMSG-ga süstimist, statistiliselt olulisel määral tõusis valgu tase 36 tundi pärast hormooni manustamist. Kuna *Ahr*-i valgu taseme tõus PMSG mõjul algab pigem hilises folliikulite küpsemise faasis, võib püstitada hüpoteesi, et *Ahr* on ülesreguleeritud suurtes folliikulites. Samuti võib oletada, et kuna *Ahr*-i ülesregulatsioon granuloosarakkudes on PMSG mõjul täheldatav alles 24 tunni möödudes, võib hormooni mõju *Ahr*-ile avalduda kaudsete signaaliradade kaudu.

Varasemalt on näidatud PKA osalust arüüsüsivesinike retseptori aktivatsiooni ja ekspressiooni regulatsioonis. Näiteks leidsid Oesch-Bartlomowicz jt. (2005), et PKA on oluline hiire hepatoomi rakuliinis *Ahr*-i signaaliraja endogeensel aktivatsioonil. Veelgi enam, Teino jt. (2014) on näidanud, et PKA signaalirada osaleb hiire preovulatoorsetes granuloosarakkudes hCG-toimelises *Ahr*-i allaregulatsioonis. Sarnaselt PKA signaalirajaga, on nähtud PKC osalust *Ahr*-i aktivatsioonil. Näiteks on Chen ja Tukey (1996) näidanud, et PKC aktiveerimisel tõuseb

Ahr-i sihtmärkgeeni *Cyp1a1* ekspressioon. Hiire embrüo fibroblastides on leitud tõestust, et PKC osaleb TCDD poolt indutseeritud Ahr-i sihtmärkgeeni *Cyp1b1* ekspressiooni positiivsel regulatsioonil läbi Ahr-i fosforüleerimise (Ikegwuonu jt., 1999). Kuna varasemalt pole PKC signaaliraja mõju *Ahr*-i ekspressioonile uuritud, seati üheks käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks leida selgust, kas PKC signaalirada võiks olla oluline *Ahr*-i ekspressiooni regulatsioonis hiire munasarja folliikulite küpsemisel.

Lähtudes teadmisest, et PKA ja PKC signaalirajad on munasarjas olulised ning neid radasid on varasemalt seostatud Ahr-iga, otsustati antud bakalaureusetöö raames uurida, kas Ahr-i ülesregulatsioon PMSG toimel võiks granuloosarakkudes aset leida PKA või PKC signaaliraja aktivatsiooni kaudu.

2. Eksperimentaalosa

2.1. Töö eesmärgid

1. Määrata kindlaks, missugustes hiire munasarja folliikulites on arüülsüivesinike retseptor PMSG toimel ülesreguleeritud pärast 48 tundi kestvat folliikulite küpsemise perioodi.
2. Uurida PKA ja PKC signaaliradade olulisust PMSG-toimelises Ahr-i ülesregulatsioonis hiire munasarja folliikulite küpsemise käigus.

2.2. Materjal ja metoodika

2.2.1. Rakud, söötmed, kemikaalid

Antud bakalaureusetöö raames kasutati 28 emast C57B1/6J hiirt ning 5 *Ahr*KO hiirt. Hiired saadi TÜ MRI vivaariumist (Tegevusluba KL1202, 10.01.2005). Katseid elusloomadega teostasid Sulev Kuuse, Indrek Teino ja Antti Matvere TÜ MRI vivaariumis. Loomkatsete läbiviimiseks väljastatud loa koopia on leitav bakalaureusetöö lisadest (Lisa 1). Eksperimentide tarbeks kasutati hiirte munasarju tervikuna või munasarjadest eraldatud primaarseid granuloosarakke. Rakke kasvatati DMEM/Ham's F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Ham's F-12) (Lonza) söötmes koekultuuri tassidel 5% CO₂ kontsentratsioonil 37 °C juures. Töös kasutati kemikaale forskoliin (Tocris Bioscience) ja forboolmüristaatatsetaat (PMA) (Santa Cruz Biotechnology).

2.2.2. Primaarsete granuloosarakkude eraldamine

21 – 23 päeva vanuseid immatuurseid emaseid hiiri süstiti superovulatsiooni esilekutsumiseks 5 RÜ (rahvusvaheline ühik) PMSG-ga (Folligon, Intervet). PMSG mõjul kutsutakse hiire munasarjades esile aktiivne folliikulite kasv ning tänu sellele on preovulatoorses faasis palju küpseid folliikuleid. Vastavalt katse ülesehitusele hukati hiired tservikaalset dislokatsiooni kasutades kas 24 või 48 tundi pärast hormooniga süstimist. 21 – 23 päeva vanuseid kontrollhiiri ning *Ahr*KO hiiri enne hukkamist hormooniga ei süstitud. Hiirtest eraldati munasarjad ning asetati lahusesse A (DMEM/Ham's F-12; 0,2% BSA; 10 mM Hepes pH 7,9). Munasarjad puhastati valgusmikroskoopi ja pintsette kasutades ümbritsevast sidekoest ja tõsteti hüpertoonilisse lahusesse B (DMEM/Ham's F-12; 0,5 M sahharoos; 10 mM EGTA) ning inkubeeriti kuni 10 minutit 37 °C juures. Järgnevalt pesti munasarju 1 kord lahusega A. Munasarjad asetati koekultuuri tassidele umbes 200 µl lahusesse A ning punkteeriti

valgusmikroskoobi all 26G nõelaga. Rakud koguti kokku lahuses A ja tsentrifugeeriti 300 g juures 5 minutit. Supernatant eemaldati ning rakud resuspendeeriti üles DMEM Ham's F-12 söötmes, mis sisaldas 2,5% FBS-i (veise loote seerum). *In vitro* katseteks külvati granuloosarakud koekultuuri tassile, mida oli eelnevalt inkubeeritud 1 tund 1 µg/cm² fibronektiiniga (Corning) 37 °C juures. Vältimaks seerumist tingitud mõjutusi, vahetati pärast rakkude koekultuuri tassile kinnitumist seerumiga sööde seerumivaba söötme vastu.

2.2.3. RNA eraldamine

RNA eraldamiseks *in vivo* katsetes võeti primaarsete granuloosarakkude eraldamisel saadud materjalist 10 % eraldi 1,5 ml tuubi. Rakke tsentrifugeeriti 300 g juures 5 minutit, eemaldati supernatant ning suspendeeriti lüüsilahuses. RNA eraldamiseks *in vitro* katsetes kasvatati rakke koekultuuri tassil ning töödeldi neid 10 µM forskoliini (PKA aktivaator) või 20 µM PMA-ga (PKC aktivaator). Erinevates ajapunktides, vastavalt katseskeemile, aspireeriti rakkudest sööde, pesti 2 korda PBS-iga ning seejärel rakud lüüsi. Lüsaadid koguti 1,5 ml tuubidesse ning jätkati kohe RNA eraldamisega või säilitati edasiseks kasutamiseks -80 °C juures.

Rakkude lüüsimiseks ja RNA eraldamiseks kasutati Blood/Cultured Cell Total RNA Purification Kit-i (Favorgen). RNA eraldati vastavalt tootja protokollile. Saadud totaalne RNA elueeriti 30 µl nukleasivabas vees ning RNA kontsentratsioon mõõdeti, kasutades spektrofotomeetrit NanoDrop ND-100 (Thermo Scientific). Selleks, et olla kindel, et qPCR-i käigus nähtav amplifikatsioon ei tulene genoomse DNA saastusest, teostati RNA-le DNAasi I (Thermo Scientific) töötlus, järgides tootja protokollile. DNAasi töötluste läbiviimiseks kasutati 2720 Thermal Cycler PCR masinat (Applied Biosystems).

2.2.4. cDNA süntees

Pöördtranskriptsiooniks kasutati 200 – 1000 ng granuloosarakkudest eraldatud ja DNAasiga töödeldud RNA-d ning RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit'i (Thermo Scientific). cDNA süntees viidi läbi vastavalt tootja protokollile lõppmahus 20 µl ning selleks kasutati 2720 Thermal Cycler PCR masinat. Pöördtranskriptsiooni teostamiseks kasutati järgnevat programmi:

Tabel 1. Pöördtranskriptsiooni programm

	Temperatuur	Aeg
Aktivatsioon	25 °C	10 min
Süntees	42 °C	60 min
Inaktivatsioon	70 °C	10 min

Saadud cDNA-d hoiustati -20 °C juures või lahjendati kohe qPCR läbiviimiseks vajalikus koguses nukleasivabas vees.

2.2.5. qPCR

Kvantitatiivse polümeraasi ahelreaktsiooni ehk qPCR tarbeks kasutati LightCycler® 480 II (Roche) masinat ning reaktsioonid viidi läbi 384-kannu plaatidel (Bioplastics). Relatiivsed ekspresioonitasemed mõõdeti triplikaatidena ning tulemuste analüüsimisel on võetud arvesse nende keskmisi. Reaktsioonisegu lõppmahus 10 µl sisaldas 5 µl 2X Maxima® SYBR Green/ROX qPCR Master Mix-i (Thermo Scientific), 0,5 µl 10 µM *forward* praimerit, 0,5 µl 10 µM *reverse* praimerit ning 4 µl cDNA-d. qPCR-i teostamiseks kasutati järgnevat programmi:

Tabel 2. qPCR-i programm

	Temperatuur	Aeg	Tsüklite arv
Algne denaturatsioon	95 °C	10 min	1
Denaturatsioon	95 °C	15 sek	40
Praimerite seondumine ja süntees	60 °C	60 sek	
Lõplik ekstentsioon	72 °C	5 min	1
Sulamiskõver	45 – 95 °C	7 min	1

Katsete tulemused normaliseeriti koduhoidja geeni *Tbp* väärtustega. Kõik lävitsüklid (Ct – *cycle threshold*) arvutas LightCycler® 480 II tarkvara automaatselt. Selleks, et tuvastada võimalike lisaproductide esinemist, kasutati sulamikõvera analüüsi. Relatiivsed geeniekspressiooni tasemed arvutati, kasutades Livaki meetodit (Livak ja Schmittgen, 2001).

Tabel 3. qPCR-is kasutatud oligonukleotiidid

Praimer (F – <i>forward</i> / R – <i>reverse</i>)	Järjestus
Ahr_mRNA_F	5'-GGCCAAGAGCTTCTTTGATG-3'
Ahr_mRNA_R	5'-TGCCAGTCTCTGATTTGTGC-3'
Ahr_pre-mRNA_E1-I1_F	5'-CAAGCCGGTGCAGAAAAC-3'
Ahr_pre-mRNA_E1-I1_R	5'-CATTGGTTGAGACTCAGCTCC-3'
Fshr_mRNA_F	5'-GCGGCAAACCTCTGAACTTC-3'
Fshr_mRNA_R	5'-TGATCCCCAGGCTGAGTCAT-3'
Cyp19a1_mRNA_F	5'-GCCTCCTTCTCCTGATTTGGA-3'
Cyp19a1_mRNA_R	5'-CTGCCATGGGAAATGAGGG-3'
Lhcgr_mRNA_F	5'-AGTCACAGCTGCACTCTCC-3'
Lhcgr_mRNA_R	5'-GTGAGAGATAGTCGGGCGAG-3'
Tbp_mRNA_F	5'-GGCCTCTCAGAAGCATCACT-3'
Tbp_mRNA_R	5'-GCCAAGCCCTGAGCATAA-3'

2.2.6. Genotüpeerimine

Hiirte genotüübi määramiseks kasutatud saba koematerjal saadi TÜ MRI vivaariumist. 2 mm suuruseid sabatükke lüüsi 50 µl lüüsilahuses (25 mM NaOH pH 12,0 ja 0,2 mM EDTA) 30 minutit 96 °C juures. Pärast proovide jahutamist lisati pH neutraliseerimiseks 50 µl 40 mM Tris-HCl pH 5,0. Eraldatud DNA-d kasutati polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR) läbiviimiseks. PCR reaktsioonisegu lõppmahus 10 µl sisaldas järgmised komponente: 2 µl 5X FIREPol Master Mix Ready to Load (Solis BioDyne), 2 µl DNA-d, 0,2 µM praimereid ning vajalikus koguses Milli-Q vett. PCR viidi läbi, kasutades masinat 2720 Thermal Cycler PCR (Applied Biosystems).

Amplifitseeritud genoomse DNA produktide suurus määrati agarosgeelelektroforeesil. Proovid lisati 2% TAE (Tris-atsetaat-EDTA) agarosgeelile, millesse oli eelnevalt lisatud etiidiumbromiidi (0,7 µg/ml) ning geelelektroforees viidi läbi 100 V juures 1,5 tunni kestel Owl™ EasyCast™ B2 Mini Gel Electrophoresis masinaga (Thermo Fisher). Pikkusmarkerina kasutati reagenti 100 bp DNA Ladder Ready to Load (Solis BioDyne). Hiirte genotüübi määramisel võeti aluseks teadmist, et WT hiirtele omased produktid olid 106 aluspaari, *Ahr*KO hiirtel 180 aluspaari pikkused.

Tabel 4. PCR-is kasutatud oligonukleotiidid

Praimer (F – <i>forward</i> / R – <i>reverse</i>)	Järjestus
OL4062_F	5'-GTCACTCAGCATTACACTTTCTA-3'
OL4064_F	5'-CAGTGGGAATAAGGCAAGAGTGA-3'
OL4088_R	5'-GGTACAAGTGCACATGCCTGC-3'

Tabel 5. PCR-i programm

	Temperatuur	Aeg	Tsükli arv
Algne denaturatsioon	95 °C	5 min	1
Denaturatsioon	95 °C	30 sek	30
Praimerite seandumine ja süntees	58 °C	1 min	
Elongatsioon	72 °C	1 min	
Lõplik elongatsioon	72 °C	2 min	1

2.2.7. Koelõikude valmistamine

Koelõikude valmistamiseks eraldati hiirtest eelnevalt kirjeldatud viisil munasarjad, asetati spetsiaalsesse vormi ning sisestati OCT geeli (*optimal cutting temperature compound*) (Sakura Finetek) vedela lämmastikuga külmutades. Saadud plokkidest lõigati krüomikrotoomiga Reichert-Jung Cryocut 1800 -20 °C juures 7 µm paksused koelõigud, mis asetati alusklaasile (Knittel Glass). Plokkide lõikamisalusele kinnitamiseks kasutati OCT geeli. Saadud koelõike kuivatati õhu käes 1 tund toatemperatuuril ning seejärel hoiustati -20 °C juures edaspidiseks kasutamiseks.

