

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

GSK-3 inhibiitori CHIR99021 toime H9 rakkudele

Bakalaureusetöö

12 EAP

Helena Tull

Juhendajad PhD Ade Kallas-Kivi

PhD Annely Lorents

TARTU 2018

INFOLEHT

GSK-3 inhibiitori CHIR99021 toime H9 rakkudele

Inimese embrüonaalsed rakud on imetaja blastotsüstist eraldatud rakud, mis on pluripotentsed ja neil on võime diferentseeruda erinevateks rakutüüpideks. Efektiivseks diferentseerimiseks on vajalik olemasolevate protokollide täiustamine. Näidatud on, et Wnt raja aktiveerimisega on võimalik inimese embrüonaalseid tüvirakke pluripotentses olekus hoida, kuid ei ole täpsemalt uuritud selle mõju diferentseerimisele. Keemiliselt sünteesitud CHIR99021 on üheks potentsiaalseks ühendiks Wnt raja aktivatsiooniks. Käesolevas töös uuriti CHIR99021 mõju embrüonaalsetele tüvirakkudele pluripotentsust või diferentseerumist soodustavas keskkonnas ja diferentseerumisele embrüonaalseteks kehadeks.

Käesolev bakalaureusetöö tulemustel leiti, et Wnt signaalraja moduleerimine võimaldab H9 rakkudes säilitada pluripotentsust ning soodustada diferentseerumist vastavalt teiste signaalradade aktivatsioonile pluripotentsust soodustavas või diferentseerumist soodustavas keskkonnas.

Märksõnad: embrüonaalsed tüvirakud, Wnt signaalrada, CHIR99021, GSK-3 inhibiitor

CERCS kood: P310 (proteiinid, ensüümid)

GSK-3 inhibitor CHIR99021 effect to the H9 cell line

Human embryonic stem cells are derived from mammalian blastocyst. These cells are pluripotent and have ability to differentiate to different type of cells. For effective differentiation the existing protocols should be improved. It has been shown, that activating Wnt signaling pathway in human embryonic stem cells is important to maintain these cells in pluripotent state, but the effect of modulating Wnt signaling on early differentiation is still unknown. Different types of chemically synthesized substances affects differentiation, for example CHIR99021. In this study we characterized the effect of CHIR99021 on H9 cells in the conditions supporting pluripotency or differentiation. We also studied the effect of CHIR99021 pretreatment in pluripotency supporting conditions on H9 cells differentiation ability to form embryoid bodies (EB).

The results of the study showed that Wnt signaling pathway supports the pluripotency and differentiation potential in H9 cells and is influenced by other active signaling pathways provided by the culturing environment.

Key words: embryonic stem cells, Wnt signaling pathway, CHIR99021, GSK-3 inhibitor

CERCS code: P310 (proteins, enzymes)

SISUKORD

SISUKORD.....	3
KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS.....	7
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	8
1.1. EMBRÜONAALSED TÜVIRAKUD.....	8
1.2. PLURIPOTENTSUSMARKERID.....	9
1.2.1. OCT4	9
1.2.2. SOX2	10
1.2.3. NANOG	11
1.2.4. SSEA-3.....	11
1.3. ES rakkude diferentseerumine	12
1.4. ES rakkude diferentseerumine mesodermaalses suunas.....	13
1.4.1. Mesodermaalsete rakkude markerid.....	14
1.4.2. BRACHYURY.....	14
1.4.3. HAND1	15
1.5. Wnt signaalrada.....	15
1.6. GSK-3 inhibiitorid.....	17
2. EKSPERIMENTAALNE OSA.....	20
2.1. Töö eesmärgid.....	20
2.2. Materjal ja meetodika.....	20
2.2.1. H9 rakkude kasvatamine	20
2.2.2. Antikehad ja reagentid	21
2.2.3. H9 rakkude mõjutamine CHIR99021.....	22
2.2.4. Embrüonaalsete kehade moodustamine	22
2.2.5. Immunofluorestsentsmeetod pluripotentsusmarkerite ja diferentseerumismarkerite määramiseks.....	23
2.2.6. Rakkude analüüs läbivoolutsütomeetril.....	23
2.2.7. Valgusmikroskoopia.....	24
2.2.8. Rakkude arvu määramine hemotsütomeetri kambris.....	25
2.2.9. Andmete statistiline analüüs	25
2.3. Tulemused ja arutelu.....	25
2.3.1 GSK-3 inhibeerimise mõju H9 rakkude pluripotentsusele.....	25

2.3.2 GSK3-inhibeerimise mõju H9 rakkudele pluripotentsust soodustavas ja diferentseerumist soodustavas keskkonnas.....	29
2.3.3 GSK3 inhibeerimise mõju embrüonaalsete kehade moodustamisele H9 rakkudest	33
2.3.4. GSK3 inhibeerimise mõju embrüonaalsete kehade diferentseerumisele.....	38
KOKKUVÕTE.....	40
RESÜMEE/SUMMARY	41
KASUTATUD KIRJANDUS	42
LIHTLITSENTS	47

KASUTATUD LÜHENDID

APC - adenoomne polüpoosne koli valk (ingl k *adenomatous polyposis coli*)

bFGF - põhiline fibroblasti kasvufaktor (ingl k *basic fibroblast growth factor*)