2.2.8. Immunofluorestsents

Immunofluorestsentsanalüüsiks (IF) kasutati kas eelnevalt valmistatud munasarja koelõike või hiire munasarjadest eraldatud primaarseid granuloosarakke. Munasarja koelõikudega IF katse läbiviimiseks fikseeriti proove 10 minutit 4 % PFA-ga (paraformaldehüüd). Sellele järgnes kaks pesu PBS-iga 3 minutit. Seejärel permeabiliseeriti koelõike 0,1% Triton X-100-ga PBS-is 10 minutit. Koelõike pesti taas PBS-iga 2 korda 3 minutit. Vältimaks immunoglobuliini mittespetsiifilist seandumist, blokeeriti koelõike ühe tunni kestel niisutuskambris 4% NGS-iga (tavaline kitse seerum) PBS-is. Pärast blokeerimist inkubeeriti koelõike niisutuskambris blokkpuhvril valmistatud primaarse antikehaga üleöö 4 °C juures. Seejärel teostati pesu PBS-iga 3 korda 5 minutit, misjärel inkubeeriti koelõike blokkpuhvril valmistatud sekundaarse

antikehaga 30 minutit pimedas. Järgmisena pesti koelõike 3 korda 5 minutit PBS-iga. DNA visualiseerimiseks töödeldi koelõike reagentiga DAPI (Sigma-Aldrich) lahjendatuna PBS-is (lõppkontsentratsioon 1 µg/ml) 10 minutit pimedas. Järgnes 1 pesu PBS-iga 5 minutit. Koelõigud sulundati sulundamisgeeliga FluorSave™ Reagent (Calbiochem), kaeti katteklaasiga ning lasti kuivada pimedas 4 °C juures ühe ööpäeva kestel.

Primaarsete granuloosarakkudega IF eksperimendi läbiviimiseks aspireeriti rakkudelt sööde ning rakke fikseeriti 15 minutit 4 % PFA-ga. Järgnes kolm 5-minutilist pesu PBS-iga, misjärel inkubeeriti rakke ühe tunni kestel blokkpuhvril (5% NGS, 0,3% Triton X-100 PBS-is). Järgmisena inkubeeriti rakke antikeha puhvril (1% BSA – veise seerumi albumiin, 0,3% Triton X-100 PBS-is) valmistatud primaarse antikehaga üleöö 4 °C juures. Seejärel pesti rakke 3 korda 5 minutit PBS-iga. Järgnevalt inkubeeriti rakke antikeha puhvril valmistatud sekundaarse antikehaga 1 tund pimedas. Rakke pesti taas 3 korda 5 minutit PBS-iga, seejärel töödeldi 10 minuti jooksul DAPI-ga ning rakkudega klaasid sulundati alusklaasile. Töödeldud koelõike vaadeldi fluorestsentsmikroskoobiga Olympus IX81 ja pildistamiseks kasutati kaamerat Andor Zyla 4.2 PLUS sCMOS. Fotosid töödeldi arvutiprogrammiga Imaris.

Kasutatud antikehad:

1. Primaarne antikeha – hiire Ahr-i vastane küüliku polükloonaalne IgG SA-210, lõppkontsentratsioonis 2 µg/ml (Enzo Life Sciences)
2. Primaarne antikeha – hiire Ahr-i vastane küüliku polükloonaalne IgG H-211, lõppkontsentratsioonis 2 µg/ml (Santa Cruz Biotechnology)
3. Primaarne antikeha – hiire p-CREB-i vastane küüliku monokloonaalne IgG, lahjendatud 1:800 (Cell Signaling Technology)
4. Sekundaarne antikeha – Alexa Fluor 488 kitse küülikuvastane IgG, lõppkontsentratsioonis 2 µg/ml (Invitrogen)
5. Isotüübi kontroll – küüliku polükloonaalne IgG, lõppkontsentratsioonis 2 µg/ml (Abcam)

2.2.9. SDS-PAGE ja Western blot

In vivo katsetes tseentrifuugiti rakke 5 minutit 300 g juures, seejärel aspireeriti sööde ning rakud lüüsi 40 µl RIPA puhvril (50 mM Tris pH 7,4; 1% Triton X-100; 1 mM EDTA; 150 mM NaCl; 0,1% SDS). *In vitro* katsetes pesti rakke üks kord jääkülma PBS-iga, seejärel lüüsi rakud koekultuuri tassil 100 µl RIPA puhvril ning lüsaadid koguti kraabitsaga kokku. Lüsaate hoiti 45 minutit jääal aeg-ajalt segades. Seejärel tseentrifuugiti valgulüsaate 10 000 g juures 10 minutit, koguti supernatant ning mõõdeti valgu kontsentratsioonid 562 nm lainepikkuse juures, kasutades Pierce™ BCA valgu kontsentratsiooni mõõtmise komplekti (Thermo Scientific) ja Multiskan Ascent mikroplaadi lugejat (Thermo Scientific).

Valgulüsaatidele lisati 100 μ M DTT (PanReac AppliChem). Lüsaate kuumutati 1X Protein loading puhvris (Thermo Scientific) 95 °C juures 5 minutit. Valgud lahutati 10 % SDS-polüakrüülamiid geelelektroforeesil Mini-PROTEAN® Tetra Cell masinas (Bio-Rad) 45 minutit 50 V juures ning 1 tund 170 V juures. Suurusmarkerina kasutati Page Ruler™ markerit (Thermo Scientific). Elektroforeesi lõppedes asetati geel ja eelnevalt metanooli kastetud polüvinülideen difluoriid (PVDF) membraan ülekandepuhvrise (192 mM glütsiin; 0,1% SDS; 25 mM Tris-HCl pH 8,3; 10% metanool) 5 minutiks. Valgud kanti geelilt PVDF membraanile 15 V juures 17 minuti jooksul, kasutades masinat Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad). Pärast ülekannet loputati membraan TBST-s (0,1% Tween 20; 0,15 M NaCl, 50 mM Tris, pH 7,5) ning seejärel blokeeriti membraani ebaspetsiifilise seondumise vähendamiseks 1 tund TBST lahuses, mis sisaldas 5% lõssipulbrit (Applichem). Järgnevalt inkubeeriti membraani üleöö vastavalt Ahr-i, p-CREB-i või aktiini vastase primaarse antikehaga blokkpuhvrise. Järgmisel päeval pesti membraani 4 korda 7 minutit TBST-s ning seejärel inkubeeriti sekundaarse antikehaga 1 tund. Pärast seda pesti membraani taas 4 korda 7 minutit TBST-s. Seejärel membraan kuivatati, kaeti Immobilon Western Chemiluminescent HRP substraadiga (Merck Millipore) ning inkubeeriti 5 minutit. Signaal detekteeriti röntgenfilmil (Agfa), mis kasteti ilmutuslahusesse ning seejärel kinnituslahusesse (Agfa). Densitomeetiline analüüs teostati programmiga ImageJ.

Kasutatud antikehad:

1. Primaarne antikeha – hiire Ahr-i vastane küüliku polükloonaalne IgG SA-210, lõppkontsentratsioon 0,17 μ g/ml (Enzo Life Sciences)
2. Primaarne antikeha - aktiini vastane küüliku polükloonaalne IgG, lõppkontsentratsioon 0,06 μ g/ml (Santa Cruz Biotechnology)
3. Primaarne antikeha – hiire p-CREB-i vastane küüliku monokloonaalne IgG, lahjendatud 1:1000 (Cell Signaling Technology)
4. Sekundaarne antikeha – mädarõika peroksüdaasiga konjugeeritud küülikuvastane kitse antikeha, lõppkontsentratsioon 0,12 μ g/ml (Santa Cruz Biotechnology)

2.2.10. Andmete statistiline analüüs

Käesolevas bakalaureusetöös sooritati katsed ühes kuni kolmes korduses ning saadud tulemused on esitatud korduste keskmistena koos veapiiridega. Veapiiridena kasutati standardvea (SEM) väärtusi. Statistilise olulisuse määramisel kasutati MS Exceli kahepoolset Studenti t-testi ning statistiliselt oluliseks p-väärtuseks loeti $p < 0,05$.

2.3. Tulemused

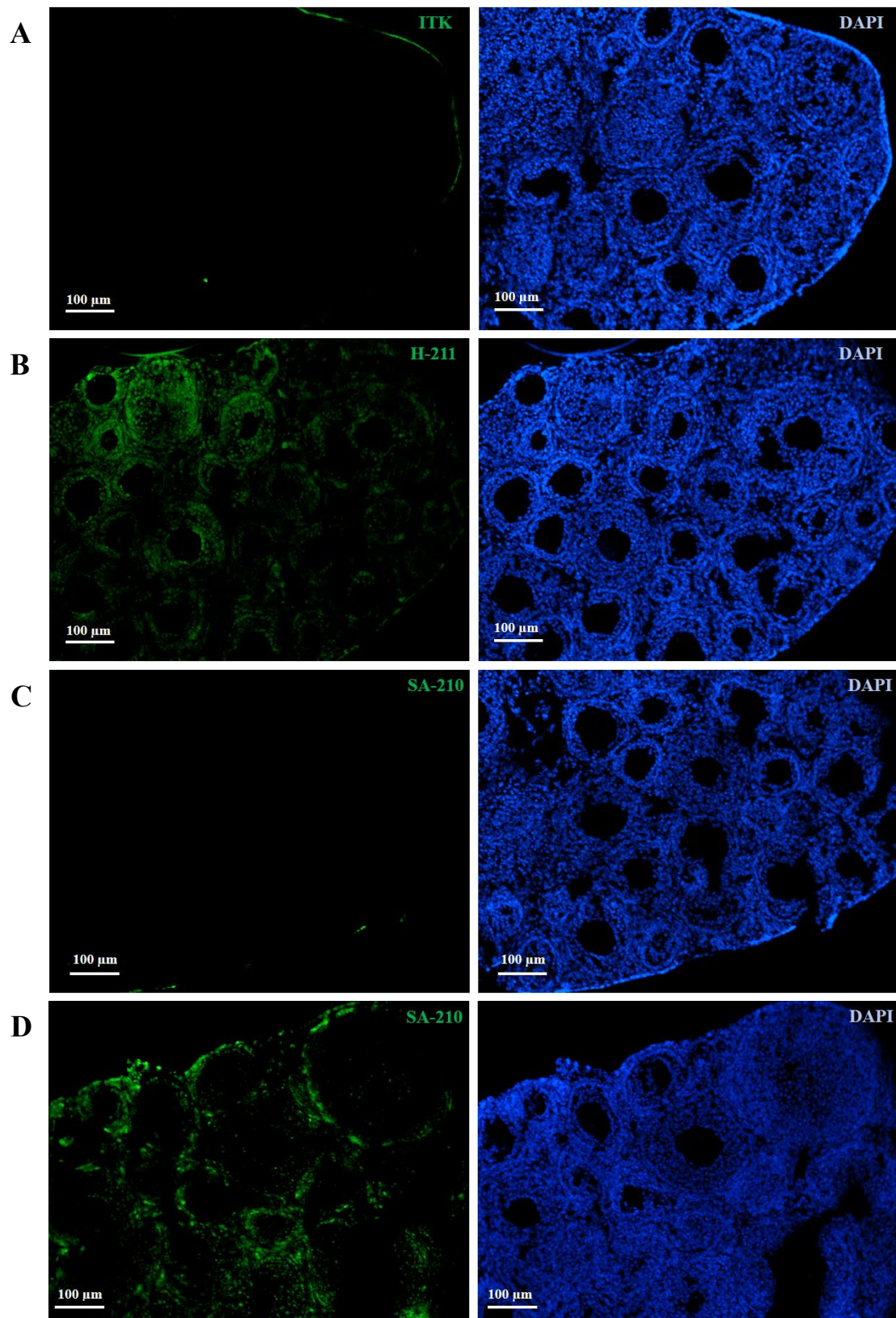
2.3.1. Ahr-i vastaste antikehade spetsiifilisuse kontrollimine

Varasemalt on meie laboris hiire granuloosarakkudes märgatud Ahr-i valgu taseme tõusu alates 24 tunnist pärast hiirte süstimist PMSG-ga, mis 48 tundi kestval hormooni mõjul tõuseb 7-kordsele tasemele (Antti Matvere magistritöö). PMSG mõju 48 tunni jooksul mimikeerib immatuurses hiires östraaltsükli folliikulaarset faasi. Kuna Ahr-i ülesregulatsioon toimub pigem hilises folliikulite küpsemise faasis, püstitati hüpotees, et arüüsüsivesinike retseptor võib valgu tasemel olla ülesreguleeritud suurtes antraalsetes folliikulites.

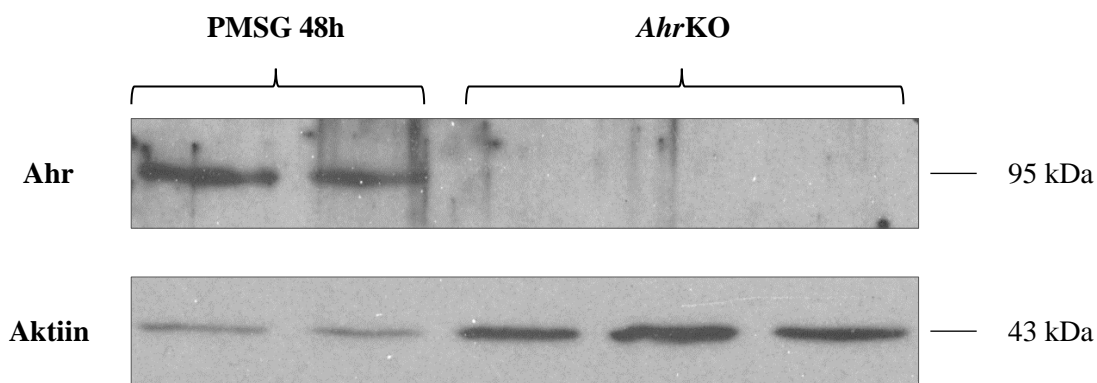
Esmalt otsustati testida hiire Ahr-i vastaste primaarsete antikehade spetsiifilisust. Selleks viidi läbi immunofluorestsentsi (IF) katse 21 – 23 päeva vanuste immatuursete *Ahr*KO hiirte munasarja koelõikudega. Positiivse kontrollina kasutati samas vanuses WT hiire munasarja koelõike. *Ahr*KO hiired valiti välja genotüpiseerimisel saadud andmete alusel. Eksperimendi teostamiseks hiired hukati, nende munasarjad eemaldati ja puhastati sidekoest, sisestati OCT geeli ja külmutati. Saadud plokkidest lõigati krüomikrotoomi abil 7 µm paksused koelõigud, mida kasutati IF analüüsil.

IF katse käigus testiti kahte hiire Ahr-i vastast küüliku polükloonaalset IgG-d – SA-210 ja H-211. Joonisel 5 on kujutatud fluorestsentsmikroskoobiga jäädvustatud fotod antikehadega töödeldud koelõikudest. Kõigi fotode kontrastsuse parameetrid on sätestatud isotüübi kontrolli järgi. IF eksperimendist selgus, et antikehaga SA-210 töödeldud positiivse kontrollina kasutatud WT hiire munasarja koelõigud olid värvunud. Lisaks nähti, et antikehaga SA-210 töödeldud *Ahr*KO munasarja koelõigud sarnanevad värvumise poolest isotüübi kontrolliga töödeldud koelõikudele, millest võib järeldada, et antikeha SA-210 on Ahr-i valgu suhtes spetsiifiline. Antikehaga H-211 detekteeriti ebaspetsiifilist signaali ning seetõttu otsustati seda edaspidistes katsetes mitte kasutada.

Kuna IF meetod pole nii tundlik kui *Western blot*, otsustati viimast meetodikat kasutada antikeha SA-210 valideerimiseks. Selleks eraldati granuloosarakud hormooniga mõjutamata *Ahr*KO hiirtest ja WT hiirtest, kes hukati 48 tundi pärast PMSG-ga süstimist. Rakud lüüsiiti ning saadud valgulüsaatidega teostati *Western blot* analüüs. Valgukoguste mõõtmiseks kasutati Ahr-i ja aktiini vastaseid antikehasid. Joonisel 6 on näha, et antikeha SA-210 ei detekteerinud *Ahr*KO hiirte granuloosarakkudes Ahr-i valgu olemasolu. Ootuspäraselt tuvastati Ahr-i valgu olemasolu PMSG-ga süstitud hiirte granuloosarakkudes. Saadud tulemus kinnitab antikeha SA-210 kasutamise sobilikkust edaspidisteks katseteks.



Joonis 5. Ahr-i vastaste primaarsete antikehade spetsiifilisuse kontrollimine. Fluorestsentsmikroskoobiga jäädvustatud fotode kontrastsuse paikasättimiseks kasutati isotüübi kontrolliga (ITK) (A) inkubeeritud *Ahr*KO hiire munasarja koelõike. Eksperimendi käigus töödeldi *Ahr*KO hiire munasarja koelõike kahe Ahr-i vastase primaarse antikehaga (roheline) – H-211 (B) ja SA-210 (C). Positiivse kontrollina kasutati WT hiire munasarja koelõike (D), mida töödeldi antikehaga SA-210. Rakutuomad värviti kõikidel koelõikudel reagendiga DAPI (sinine). Mõõtkava: 100 µm.



Joonis 6. Ahr-i vastase antikeha SA-210 spetsiifilisuse kontrollimine Western blot meetodil. Western blotil kasutati hormooniga mõjutamata *Ahr*KO hiirte ning PMSG-ga süstitud hiirte (hormooni mõju 48 tundi) granuloosarakkude valgulüsaate. Valkude tuvastamiseks kasutati hiire Ahr-i ja aktiini vastaseid antikehasid.

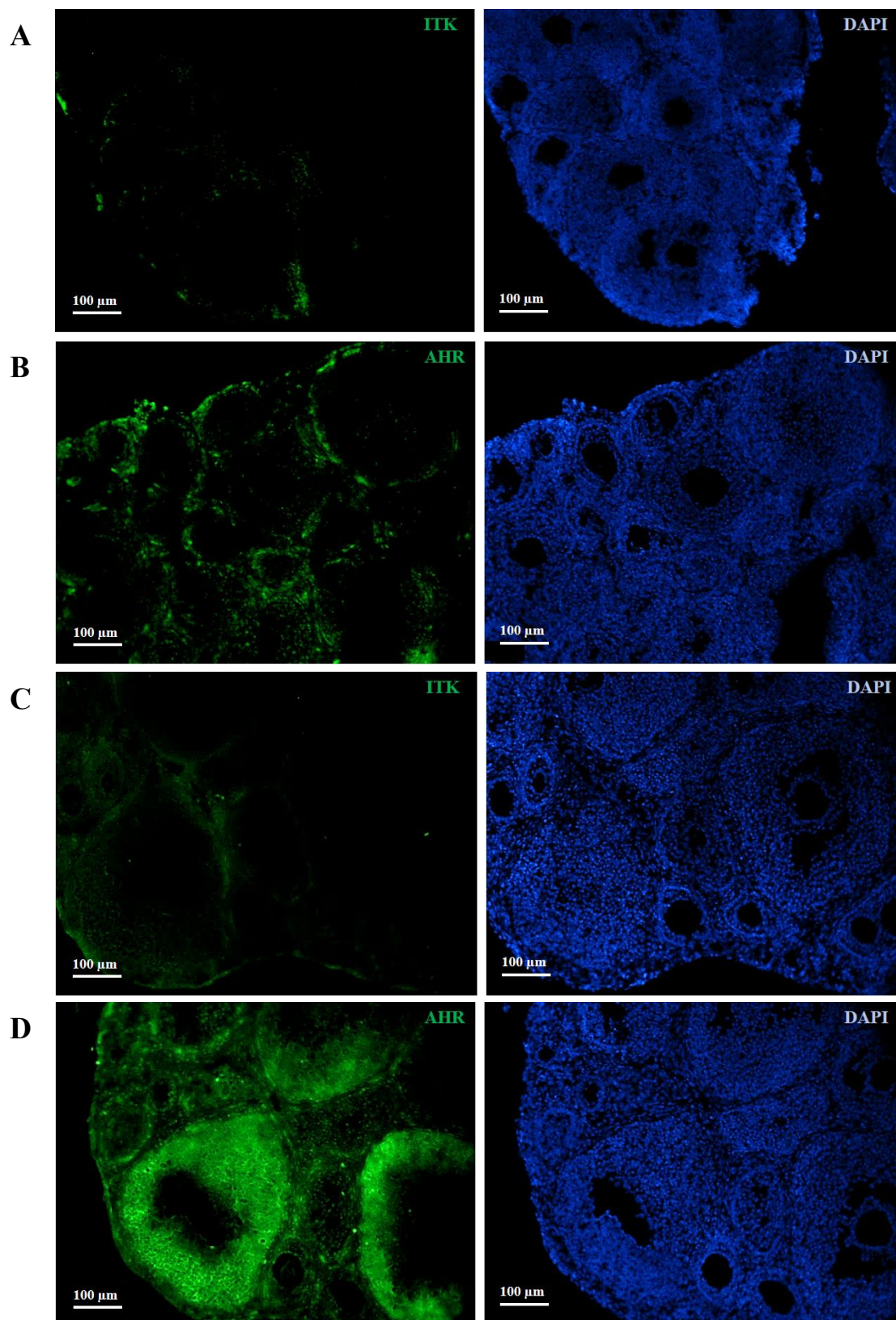
2.3.2. PMSG mõju Ahr-i valgu tasemele *in vivo*

Olles veendunud Ahr-i vastase primaarse antikeha spetsiifilisuses, viidi läbi IF analüüs, kontrollimaks varasemalt püstitud hüpoteesi, et Ahr on PMSG toimel ülesreguleeritud suurtes antraalsetes folliikulites. Eksperimendis kasutati 21 – 23 päeva vanuseid hiiri, kes hukati kohe või süstiti 5 RÜ PMSG-ga. 48 tundi hiljem hukati hormooniga süstitud hiired, eraldati munasarjad, valmistati koelõigud ning viidi läbi IF analüüs. Eksperimendi teostamiseks kasutati hiire Ahr-i vastast antikeha SA-210.

Joonisel 7 on kujutatud fluorestsentsmikroskoobiga jäädvustatud fotod töödeldud koelõikudest. Katse tulemusena selgus, et süstimata immatuurses hiires on Ahr valgu tasemel munasarjas vähesel määral tuvastatav. PMSG-ga süstitud hiirte munasarjade suurtes antraalsetes folliikulites täheldati Ahr-i valgu taseme tõusu. Ahr-i ülesregulatsiooni märgati seejuures muraalsetes, aga mitte kumuluse granuloosarakkudes. Saadud tulemus viitab sellele, et Ahr on oluline pigem munasarja folliikulite küpsemise hilisemas faasis.

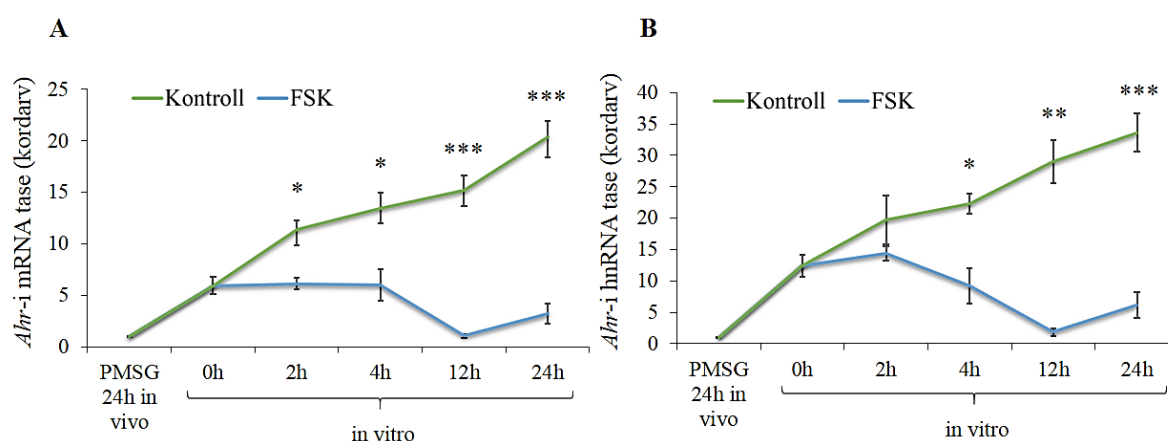
2.3.3. PKA signaaliraja mõju Ahr-i mRNA ekspressioonile *in vitro*

Jõudes järeldusele, et suurtes antraalsetes folliikulites toimub PMSG toimel Ahr-i ülesregulatsioon, tekkis huvi uurida, missuguse signaaliraja kaudu see võiks olla vahendatud. Varasemalt on meie laboris märgatud Ahr-i ülesregulatsiooni granuloosarakkudes alates 24 tunnist pärast hiirte süstimist PMSG-ga (Antti Matvere magistritöö). Sellest tulenevalt võib oletada, et hormooni toime Ahr-i tasemele on vahendatud läbi kaudsete signaaliradade. Kirjanduse andmetel on PKA signaalirada otsene FSH ja LH toime vahendaja ning seeläbi munasarjas üks olulisemaid signaaliradasid. Sel põhjusel otsustati kõigepealt uurida just PKA



Joonis 7. PMSG mõju Ahr-i valgu tasemele. Fluorestsentsmikroskoobiga jäädvustatud piltide kontrastsuse paikasättimiseks kasutati isotüübi kontrolliga (ITK) inkubeeritud süstimata hiire (A) ja PMSG-ga (48h) süstitud hiire (C) munasarja koelõike. Hiire Ahr-i vastase primaarse antikehaga SA-210 töödeldi nii süstimata (B) kui PMSG-ga süstitud (D) hiire munasarja koelõike. Rakutuumad värviti kõikidel koelõikudel reagentiga DAPI. Mõõtkava: 100 μm.

signaaliraja osalust *Ahr*-i ekspressiooni regulatsioonil. Eksperimendi läbiviimiseks hukati hiired 24 tundi pärast PMSG-ga süstimist ning eraldati primaarsed granuloosarakud, millest 10 % lüüsiiti *in vivo* kontrolliks. Ülejäänud rakud külvati koekultuuri tassile ning neil lasti kinnituda 2 – 3 tundi. Seejärel pesti rakud PBS-iga, ühes kannus olevad rakud lüüsiiti (0h ajapunkt) ning ülejäänud rakkudel vahetati seerumiga sööde seerumivaba söötme vastu, kuhu oli lisatud vastavalt katseskeemile PKA signaaliraja aktivaator forskoliin (10 μ M). Rakud lüüsiiti vastavalt 2, 4, 12 ja 24 tunni ajapunktides, misjärel eraldati totaalne RNA, mida töödeldi DNaaasiga. Järgnevalt viidi läbi cDNA süntees ning geeniekspressiooni analüüsiks teostati qPCR. *Ahr*-i suhtelise mRNA taseme määramiseks kasutati praimereid *Ahr_mRNA_F/R* (Tabel 3), mis seonduvad *Ahr*-i geeni esimese eksoni lõppu ja teise eksoni algusesse. *Ahr*-i hnRNA taseme mõõtmiseks kasutatud *forward* praimer (*Ahr_pre-mRNA_E1-I1_F*) seonduv esimese eksoni ja esimese introni piirile ning *reverse* praimer (*Ahr_pre-mRNA_E1-I1_R*) seonduv esimesele intronile. Kasutades *Ahr*-i hnRNA praimereid, saab määrata transkripti kogust enne RNA protsessimise toimumist. *Ahr*-i mRNA ja hnRNA tasemete normaliseerimiseks kasutati praimereid *Tbp_mRNA_F/R*.



Joonis 8. Forskoliini mõju *Ahr*-i mRNA ja hnRNA ekspressioonile *in vitro*. Primaarseid granuloosarakke, mis olid eraldatud PMSG-ga süstitud hiirtest (hormooni mõju 24 tundi), töödeldi 10 μ M forskoliiniga. Rakud lüüsiiti ajapunktides 0, 2, 4, 12 ja 24 tundi. Kontrolliks lüüsiiti ka osa *in vivo* rakkudest. *Ahr*-i mRNA (**A**) ja hnRNA (**B**) tasemed mõõdeti qPCR-i teel ning normaliseeriti *Tbp* suhtes. Tulemus põhineb kolmel iseseisval korduskatsel (* $p < 0,05$ vs. kontroll; ** $p < 0,01$ vs. kontroll; *** $p < 0,001$ vs. kontroll).

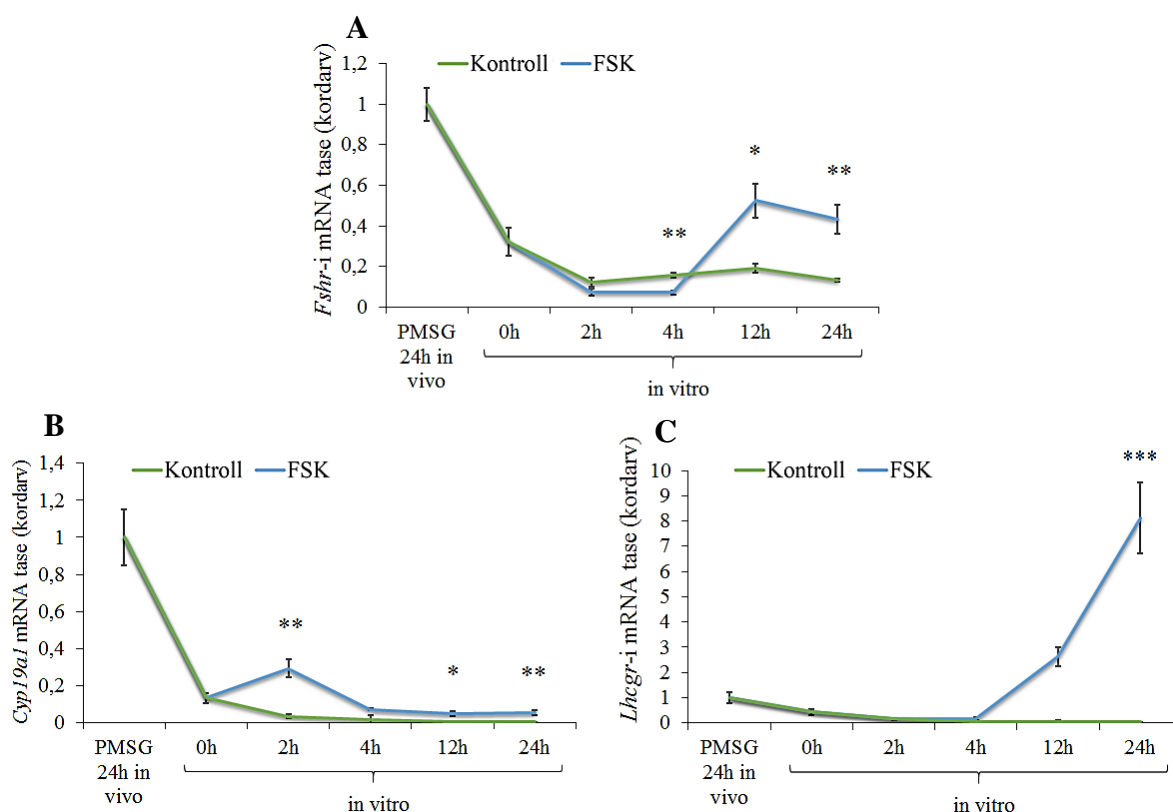
Katse tulemusena selgus, et forskoliini mõjul toimub juba 2 tunni möödudes statistiliselt olulisel määral *Ahr*-i mRNA allaregulatsioon (Joonis 8). 24 tundi pärast forskoliini lisamist täheldati *Ahr*-i mRNA taseme 6-kordset vähenemist võrreldes töötlemata rakkudega. Lisaks selgus antud eksperimendist, et forskoliini toimel väheneb *Ahr*-i hnRNA tase, millest võib järeldada, et forskoliini mõjul repressseeritakse *Ahr*-i ekspressiooni mRNA sünteesi aktiivsuse vähenemise kaudu. Veel täheldati selle eksperimendi käigus huvitaval kombel, et granuloosarakkude külvamisel koekultuuri tassile tõuseb *Ahr*-i ekspressioon forskoliiniga töötlemata rakkudes

märkimisväärselt. Efekt võiks olla seletatav PKA aktiivsuse vähenemisega, mis võib kaasned granuloosarakkude tassile külvamisega, mistõttu kaoks represseriv mõju *Ahr*-ile ja saaks toimuda *Ahr*-i ülesregulatsioon.

2.3.4. PKA signaaliraja mõju follikulogeneesi markergeenide ekspressioonile *in vitro*

Eelnevast katsest selgus, et aktiveerides PKA signaalirada forskoliini mõjul, toimub granuloosarakkudes *in vitro* *Ahr*-i allaregulatsioon. Kontrollimaks katse meetodilist korrektsust, otsustati uurida forskoliini mõju follikulogeneesi markergeenide ekspressioonile. *Fshr*, *Cyp19a1* ning *Lhcgr* on munasarjas keskse tähtsusega geenid, mille ekspressioon on sõltuv PKA aktivatsioonist. Seetõttu võimaldab nende geenide ekspressiooni uurimine kontrollida, kas forskoliini toime avaldub PKA signaliseerimise kaudu.

Eksperimendi läbiviimiseks järgiti sama katseskeemi, mida kasutati *Ahr*-i ekspressiooni uurimisel. qPCR-i käigus kasutati primereid *Fshr*_mRNA_F/R, *Cyp19a1*_mRNA_F/R ja *Lhcgr*_mRNA_F/R (Tabel 3). Geeniekspressiooni tasemete normaliseerimiseks kasutati primereid *Tbp*_mRNA_F/R.

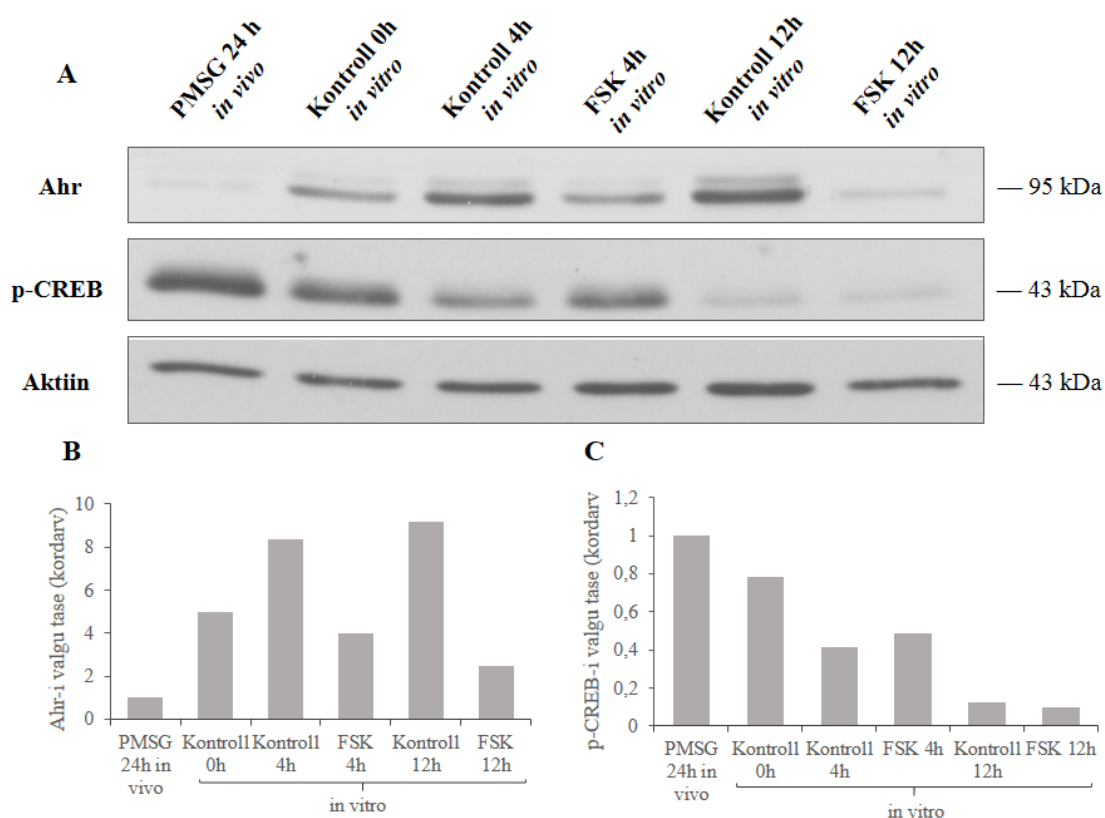


Joonis 9. Forskoliini mõju follikulogeneesi markergeenide ekspressioonile *in vitro*. Primaarseid granuloosarakke, mis olid eraldatud PMSG-ga süstitud hiirtest (hormooni mõju 24 tundi), töödeldi 10 μ M forskoliiniga. Rakud lüüsi ajapunktides 0, 2, 4, 12 ja 24 tundi. Kontrolliks lüüsi ka osa *in vivo* rakkudest. *Fshr*-i (A), *Cyp19a1* (B) ja *Lhcgr*-i (C) tasemed mõõdeti qPCR-i meetodil ning normaliseeriti *Tbp* suhtes. Tulemus põhineb kolmel iseseisval korduskatsel (* $p < 0,05$ vs. kontroll; ** $p < 0,01$ vs. kontroll; *** $p < 0,001$ vs. kontroll).

Katse tulemusena selgus, et forskoliini 24 tundi kestval toimel tõuseb kõikide uuritud follikulogeneesi markergeenide ekspressioon (Joonis 9). *Fshr*-i puhul täheldati forskoliini mõjul 4 tunni ajapunktis mRNA allaregulatsiooni, kuid 12 tunni möödudes märgati geeniekspressiooni suurenemist. *Cyp19a1* ülesregulatsiooni täheldati forskoliini toimel juba 2 tunni möödudes ning *Lhcgr*-i puhul 12 tundi pärast kemikaali lisamist. Forskoliiniga töötlemata rakkudes seevastu vähenes kõikide uuritud follikulogeneesi markergeenide ekspressioon. Saadud tulemus kinnitab, et varasemalt nähtud *Ahr*-i allaregulatsioon toimub läbi forskoliini poolt aktiveeritud PKA signaaliraja.

2.3.5. PKA signaaliraja mõju *Ahr*-i valgu tasemele *in vitro*

Seni oleme näinud, et PKA signaaliraja kaudu toimub granuloosarakkudes *Ahr*-i allaregulatsioon mRNA tasemel. Transkripti taseme määramine pole aga piisav, tegemaks järeldusi valgu taseme kohta, kuna valgu taset mõjutavad lisaks transkriptsiooni aktiivsusele mitmed post-transkriptsioonilised, translatsioonilised ja post-translatsioonilised protsessid. Seetõttu otsustati uurida *Ahr*-i valgu taset forskoliini mõjul *in vitro* immunofluorestsentsi ja *Western bloti* meetodil. Lisaks *Ahr*-i valgu tasemele mõõdeti p-CREB-i valgu tasemed. PKA

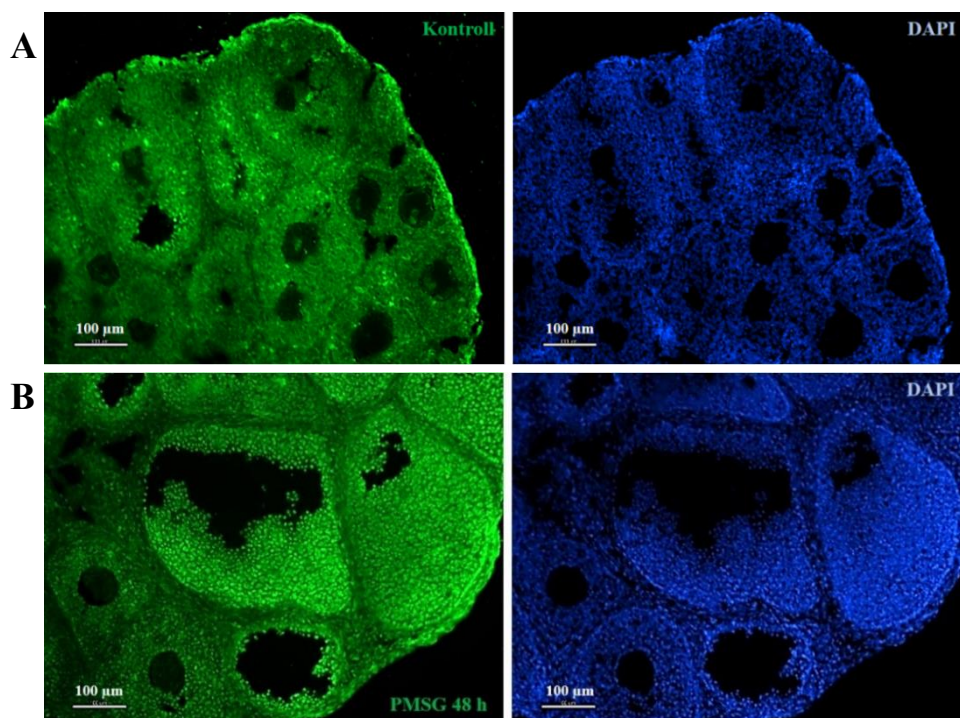


Joonis 10. PKA signaaliraja mõju *Ahr*-i ja p-CREB-i valgu tasemele *in vitro*. Eksperimendiks kasutati PMSG-ga süstitud hiirte (hormooni mõju 24 tundi) granuloosarakke, mida töödeldi 10 μ M forskoliiniga. Rakud lüüsiiti 0, 4 ja 12 tunni ajapunktides ning lüsaate kasutati *Western blotil* (A). Valkude koguste mõõtmiseks kasutati hiire *Ahr*-i ja p-CREB-i vastaseid antikehasid. Densitomeetria analüüsil mõõdeti *Ahr*-i (B) ja p-CREB-i (C) valgu tasemed. Tulemused põhinevad ühel katsel.

signaaliraja otseseks märklauaks on CREB (cAMP vastuselemendiga seonduv valk), mille 133. seriinijääki PKA fosforüleerib. Seega võib p-CREB-i taseme järgi hinnata PKA aktiivsust. Eksperiment viidi läbi eelneva katseskeemi alusel, milles uuriti forskoliini mõju *Ahr*-i ekspressioonile ning rakud lüüsi 4 ja 12 tundi pärast forskoliini lisamist. Samades ajapunktides fikseeriti granuloosarakud IF eksperimendiks. *Western bloti* analüüsi tulemusena selgus, et forskoliin langetab *Ahr*-i valgu taset granuloosarakkudes *in vitro* (Joonis 10). 24 tundi pärast PMSG süsti tuvastati PKA aktiivsuse olemasolu granuloosarakkudes *in vivo*. Forskoliiniga töötlemata rakkudes *in vitro* täheldati aga p-CREB-i valgu taseme langust ehk PKA aktiivsuse vähenemist ning samaaegselt *Ahr*-i valgu taseme tõusu. *Western blotil* saadud tulemusi kinnitas IF analüüs, mille puhul nähti samuti, et forskoliini mõjul väheneb *Ahr*-i valgu tase (Lisa 2). Lisaks ühtivad IF katse tulemusena nähtud p-CREB-i tasemed *Western blotil* detekteeritud tasemetega (Lisa 3).

2.3.6. PMSG mõju p-CREB-i valgu tasemele *in vivo*

Toetudes eelnevates eksperimentides jõutud järeldusele, et PKA signaaliraja aktivatsioonil toimub *Ahr*-i allaregulatsioon nii mRNA kui ka valgu tasemel, võib oletada, et suurtes antraalsetes folliikulites võiks *Ahr*-i ülesregulatsioon toimuda läbi PKA represseeriva mõju kadumise. Uurimaks, kas hiire munasarja suurtes antraalsetes folliikulites võiks PKA aktiivsus väheneda, uuriti IF analüüsil p-CREB-i valgu taset süstimata hiire ja PMSG-ga süstitud (hormooni mõju 48 tundi) hiire munasarjades.



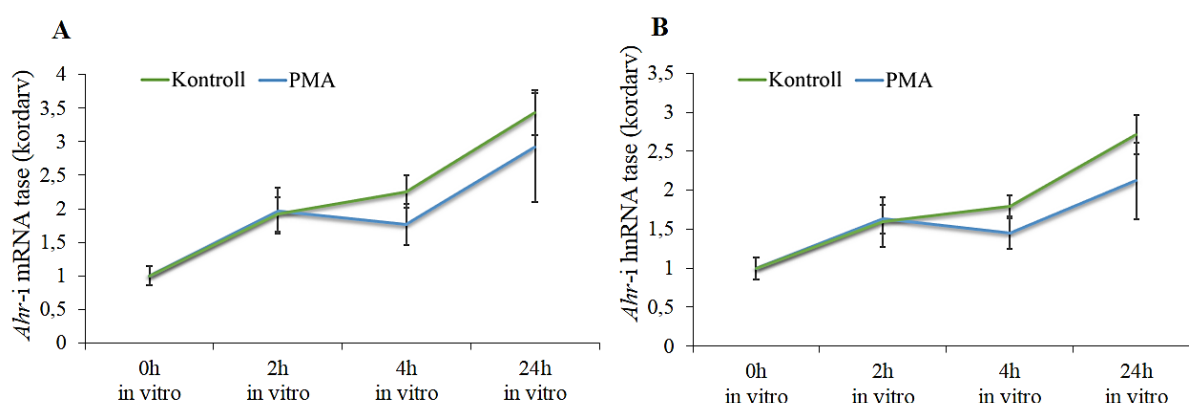
Joonis 11. PMSG mõju p-CREB-i valgu tasemele *in vivo*. Hiire p-CREB-i vastase anti kehaga töödeldi nii süstimata (A) kui ka PMSG-ga süstitud (B) (hormooni mõju 48 tundi) immatuursete hiire munasarja koelõike. Rakutuomad värviti kõikidel koelõikudel reagentiga DAPI. Mõõtkava: 100 µm.

IF analüüsi tulemusena tuvastati suurtes antraalsetes folliikulites p-CREB-i valgu olemasolu (Joonis 11) ning sellest võib järeldada, et PKA aktiivsus pole suure tõenäosusega suurtes antraalsetes folliikulites kadunud. *Ahr*-i ekspressiooni regulatsiooni seisukohast võib see tähendada, et kuigi PKA vahendusel repressseeritakse *Ahr*-i, võib *Ahr*-i ülesregulatsioon suurtes antraalsetes folliikulites toimuda mõne muu signaaliraja kaudu, mis on võrreldes PKA repressseeriva mõjuga domineerivam.

2.3.7. PKC signaaliraja mõju *Ahr*-i mRNA ekspressioonile *in vitro*

Järgnevalt otsustati edasi uurida, missuguse signaaliraja vahendusel võiks toimuda PMSG-toimeline *Ahr*-i ülesregulatsioon. Kuna PKC signaalirada peetakse munasarjas oluliseks ning selle raja osalust *Ahr*-i ekspressiooni regulatsioonil pole varasemalt uuritud, siis otsustati seda käesolevas töös analüüsida.

Uurimaks PKC signaaliraja mõju *Ahr*-i ekspressioonile, süstiti 21 – 23 päeva vanuseid hiiri 5 RÜ PMSG-ga. Hiired hukati 24 tunni möödudes, nende munasarjadest eraldati granuloosarakud ning külvati koekultuuri tassile. Tassile kinnitunud granuloosarakud pesti PBS-iga, ühes kannus olevad rakud lüüsi (0h ajapunkt) ning ülejäänud rakkudel vahetati seerumiga sööde seerumivaba söötme vastu, kuhu oli lisatud vastavalt katseskeemile PKC signaaliraja aktivaator forboolmüristaatatsetaat (PMA, 20 μ M). Rakud lüüsi vastavalt 2, 4 ja 24 tunni ajapunktides, misjärel mõõdeti qPCR-i teel *Ahr*-i mRNA ja hnRNA tasemed. Eksperimendi tulemusena selgus, et PMA-ga töödeldud rakkudes ei esine statistiliselt olulist erinevust *Ahr*-i ekspressioonis ei mRNA ega ka hnRNA tasemel võrreldes töötlemata rakkudega (Joonis 12).

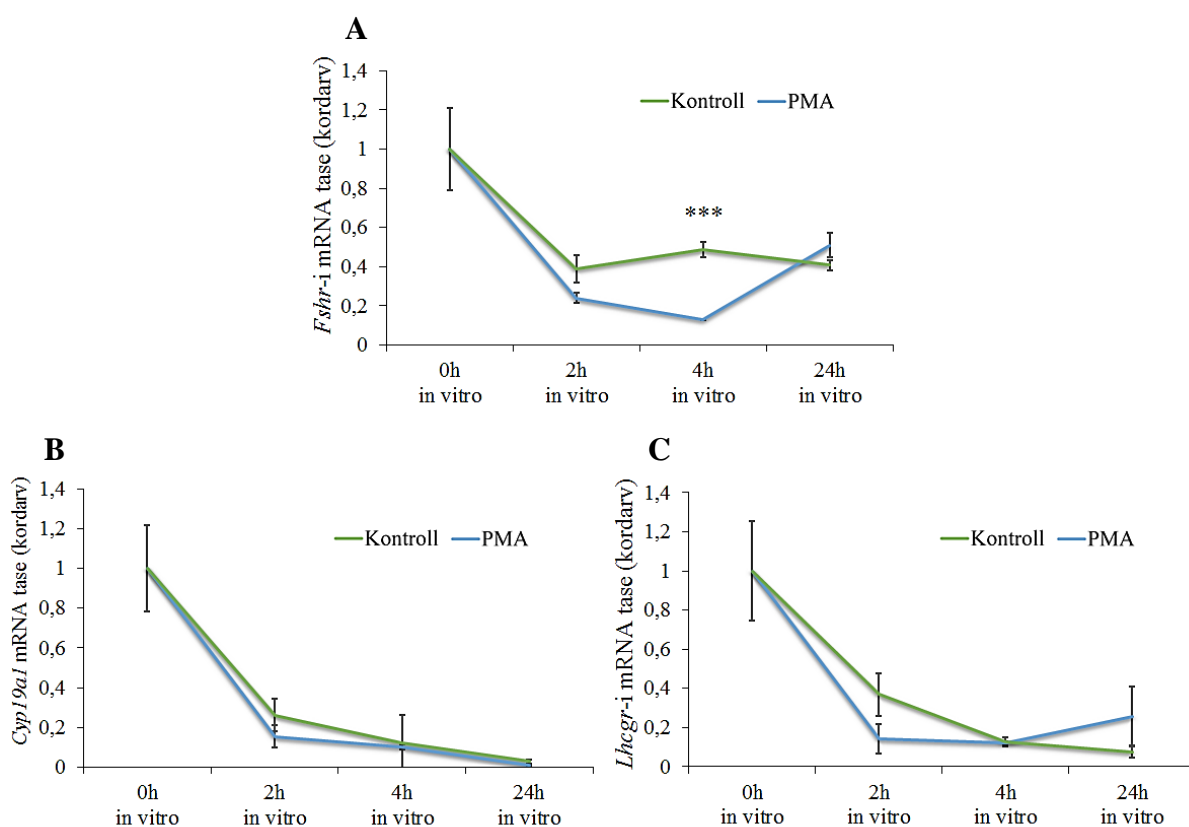


Joonis 12. PMA mõju *Ahr*-i mRNA ja hnRNA ekspressioonile *in vitro*. Primaarseid granuloosarakke, mis olid eraldatud PMSG-ga süstitud hiirtest (hormooni mõju 24 tundi), töödeldi 20 μ M PMA-ga. Rakud lüüsi ajapunktides 0, 2, 4 ja 24 tundi. *Ahr*-i mRNA (A) ja hnRNA (B) tasemed mõõdeti qPCR-i teel ning normaliseeriti *Thp* suhtes. Tulemus põhineb kolmel iseseisval korduskatsel

2.3.8. PKC signaaliraja mõju follikulogeneesi markergeenide ekspressioonile *in vitro*

Nagu ka PKA signaaliraja puhul, otsustati uurida follikulogeneesi markergeenide ekspressiooni PKC signaaliraja aktivatsioonis. Katse teostamiseks järgiti eelnevalt kirjeldatud katseskeemi, mida kasutati uurimaks PKC signaaliraja mõju *Ahr*-i ekspressioonile. qPCR-i käigus mõõdeti *Fshr*-i, *Cyp19a1* ja *Lhcgr*-i ekspressioonitasemed, mis normaliseeriti referentsgeeni *Tbp* väärtustega.

Katse tulemusena ei tuvastatud PMA-ga mõjutatud rakkudes *Cyp19a1* ega *Lhcgr*-i ekspressioonis statistiliselt olulist muutust võrreldes mõjutamata rakkudega. Samas täheldati, et PKC aktivatsioonis toimub 4 tunni möödudes *Fshr*-i allaregulatsioon, mis 24 tunniks pöördub (Joonis 13). Saadud tulemus on kooskõlas Minegishi jt. (1997) uuringuga ning kinnitab, et PMA lisamisel rakkudele aktiveeriti PKC signaalirada.



Joonis 13. PMA mõju follikulogeneesi markergeenide ekspressioonile *in vitro*. Primaarseid granuloosarakke, mis olid eraldatud PMSG-ga süstitud hiirtest (hormooni mõju 24 tundi), töödeldi 20 μ M PMA-ga. Rakud lüüsiiti ajapunktides 0, 2, 4 ja 24 tundi. *Fshr*-i (A), *Cyp19a1* (B) ja *Lhcgr*-i (C) tasemed mõõdeti qPCR-i teel ning normaliseeriti *Tbp* suhtes. Tulemus põhineb kolmel iseseisval korduskatsel (***) $p < 0,001$ vs. kontroll).

2.4. Arutelu

Varasemalt on palju uuritud arüüsüsivesinike retseptori osalust keskkonnas leiduvate ksenobiootikumide toksilisuse vahendamisel. Lisaks sellele on viimaste aastakümnete jooksul süvenenud arusaam Ahr-i endogeensest tähtsusest, muuhulgas ka reproduktiivsüsteemis. Näiteks on *Ahr*KO hiirte munasarjas täheldatud aeglasemat folliikulite kasvu ning vähenenud antraalsete folliikulite arvukust (Barnett jt., 2007b; Benedict jt., 2000), mis on viidanud Ahr-i võimalikule osalusele folliikulite kasvuga seotud protsessides. Veelgi enam, mitmed uuringud on näidanud Ahr-i osalust munasarja hormonaalses regulatsioonis, kuid selle kohta, kas ja kuidas on *Ahr*-i ekspressioon mõjutatud hormoonidest, on vähe andmeid.

Eelnevad uuringud on näidanud, et *Ahr*-i ekspressioon on gonadotropiinidest sõltuv (Chaffin jt., 1999, 2000). Meie laboris on varasemalt näidatud hiire preovulatoorsetes granuloosarakkudes LH-toimelist *Ahr*-i allaregulatsiooni (Teino jt., 2014). Lisaks on meie töögrupis lähemalt uuritud gonadotropiinide mõju *Ahr*-i ekspressioonile ka folliikulite küpsemise faasis. Antti Matvere magistritöö jaoks tehtud katsete käigus märgati hiire granuloosarakkudes gonadotropiini PMSG toimel *Ahr*-i valgu taseme võrdlemisi hilist tõusu. Saadud tulemuse põhjal võis püstitada hüpoteesi, et PMSG mõjul indutseeritakse *Ahr*-i taseme tõus suurtes antraalsetes folliikulites. Samuti võis oletada, et PMSG mõju *Ahr*-i ülesregulatsioonile võib olla kaudne ja hõlmata mitmete signaaliradade aktivatsiooni.

Seni tehtud uuringud *Ahr*-i ekspressiooni kohta küpseva munasarja folliikulites on võimaldanud vaid kaudselt hinnata, millistes folliikulites *Ahr*-i tase tõuseb. Käesolevas töös näidati esmakordselt, et 48 tundi kestva PMSG mõju järgselt *in vivo* on hiire munasarjas *Ahr* valgu tasemel ülesreguleeritud suurtes antraalsetes folliikulites. Saadud tulemus kinnitab varasemat teadmist, et *Ahr*-i tähtsus munasarjas võib avalduda läbi hormonaalses regulatsioonis osalevate protsesside kontrollimise, kuna munasarja küpsemiseks vajalike aromataasi ning luteiniseeriva hormooni retseptorite tase on kõrgem just antraalsetes folliikulites (Camp jt., 1991; Whitelaw jt., 1992). Veelgi enam, *Ahr*-i taseme tõusu täheldati muraalsetes, aga mitte kumuluse granuloosarakkudes, mis võib muuhulgas viidata ka *Ahr*-i tähtsusele kahe funktsionaalselt erineva rakupopulatsiooni gonadotropiinse vastuse reguleerimisel (Khamsi ja Roberge, 2001). Meie andmed *Ahr*-i lokaliseerimise kohta Graafi folliikulites on kooskõlas ka hiljutise uuringuga, kus leiti, et *Ahr*-i transkripti tase on hiire muraalsetes granuloosarakkudes üle viie korra kõrgem kui kumuluse rakkudes (Wigglesworth jt., 2015).

Selgitamaks PMSG-toimelise *Ahr*-i ülesregulatsiooni mehhanisme, otsustati uurida, missuguste signaaliradade kaudu võiks olla vahendatud PMSG mõju *Ahr*-i ekspressioonile. Folliikulite küpsemiseks vajalike hormoonide FSH ja LH toime on vahendatud peamiselt PKA

signaaliraja kaudu. Kuna varasemalt on näidatud PKA osalust *Ahr*-i transkriptsiooni reguleerimisel hiire preovulatoorsetes granuloosarakkudes (Teino jt., 2014), otsustati uurida, kas PKA võiks osaleda *Ahr*-i ekspressiooni reguleerimisel ka folliikulite küpsemise käigus. Uurimaks PKA osalust PMSG-toimelises *Ahr*-i regulatsioonis, hukati PMSG-ga süstitud hiired 24 tundi pärast hormonaalset mõjutamist, kuna varasemalt on selles ajapunktis märgatud *Ahr*-i valgu taseme tõusu. PKA signaaliraja aktiveerimiseks töödeldi eraldatud primaarseid granuloosarakke forskoliiniga. Selgus, et forskoliini mõjul *Ahr*-i ekspressioon langeb. Katse käigus nähti ka *Ahr*-i hnRNA taseme langust, millest võib järeldada, et forskoliini repressiiv mõju *Ahr*-ile avaldub transkriptsiooni vähenemise kaudu. PKA võimalikule repressiivale efektile *Ahr*-i ekspressioonis on viidanud ka Bussmann ja Barañao (2006) uuring, kus roti granuloosarakkudes *in vitro* täheldati sarnases folliikulite arengufaasis FSH mõjul *Ahr*-i transkripti taseme vähenemist.

Kuna mRNA tasemed ei ole alati korrelatsioonis valgu tasemetega, otsustati käesolevas töös uurida forskoliini mõju ka *Ahr*-i valgu tasemele. Eksperimendi tulemusena selgus, et forskoliin langetab *Ahr*-i valgu taset hiire granuloosarakkudes *in vitro* ning see on kooskõlas varasemalt nähtud *Ahr*-i mRNA taseme langusega. Hindamaks, kas forskoliini poolt indutseeritud *Ahr*-i ekspressiooni vähenemine avaldus läbi PKA signaliseerimise, vaadeldi forskoliini mõju follikulogeneesi markergeenide *Fshr*-i, *Cyp19a1* ja *Lhcgr*-i ekspressioonile. Varasemalt on näidatud, et FSH indutseerib roti granuloosarakkudes PKA signaaliraja vahendusel *Lhcgr*-i ja *Cyp19a1* mRNA tõusu (Escamilla-Hernandez 2008). Samuti on teada, et FSH pikaajalisel mõjul (24 tundi) toimub roti granuloosarakkudes läbi cAMP-i taseme tõusu *Fshr*-i ülesregulatsioon (Minegishi 1997). Eksperimendi käigus selgus, et forskoliini mõjul tõuseb hiire granuloosarakkudes kõigi kolme markergeeni ekspressioon, seega saadud tulemus on kooskõlas varasemate uuringutega.

Saamaks veelgi kindlust PKA signaaliraja osalusest *Ahr*-i repressioonis, mõõdeti ka PKA otsese märklaua CREB-i fosforüleeritud vormi tasemed. Üllataval kombel ei täheldatud forskoliiniga töödeldud rakkudes oluliselt kõrgemat p-CREB-i hulka võrreldes töötlemata rakkudega. Kuna forskoliin mimikeerib FSH toimet, võib nähtud tulemus olla seletatav Salvador jt. (2001) uuringuga, kus leiti, et p-CREB-i tase roti granuloosarakkudes *in vitro* on maksimaalne 20 minutit pärast FSH lisamist rakkudele, 4 tunni möödudes on aga langenud umbes samale tasemele kui hormooniga töötlemata rakkudes. Seega on võimalik, et forskoliini mõjul toimus CREB-i fosforüleerimine läbi PKA, kuid p-CREB defosforüleeriti pärast pöördumatu mõju avaldamist *Ahr*-i ekspressioonile.

Tulenevalt sellest, et *Ahr* on suurtes antraalsetes folliikulites ülesreguleeritud ning PKA signaaliraja kaudu repressseeritakse *Ahr*-i ekspressiooni, võiks arvata, et suurtes folliikulites toimub *Ahr*-i taseme tõus läbi PKA aktiivsuse kadumise. Püstitatud hüpoteesi kontrollimiseks läbiviidud eksperimendi tulemusena tuvastati kõigis munasarja folliikulites p-CREB-i olemasolu, mis viitab sellele, et PKA signaalirada on suurtes folliikulites suure tõenäosusega aktiivne. See on kooskõlas varasema teadmisega, et PKA aktiivsuse olemasolu on vajalik suurtes antraalsetes folliikulites LH retseptorite ekspressiooniks (Camp jt., 1991). Saadud tulemus viitab sellele, et suurtes folliikulites toimuv *Ahr*-i ülesregulatsioon võiks leida aset mõne muu signaaliraja kaudu, mis on domineerivam ja elimineerib seeläbi PKA poolt vahendatud repressseeriva mõju *Ahr*-ile, kusjuures pole välistatud ka mitme signaaliraja koosmõju.

Saamaks selgust PMSG-toimelise *Ahr*-i ülesregulatsiooni mehhanismides, otsustati lähemalt uurida PKC signaalirada, mille olulisust on munasarjas varasemalt näidatud. Katse tulemustest ilmnes, et PMA mõjul PKC signaalirada aktiveerides ei muutu granuloosarakkudes *Ahr*-i ekspressioon mRNA ega hnRNA tasemel, mistõttu on võimalik, et *Ahr*-i ülesregulatsiooniks on vajalik mõne muu, käesoleva töö raames mitte vaadeldud signaalirada. Hindamaks, kas PMA mõju uuritud rakkudele avaldus läbi PKC kinaasiraja, vaadeldi aktivaatori mõju *Fshr*-i ekspressioonile. PKC raja aktiivsuse kohta antud katseskeemis andis kinnitust väga sarnane *Fshr*-i ekspressiooni dünaamika Minegishi jt. (1997) uuringus, kus vaadeldi roti granuloosarakkudes PKC raja mõju *Fshr*-i transkriptsioonile. Lisaks otsustati uurida ka teiste follikulogeneesi markergeenide – *Cyp19a1* ja *Lhcgr*-i – ekspressiooni. Katse tulemusena nähti, et PMA toimel nende geenide ekspressioonis muutusi ei esinenud.

Käesolevas töös tehtud eksperimentide käigus veendusime, et arüüsüsivesinike retseptori valgu taseme tõus toimub PMSG mõjul suurtes antraalsetes folliikulites. Seejuures näidati, et hiire munasarja folliikulite küpsemisel on PKA signaalirada *Ahr*-i ekspressioonile repressseeriva toimega. Sellest tulenevalt eeldasime, et *Ahr*-i ülesregulatsioon suurtes folliikulites võiks toimuda läbi PKA aktiivsuse kadumise, kuid eksperimentide käigus ei leitud sellele hüpoteesile kinnitust. Mõistmaks, kuidas reguleeritakse PMSG toimel hiire munasarjas *in vivo* *Ahr*-i taseme tõusu, tuleks esmalt saada selgust, missuguste mehhanismidega avaldub PKA repressseeriv mõju *Ahr*-ile. Võimalusi, kuidas võiks granuloosarakkudes toimuda forskoliini/PKA poolt vahendatud *Ahr*-i allaregulatsioon, on mitmeid. Edaspidi võiks uurida näiteks kromatiini immunosadestamise meetodil, kas forskoliini toime *Ahr*-i ekspressioonile võiks avalduda läbi p-CREB-i otsese interaktsiooni *Ahr*-i promootorjärjestusega. Välistada ei saa ka võimalust, et p-CREB-i vahendusel toimub mõne *Ahr*-i repressori transkriptsiooni aktivatsioon. Veel on

võimalik, et *Ahr*-i allaregulatsioon PKA signaaliraja vahendusel toimub mitte läbi p-CREB-i, vaid mõne muu PKA signaaliraja sihtmärgi. Kindlasti tuleks edaspidi uurida ka teiste munasarjas oluliste signaaliradade osalust *Ahr*-i ekspressiooni reguleerimisel, et välja selgitada, kuidas vahendatakse suurtes antraalsetes folliikulites PMSG mõju *Ahr*-i taseme tõusule.

Kokkuvõte

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli saada selgust, missugustes munasarja folliikulites toimub PMSG mõjul Ahr-i valgu taseme tõus ning uurida, kas Ahr-i ülesregulatsioon võiks seejuures toimuda PKA või PKC signaaliraja vahendusel.

Eksperimentaalse osa tulemusena selgus, et arüüsüsivesinike retseptor on PMSG toimel ülesreguleeritud hiire munasarja suurtes antraalsetes folliikulites *in vivo*. Seejuures täheldati Ahr-i valgu taseme tõusu kumuluse granuloosarakkudes, aga mitte muraalsetes rakkudes. Signaaliradade uurimisel näidati folliikulite küpsemisel hiire granuloosarakkudes *in vitro* PKA signaaliraja osalust arüüsüsivesinike retseptori allaregulatsioonis nii mRNA kui ka valgu tasemel. Seejuures näidati, et *Ahr*-i mRNA taseme langus on põhjustatud transkriptsiooni aktiivsuse vähenemisest.

Antud töös tuvastati hiire munasarja suurtes antraalsetes folliikulites p-CREB-i olemasolu, mis viitab PKA signaaliraja aktiivsusele. Seega ei ole Ahr-i PMSG-toimeline ülesregulatsioon antraalsetes folliikulites tõenäoliselt põhjustatud PKA aktiivsuse kadumisest. Lisaks näidati, et PKC signaalirada ei osale *Ahr*-i ekspressiooni regulatsioonis, seega on võimalik, et Ahr-i ülesregulatsioon toimub läbi mõne muu signaaliraja, mida antud töö raames ei uuritud.

Kuigi käesolevas töös saadi selgust Ahr-i lokalisatsiooni kohta hiire munasarjas folliikulite küpsemisel, jäi siiski selgusetuks, missuguste signaaliradade kaudu on vahendatud PMSG-toimeline Ahr-i ülesregulatsioon. Edaspidi tuleks lähemalt uurida, kuidas on vahendatud PKA represseeriv mõju *Ahr*-i ekspressioonile ning mis viisil reguleeritakse PMSG toimel suurtes antraalsetes folliikulites Ahr-i taseme tõusu.

Expression of the aryl hydrocarbon receptor in murine granulosa cells during the maturation of ovarian follicles

Inge Varik

Summary

The aryl hydrocarbon receptor (Ahr) is a ligand-activated transcription factor which mediates the toxicity of several environmental contaminants such as dioxins. Previous research has demonstrated the importance of Ahr in female reproductive system, including ovaries. Specifically, studies have shown reduced number of antral follicles and slower antral follicle growth in *Ahr* knock-out mice, suggesting the importance of Ahr in regulation of ovarian follicle growth in the late stages of folliculogenesis.

Previous studies have suggested that the expression of *Ahr* is gonadotropin-dependent. Recently it has been shown that pregnant mare's serum gonadotropin (PMSG) which induces the maturation of follicles, increases aryl hydrocarbon receptor mRNA and protein levels in murine granulosa cells. However, the upregulation of Ahr occurs in the late stages of folliculogenesis, which indicates that the increase in Ahr levels could potentially be regulated via indirect signaling pathways. As PKA and PKC signaling pathways have been shown to be essential in the ovary, we hypothesized that these pathways could mediate the effect of PMSG and be involved in the regulation of *Ahr* expression.

In this study we found that PMSG increases Ahr protein levels in mural granulosa cells of large antral follicles. This finding indicates the importance of Ahr in the late stages of folliculogenesis. The investigation of signaling pathways involved in Ahr regulation led to a surprising result. We discovered that PKA activator forskolin decreases aryl hydrocarbon receptor mRNA and protein levels. These findings appear to be contradictory as the importance of PKA signaling in large antral follicles has been previously shown. Furthermore, our data suggest that PKA is activated in large antral follicles, thus we hypothesized that PMSG might upregulate *Ahr* expression through a more dominant pathway which overrides the repressive effect of PKA. In addition, our experimental results suggest that PKC signaling is not involved in the regulation of *Ahr* expression. In conclusion, the current study demonstrates the upregulation of Ahr in large antral follicles in the mouse ovary in response to PMSG. However, the molecular mechanisms involved in this regulation remain to be elucidated.

Tänuõnad

Avaldan suurt tänu oma juhendajatele Antti Matverele ja Indrek Teinole, kes olid abiks katsete planeerimisel, läbiviimisel ja bakalaureusetöö valmimisel. Samuti sooviksin tänada Sulev Kuuset, kes aitas loomkatsete osas ja Dmitri Lubenetsi asjakohase nõu eest tehnilistes küsimustes. Tänan rakubioloogia õppetooli inimesi meeldiva seltskonna ja abivalmiduse eest.

Kirjanduse loetelu

Abbott, B.D., Birnbaum, L.S. ja Perdew, G.H. (1995). Developmental expression of two members of a new class of transcription factors: I. Expression of aryl hydrocarbon receptor in the C57BL/6N mouse embryo. *Dev Dynam* 204: 133-143.

Abel, M.H., Wootton, A.N., Wilkins, V., Huhtaniemi, I., Knight, P.G. ja Charlton, H.M. (2000). The effect of a null mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene on mouse reproduction. *Endocrinology* 141: 1795–1803.

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.

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.

Baker, T.G. (1963). A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries. *Proc R Soc Lond B* 158: 417–433.

Barnett, K.R., Tomic, D., Gupta, R.K., Miller, K.P., Meachum, S., Paulose, T. ja Flaws, J.A. (2007a). The aryl hydrocarbon receptor affects mouse ovarian follicle growth via mechanisms involving estradiol regulation and responsiveness. *Biol Reprod* 76: 1062–1070.

Barnett, K.R., Tomic, D., Gupta, R.K., Babus, J.K., Roby, K.F., Terranova, P.F. ja Flaws, J.A. (2007b). The aryl hydrocarbon receptor is required for normal gonadotropin responsiveness in the mouse ovary. *Toxicol Appl Pharmacol* 223: 66–72.

Benedict, J.C., Lin, T.-M., Loeffler, I.K., Peterson, R.E. ja Flaws, J.A. (2000). Physiological role of the aryl hydrocarbon receptor in mouse ovary development. *Toxicol Sci* 56: 382–388.

Bowles, J., Knight, D., Smith, C., ... Koopman, P. (2006). Retinoid signaling determines germ cell fate in mice. *Science* 312: 596–600.

Braun, T., Schofield, P.R. ja Sprengel, R. (1991). Amino-terminal leucine-rich repeats in gonadotropin receptors determine hormone selectivity. *EMBO J* 10: 1885–1890.

Bussmann, U.A. ja Barañao, J.L. (2006). Regulation of aryl hydrocarbon receptor expression in rat granulosa cells. *Biol Reprod* 75: 360–369.

Bussmann, U.A., Bussmann, L.E. ja Barañao, J.L. (2006). An aryl hydrocarbon receptor agonist amplifies the mitogenic actions of estradiol in granulosa cells: evidence of involvement of the cognate receptors. *Biol Reprod* 74: 417–426.

Camp, T.A., Rahal, J.O. ja Mayo, K.E. (1991). Cellular localization and hormonal regulation of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger RNAs in the rat ovary. *Mol Endocrinol* 5: 1405–1417.

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.

- Chaffin, C.L., Stouffer, R.L. ja Duffy, D.M. (1999). Gonadotropin and steroid regulation of steroid receptor and aryl hydrocarbon receptor messenger ribonucleic acid in macaque granulosa cells during the periovulatory interval. *Endocrinology* 140: 4753–4760.
- Chaffin, C.L., Trewin, A.L. ja Hutz, R.J. (2000). Estrous cycle-dependent changes in the expression of aromatic hydrocarbon receptor (AHR) and AHR-nuclear translocator (ARNT) mRNAs in the rat ovary and liver. *Chem-Biol Interact* 124: 205–216.
- Chen, Y.-H. ja Tukey, R.H. (1996). Protein kinase C modulates regulation of the CYP1A1 gene by the aryl hydrocarbon receptor. *J Biol Chem* 271: 26261–26266.
- Christakos, S. ja Bahl, O.P. (1979). Pregnant mare serum gonadotropin. Purification and physicochemical, biological, and immunological characterization. *J Biol Chem* 254: 4253–4261.
- Cottom, J., Salvador, L.M., Maizels, E.T., ... Hunzicker-Dunn, M. (2003). Follicle-stimulating hormone activates extracellular signal-regulated kinase but not extracellular signal-regulated kinase kinase through a 100-kDa phosphotyrosine phosphatase. *J Biol Chem* 278: 7167–7179.
- Dasmahapatra, A.K., Wimpee, B.A.B., Trewin, A.L., Wimpee, C.F., Ghorai, J.K. ja Hutz, R.J. (2000). Demonstration of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin attenuation of P450 steroidogenic enzyme mRNAs in rat granulosa cell in vitro by competitive reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay. *Mol Cell Endocrinol* 164: 5–18.
- 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.
- DeManno, D.A., Cottom, J.E., Kline, M.P., Peters, C.A., Maizels, E.T. ja Hunzicker-Dunn, M. (1999). Follicle-stimulating hormone promotes histone H3 phosphorylation on serine-10. *Mol Endocrinol* 13: 91–105.
- Denis, M., Cuthill, S., Wikström, A.-C., Poellinger, L. ja Gustafsson, J.-A. (1988). Association of the dioxin receptor with the Mr 90,000 heat shock protein: A structural kinship with the glucocorticoid receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 155: 801–807.
- Denison, M.S. ja Heath-Pagliuso, S. (1998). The Ah Receptor: A regulator of the biochemical and toxicological actions of structurally diverse chemicals. *B Environ Contam Tox* 61: 557–568.
- Denison, M.S., Fisher, J.M., and Whitlock, J.P. (1988). The DNA recognition site for the dioxin-Ah receptor complex. Nucleotide sequence and functional analysis. *J Biol Chem* 263: 17221–17224.
- 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.
- Escamilla-Hernandez, R., Little-Ihrig, L., Orwig, K.E., Yue, J., Chandran, U. ja Zeleznik, A.J. (2008). Constitutively active protein kinase A qualitatively mimics the effects of follicle-stimulating hormone on granulosa cell differentiation. *Mol Endocrinol* 22: 1842–1852.
- 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.

- 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.
- Georges, A., Auguste, A., Bessière, L., Vanet, A., Todeschini, A.-L. ja Veitia, R.A. (2014). FOXL2: a central transcription factor of the ovary. *J Mol Endocrinol* 52: R17–R33.
- Gonzalez-Robayna, I.J., Falender, A.E., Ochsner, S., Firestone, G.L. ja Richards, J.S. (2000). Follicle-stimulating hormone (FSH) stimulates phosphorylation and activation of protein kinase B (PKB/Akt) and serum and glucocorticoid-induced kinase (Sgk): evidence for A kinase-independent signaling by FSH in granulosa cells. *Mol Endocrinol* 14: 1283–1300.
- Han, Y., Xia, G. ja Tsang, B.K. (2013). Regulation of cyclin D2 expression and degradation by follicle-stimulating hormone during rat granulosa cell proliferation in vitro. *Biol Reprod* 88: 57–1.
- Hardy, K., Wright, C.S., Franks, S. ja Winston, R.M.L. (2000). In vitro maturation of oocytes. *Brit Med Bull* 56: 588–602.
- Hau, J., Svendsen, P. ja Schapiro, S.J. (1994). Gamete and zygone transport, p. 56–57 In *Handbook of laboratory animal science*. CRC Press.
- Hayes, F.J., Hall, J.E., Boepple, P.A. ja Crowley, W.F. (1998). Differential control of gonadotropin secretion in the human: endocrine role of inhibin. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 1835–1841.
- Hernández-Ochoa, I., Karman, B.N. ja Flaws, J.A. (2009). The role of the aryl hydrocarbon receptor in the female reproductive system. *Biochem Pharmacol* 77: 547–559.
- Hoffman, B.L., Schorge, J.O., Bradshaw, K.D., Halvorson, L.M., Schaffer, J.I. ja Corton, M.M. (2016). *Reproductive Endocrinology In Williams Gynecology*, 3rd ed., New York, McGraw-Hill Education.
- Reproductive Endocrinology. In: Hoffman BL, Schorge JO, Bradshaw KD, Halvorson LM, Schaffer JI, Corton MM. eds. *Williams Gynecology*, 3e New York, NY: McGraw-Hill;
- Ikegwonu, F.I., Christou, M. ja Jefcoate, C.R. (1999). Regulation of cytochrome P4501B1 (CYP1B1) in mouse embryo fibroblast (C3H10T1/2) cells by protein kinase C (PKC). *Biochem Pharmacol* 57: 619–630.
- 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.
- Jayes, L., C, F., Britt, J.H. ja Esbenshade, K.L. (1997). Role of gonadotropin-releasing hormone pulse frequency in differential regulation of gonadotropins in the gilt. *Biol Reprod* 56: 1012–1019.
- Kaufman, G., Dharmarajan, A.M., Takehara, Y., Cropp, C.S. ja Wallach, E.E. (1992). The role of protein kinase-C in gonadotropin-induced ovulation in the in vitro perfused rabbit ovary. *Endocrinology* 131: 1804–1809.

- Khamsi, F. ja Roberge, S. (2001). Granulosa cells of the cumulus oophorus are different from mural granulosa cells in their response to gonadotrophins and IGF-I. *J Endocrinol* 170: 565–573.
- Khan-Dawood, F.S., Goldsmith, L.T., Weiss, G. ja Dawood, M.Y. (1989). Human corpus luteum secretion of relaxin, oxytocin, and progesterone. *J Clin Endocrinol Metab* 68: 627–631.
- Kimura, A., Naka, T., Nohara, K., Fujii-Kuriyama, Y. ja Kishimoto, T. (2008). Aryl hydrocarbon receptor regulates Stat1 activation and participates in the development of Th17 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 9721–9726.
- Knecht, M. ja Catt, K.J. (1982). Induction of luteinizing hormone receptors by adenosine 3',5'-monophosphate in cultured granulosa cells. *Endocrinology* 111: 1192–1200.
- Kumar, T.R., Wang, Y., Lu, N. ja Matzuk, M.M. (1997). Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. *Nat Genet* 15: 201–204.
- Lawson, K.A., Dunn, N.R., Roelen, B.A.J., Zeinstra, L.M., Davis, A.M., Wright, C.V.E., Korving, J.P.W.F.M. ja Hogan, B.L.M. (1999). Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes Dev* 13: 424–436.
- 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, Z., Wu, X., Zhang, F., Han, L., Bao, G., He, X. ja Xu, Z. (2013). Ahr expression is increased in hepatocellular carcinoma. *J Mol Hist* 44: 455–461.
- 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.
- Maizels, E.T., Cottom, J., Jones, J.C.R. ja Hunzicker-Dunn, M. (1998). Follicle stimulating hormone (FSH) activates the p38 mitogen-activated protein kinase pathway, inducing small heat shock protein phosphorylation and cell rounding in immature rat ovarian granulosa cells. *Endocrinology* 139: 3353–3356.
- Matvere, A. (2015). Arüülsüivesinike retseptori ekspressioonimehhanismide uurimine hiire granuloosarakkudes. Magistritöö. Tartu Ülikool.
- Meredith, J.M., Turek, F.W. ja Levine, J.E. (1998). Effects of gonadotropin-releasing hormone pulse frequency modulation on the reproductive axis of photoinhibited male Siberian hamsters. *Biol Reprod.* 59: 813–819.
- 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* 185: 3190–3198.
- Mimura, J. ja Fujii-Kuriyama, Y. (2003). Functional role of Ahr in the expression of toxic effects by TCDD. *BBA-Mol Cell Res* 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.

- Minegishi, T., Tano, M., Kishi, H., Kameda, T. ja Miyamoto, K. (1997). Follicle-stimulating hormone regulation on its receptor messenger ribonucleic acid levels in cultured rat granulosa cells. *BBA-Mol Cell Res* 1359: 165–173.
- Morris, J.K. ja Richards, J.S. (1995). Luteinizing hormone induces prostaglandin endoperoxide synthase-2 and luteinization in vitro by A-kinase and C-kinase pathways. *Endocrinology* 136: 1549–1558.
- 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 Chaperone* 1: 237–250.
- Nelson, J.F., Felicio, L.S., Randall, P.K., Sims, C. ja Finch, C.E. (1982). A longitudinal study of estrous cyclicity in aging C57BL/6J mice: I. Cycle frequency, length and vaginal cytology. *Biol Reprod* 27: 327–339.
- Nguyen, L.P. ja Bradfield, C.A. (2008). The search for endogenous activators of the aryl hydrocarbon receptor. *Chem Res Toxicol* 21: 102–116.
- Numazawa, A. ja Kawashima, S. (1982). Morphometric studies on ovarian follicles and corpora lutea during the oestrous cycle in the mouse. *J Reprod Fertil* 64: 275–283.
- Oesch-Bartlomowicz, B., Huelster, A., Wiss, O., Antoniou-Lipfert, P., Dietrich, C., Arand, M., Weiss, C., Bockamp, E. ja Oesch, F. (2005). Aryl hydrocarbon receptor activation by cAMP vs. dioxin: Divergent signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 9218–9223.
- Ohinata, Y., Payer, B., O'Carroll, D., ... ja Saitou, M. (2005). Blimp1 is a critical determinant of the germ cell lineage in mice. *Nature* 436: 207–213.
- Peper, J.S., Brouwer, R.M., van Leeuwen, M., Schnack, H.G., Boomsma, D.I., Kahn, R.S. ja Hulshoff Pol, H.E. (2010). HPG-axis hormones during puberty: A study on the association with hypothalamic and pituitary volumes. *Psychoneuroendocrino* 35: 133–140.
- Pepling, M.E. ja Spradling, A.C. (1998). Female mouse germ cells form synchronously dividing cysts. *Development* 125: 3323–3328.
- Pepling, M.E. ja Spradling, A.C. (2001). Mouse ovarian germ cell cysts undergo programmed breakdown to form primordial follicles. *Dev Biol* 234: 339–351.
- Peters, H. (1969). The development of the mouse ovary from birth to maturity. *Acta Endocrinol* 62: 98–116.
- Pierce, J.G. ja Parsons, T.F. (1981). Glycoprotein hormones: structure and function. *Annu Rev Biochem* 50: 465–495.
- Plant, T.M. ja Zeleznik, A.J. (2014). Gonadotropin signaling in the ovary, p. 895. In Knobil and Neill's *Physiology of Reproduction*. Academic Press.
- Puri, P., Little-Ihrig, L., Chandran, U., Law, N.C., Hunzicker-Dunn, M. ja Zeleznik, A.J. (2016). Protein kinase A: a master kinase of granulosa cell differentiation. *Scientific Reports* 6: 28132.

- Quinones-Jenab, V., Jenab, S., Ogawa, S., Funabashi, T., Weesner, G., D. ja Pfaff, D.W. (1996). Estrogen regulation of gonadotropin-releasing hormone receptor messenger RNA in female rat pituitary tissue. *Mol Brain Res* 38: 243–250.
- Ramadoss, P. ja Perdew, G.H. (2005). The transactivation domain of the Ah receptor is a key determinant of cellular localization and ligand-independent nucleocytoplasmic shuttling properties. *Biochemistry* 44: 11148–11159.
- 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.
- Richards, J.S. ja Midgley, A.R. (1976). Protein hormone action: a key to understanding ovarian follicular and luteal cell development. *Biol Reprod* 14: 82–94.
- Rispoli, L.A. ja Nett, T.M. (2005). Pituitary gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor: Structure, distribution and regulation of expression. *Anim Reprod Sci* 88: 57–74.
- Salvador, L.M., Park, Y., Cottom, J., ... ja Hunzicker-Dunn, M. (2001). Follicle-stimulating hormone stimulates protein kinase A-mediated histone H3 phosphorylation and acetylation leading to select gene activation in ovarian granulosa cells. *J Biol Chem* 276: 40146–40155.
- 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.
- Schmidt, J.V., Su, G.H., Reddy, J.K., Simon, M.C. ja Bradfield, C.A. (1996). Characterization of a murine Ahr null allele: involvement of the Ah receptor in hepatic growth and development. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 6731–6736.
- Seidel, S.D., Winters, G.M., Rogers, W.J., Ziccardi, M.H., Li, V., Keser, B. ja Denison, M.S. (2001). Activation of the Ah receptor signaling pathway by prostaglandins. *J Biochem Mol Toxic* 15: 187–196.
- Shaw, N.D., Histed, S.N., Srouji, S.S., Yang, J., Lee, H. ja Hall, J.E. (2010). Estrogen negative feedback on gonadotropin secretion: evidence for a direct pituitary effect in women. *J Clin Endocrinol Metab* 95: 1955–1961.
- Shimamoto, T., Yamoto, M. ja Nakano, R. (1993). Possible involvement of protein kinase C in gonadotropin-induced ovulation in the rat ovary. *Endocrinology* 133: 2127–2132.
- Simoni, M., Gromoll, J. ja Nieschlag, E. (1997). The follicle-stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology, and pathophysiology. *Endocr Rev* 18: 739–773.
- Singh, S.S., Hord, N.G. ja Perdew, G.H. (1996). Characterization of the activated form of the aryl hydrocarbon receptor in the nucleus of HeLa cells in the absence of exogenous ligand. *Arch Biochem Biophys* 329: 47–55.
- Smyth, C.D., Miro, F., Howies, C.M. ja Hillier, S.G. (1995). Effect of luteinizing hormone on follicle stimulating hormone-activated paracrine signalling in rat ovary. *Hum Reprod* 10: 33–39.
- Spears, N., Murray, A.A., Allison, V., Boland, N.I. ja Gosden, R.G. (1998). Role of gonadotrophins and ovarian steroids in the development of mouse follicles in vitro. *J Reprod Fertil* 113: 19–26.

Sriraman, V., Sharma, S.C. ja Richards, J.S. (2003). Transactivation of the progesterone receptor gene in granulosa cells: evidence that Sp1/Sp3 binding sites in the proximal promoter play a key role in luteinizing hormone inducibility. *Mol Endocrinol* 17: 436–449.

Sriraman, V., Rudd, M.D., Lohmann, S.M., Mulders, S.M. ja Richards, J.S. (2006). Cyclic guanosine 5'-monophosphate-dependent protein kinase II is induced by luteinizing hormone and progesterone receptor-dependent mechanisms in granulosa cells and cumulus oocyte complexes of ovulating follicles. *Mol Endocrinol* 20: 348–361.

Sriraman, V., Modi, S.R., Bodenbun, Y., Denner, L.A. ja Urban, R.J. (2008). Identification of ERK and JNK as signaling mediators on protein kinase C activation in cultured granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol* 294: 52–60.

Tam, P.P.L. ja Snow, M.H.L. (1981). Proliferation and migration of primordial germ cells during compensatory growth in mouse embryos. *Development* 64: 133–147.

Teino, I., Kuuse, S., Ingerpuu, S., Maimets, T. ja Tiido, T. (2012). The aryl hydrocarbon receptor regulates mouse Fshr promoter activity through an E-box binding site. *Biol Reprod* 86: 77–1.

Teino, I., Matvere, A., Kuuse, S., Ingerpuu, S., Maimets, T., Kristjuhan, A. ja Tiido, T. (2014). Transcriptional repression of the Ahr gene by LHCGR signaling in preovulatory granulosa cells is controlled by chromatin accessibility. *Mol Cell Endocrinol* 382: 292–301.

Whitelaw, P.R., Smyth, C.D., Howles, C.M. ja Hillier, S.G. (1992). Cell-specific expression of aromatase and LH receptor mRNAs in rat ovary. *J Mol Endocrinol* 309–312.

Wigglesworth, K., Lee, K.-B., Emori, C., Sugiura, K. ja Eppig, J.J. (2015). Transcriptomic diversification of developing cumulus and mural granulosa cells in mouse ovarian follicles. *Biol Reprod* 92: 23

Wu, D., Potluri, N., Kim, Y. ja Rastinejad, F. (2013). Structure and dimerization properties of the aryl hydrocarbon receptor PAS-A domain. *Mol Cell Biol* 33: 4346–4356.

Yang, X., Solomon, S., Fraser, L.R., Trombino, A.F., Liu, D., Sonenshein, G.E., Hestermann, E.V. ja Sherr, D.H. (2008). Constitutive regulation of CYP1B1 by the aryl hydrocarbon receptor (AhR) in pre-malignant and malignant mammary tissue. *J Cell Biochem* 104: 402–417.

Zeleznik, A.J., Saxena, D. ja Little-Ihrig, L. (2003). Protein kinase B is obligatory for follicle-stimulating hormone-induced granulosa cell differentiation. *Endocrinology* 144: 3985–3994.

Kasutatud veebiaadressid

1. Uniprot. Kasutatud 18.04.2018 <https://www.uniprot.org/uniprot/P30561>
2. NCBI. Kasutatud 10.05.2018 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1081>

Lisad

Lisa 1. Loomkatsete luba



ASUTUSEISESEKS KASUTAMISEKS
PÕLLUMAJANDUSMINISTEERIUM
Märge tehtud "22" mail 2014 . a .
Juurdepääsupiirang kehtib kuni 22.05.2019"
või
Alus: Avaliku teabe seadus § 35 lg 1 p17,

PÕLLUMAJANDUSMINISTEERIUM

LOOMKATSEPROJEKTI LOAKOMISJON

OTSUS
Infotehnoloogia vahendusel

22. mai 2014. a nr 33

Loomkatseprojekti luba

Loomakaitseaduse § 45 lõike 2 alusel ning loomkatseprojekti loakomisjoni 13.-16. maini 2014. a toimunud istungi protokoll nr 15 kohaselt otsustati järgmist.

1. Anda luba Tarmo Tiido'le (sünd. 02.02.1971, aadress Riia 23, Tartu 51010) loomkatseprojekti „AHR-i regulatsioonimehhanismide uurimine hiire munasarjafolliikuli granuloosarakkudes“, läbiviimiseks järgmistel tingimustel:

1.1. loomkatseprojekti kavandaja ja loomkatseprojekti eest vastutav isik: Sulev Kuuse (sünd. 15.01.1962, aadress Riia 23, Tartu 51010);

1.2. Loomkatseprojekti läbiviimisesse kaasatud isik: Indrek Teino (sünd. 08.12.1985, aadress Riia 23-127, Tartu, 51010)

1.3. loomkatseprojekti läbiviimise aeg ja kohad: alates 01.06.2014 kuni 31.05.2016, Tartu Ülikooli TÜ MRI vivaariumis, ettevõtte tunnustamise otsus nr 14 KL 1202, aadress Riia 23, Tartu 51010;

1.4. katseloomade liik ja arv: 200 emast C57BL/6J (vanus 21 päeva) hiirt. Esimesel aastal 110 ning teisel aastal 90 hiirt.

1.5. loomkatses rakendatavad menetlused:

Esimese rühma moodustavad 21 päeva vanused hiired, kellele rakendatakse eutanaasiat (tservikaalne dislokatsioon).

Teise rühma moodustavad 21 päeva vanused hiired, kellele süstitakse kõhuõõnde FSH (folliikuleid stimuleeriv hormoon), mis tingib suure hulga munasarja folliikulite kasvu ning küpsemise, või kontrollina süstelahust. 48 tundi hiljem rakendatakse eutanaasiat ning eraldatakse granuloosarakud.

Kolmanda rühma moodustavad 21 päeva vanused hiired, kellele süstitakse 48h pärast FSH-d inimese koorioni gonadotropiini (hCG) või kontrollina süstelahust. 12 tundi hiljem rakendatakse eutanaasiat ning eraldatakse granuloosarakud.

FSH (PMSG) ning hCG hangitakse lüofiliseeritud kujul, millele on pakendis kaasa pandud lahusti. Katsele eelnevalt lahustatakse hormoonid steriilses keskkonnas (0,5

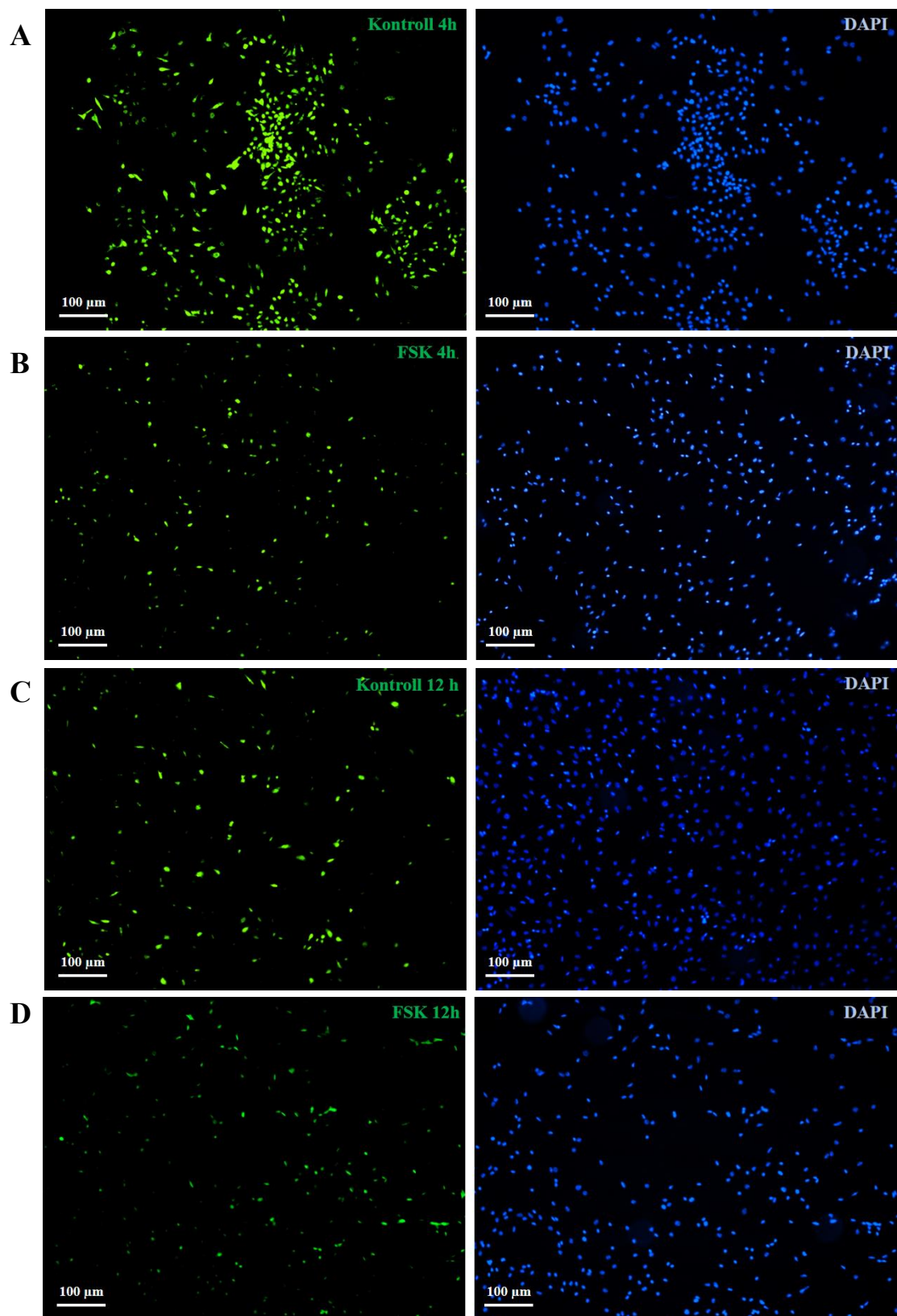
RÜ/ μ l) ning säilitatakse +4 °C juures kuni 24 tundi. Lõpplahuse valmistamiseks lahjendatakse see lõppkontsentratsioonini 5RÜ / 100 μ l, mis süstitakse hiirte kõhuõõnde. Pärast kõhuõõnde süstimist jälgitakse ning hinnatakse hiirte käitumist, välistades sellega võimalike tüsistuste teket (nt. ekslik soolde/maksa süstimine). Kui peaks ilmema süstimisest või manustatavast aineist tingitud kõrvalnähud (näiteks looma kaalu langus, söögiisu kadumine, närvilisus, temperatuuri tõus, mida mõõdetakse rektaalselt), siis loom hukatakse kasutades tservikaalse dislokatsiooni meetodit. Katses olnud loomadel rakendatakse humaanse lõpp-punkti strateegiat vastavalt OECD reeglitele ning lähtuvalt 3R põhimõtetest.

2. Otsust on õigus vaidlustada haldusmenetluse seaduses või halduskohtumenetluse seadustikus ettenähtud korras ja tähtaja jooksul.

Sirje Jalakas
/allkirjastatud digitaalselt/

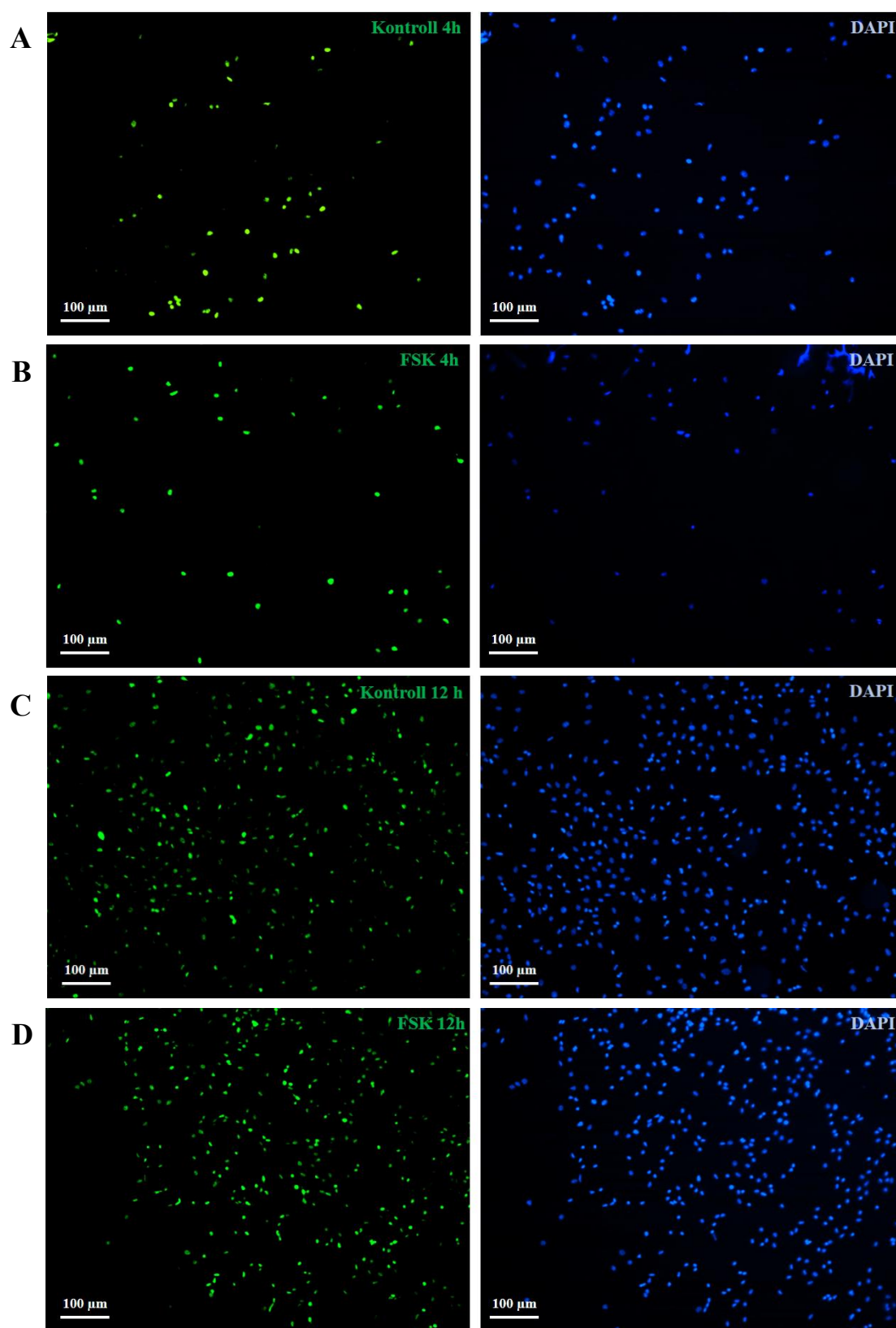
Komisjoni aseesimees

Lisa 2. PKA signaaliraja mõju Ahr-i valgu tasemele granuloosarakkudes *in vitro*



Joonis 14. PKA signaaliraja mõju Ahr-i valgu tasemele granuloosarakkudes *in vitro*. Koekultuuri tassile kinnitunud primaarseid granuloosarakke töödeldi 10 µM forskoliiniga ning fikseeriti IF analüüsiks 4 (**B**) või 12 tundi (**D**) pärast kemikaali lisamist. Kemikaaliga töötlemata rakud fikseeriti 4 tundi (**A**) või 12 tundi (**C**) pärast koekultuuri tassile kinnitumist. IF katse käigus töödeldi rakke Ahr-i vastase antikehaga SA-210. Rakutuomad värviti reagentiga DAPI. Mõõtkava: 100 µm.

Lisa 3. PKA signaaliraja mõju p-CREB-i valgu tasemele granuloosarakkudes *in vitro*



Joonis 15. PKA signaaliraja mõju p-CREB-i valgu tasemele granuloosarakkudes *in vitro*. Koekultuuri tassile kinnitunud primaarseid granuloosarakke töödeldi 10 μM forskoliiniga ning fikseeriti IF analüüsiks 4 (**B**) või 12 tundi (**D**) pärast kemikaali lisamist. Kemikaaliga töötlemata rakud fikseeriti 4 tundi (**A**) või 12 tundi (**C**) pärast koekultuuri tassile kinnitumist. IF katse käigus töödeldi rakke p-CREB-i vastase anti kehaga. Rakutuomad värviti reagentiga DAPI. Mõõtkava: 100 μm.

Lihtlitsents

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Inge Varik

(sünnikuupäev: 2. september 1996)

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

„Arüülsüivesinike retseptori ekspressioon hiire munasarja granuloosarakkudes folliikulite küpsemisel“,

mille juhendajad on Indrek Teino ja Antti Matvere,

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

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **28.05.2021** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

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

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

Tartus, 28.05.2018