BMP4 - luu morfogeenne faktor 4 (ingl k *bone morphogenetic protein 4*)

BSA - veise seerumi albumiin (ingl k *bovine serum albumin*)

CD - diferentseerumise klaster (ingl k *cluster of differentiation*)

CD184 - kemokiini retseptor, fusiin, diferentseerumise klaster 184 (ingl k *cluster of differentiation 184*), ka CXCR4

CDX2 – kaudaalset-tüüpi homeojärjestus 2 (ingl k *caudal-type homeobox protein 2*)

CK1 α - kaseiini kinaas 1 α (ingl k *casein kinase 1 α*)

DAPI - 4', 6'-diamidino-2 fenüülindool (ingl k *4', 6'-diamidino-2-phenylindole*)

Dsh - moonutav valk (ingl k *dishevelled protein*)

EB - embrüonaalsed kehad (ingl k *embryonic bodies*)

ECM - ekstratsellulaarne maatriks (ingl k *extracellular matrix*)

ES rakud - embrüonaalsed tüvirakud (ingl k *embryonic stem cells*)

FBS - veise looteserum (ingl k *fetal bovine serum*)

FACS - läbivoolutsütomeetria (ingl k *fluorescence-activated cell sorting*)

GSK-3 - glükogeeni süntetaasi kinaas 3 (ingl k *glycogen synthetase kinase 3*)

HAND1 - südame ja neuraalharja derivaatide ekspresseeritud valk 1 (ingl k *heart- ja neural crest derivatives expressed protein 1*)

hES rakud - inimese embrüonaalsed tüvirakud (ingl k *human embryonic stem cells*)

LDL - madala tihedusega lipoproteiin (ingl k *low density lipoprotein*)

LEF - lümfoidne võimendaja-faktor (ingl k *lymphoid enhancer-binding factor*)

LIF - leukeemia inhibiitor-faktor (ingl k *leukemia inhibitory factor*)

MEF - hiire embrüonaalne fibroblast (ingl k *mouse embryonic fibroblast*)

mES rakud – hiire embrüonaalsed tüvirakud (ingl k *murine embryonic stem cells*)

mTOR – imetaja rapamütsiini sihtmärk (ingl k *mammalian target of rapamycin*)

NGS - immuniseerimata kitse seerum (ingl k *normal goat serum*)

Nppa – Natriureetiline peptiid A geen (ingl k *Natriuretic Peptide A*)

OCT4 - oktameere siduv transkriptsioonifaktor 4 (ingl k *octamer-binding transcription factor 4*)

PE - fikoerütriin (ingl k *phycoerythrin*)

PECAM - trombotsüüdi ja endoteeliraku adhesioonimolekul 1 (ingl k *platelet endothelial cell adhesion molecule 1*)

PFA - paraformaldehüüd (ingl k *paraformaldehyde*)

POU5F1 - POU 5. klassi homeojärjestus 1 (ingl k *POU class 5 homeobox 1*)

SOX2 - sugu määrava Y-regiooni 2. osa (ingl k *sex determining region Y-box 2*)

SSEA-3 - staadiumile spetsiifiline embrüonaalne antigeen 3 (ingl k *stage-specific embryonic antigen-3*)

SSEA-4 - staadiumile spetsiifiline embrüonaalne antigeen 4 (ingl k *stage-specific embryonic antigen-4*)

STAT-3 - transkriptsioon 3 signaali muundaja ja aktivaator (ingl k *signal transducer ja activator of transcription 3*)

TCF – T- raku faktor (ingl k *T-cell factor*)

TSC2 – tuberoosne skleroosi kompleks 2 (ingl k *tuberous Sclerosis Complex 2*)

TGF-β – transformeeriv kasvufaktor beeta (ingl k *transforming growth factor beta*)

Wnt – tiivutusega seotud integratsioonisaht (ingl k *Wingless-related integration site*)

SISSEJUHATUS

Inimese embrüonaalsed tüvirakud (hES rakud) on imetaja blastotsüstist eraldatud rakud, mis on pluripotentsed. hES rakke iseloomustab suur plastilisus, mis ühest küljest võimaldab neil diferentseeruda erinevateks rakutüüpideks, kuid samas teeb raskeks nende kontrollitud kasvatamise pluripotentsuse säilitamiseks. Efektiveks diferentseerumiseks on vajalik olemasolevate protokollide täiustamine. Näidatud on, et Wnt (ingl k *Wingless-related integration site*) raja aktiveerimisega on võimalik hES rakke primitiivsemas olekus hoida, kuid ei ole täpsemalt uuritud selle mõju diferentseerumisele. Wnt raja aktiveerimiseks on üheks potentsiaalseks ühendiks keemiliselt sünteesitud CHIR99021. CHIR99021 on glükogeen süntaas kinaas 3 (GSK-3) inhibeerija, mis aktiveerides Wnt signaalrada mõjutab kaudselt erinevate rakkude diferentseerumist, arengut ja rakkude reprogrammeerimist. On toodetud teisi GSK-3 inhibeerijaid, kuid CHIR99021 eristub nendest oma kõrge aktiivsuse ja eriti madala toksilisusega.

hES rakkude pluripotentsust mõjutab suurel määral kasvukeskkond ning peamine mõjutaja on bFGF (ingl k *basic fibroblast growth factor*), mille olemasolul säilitavad hES rakud pluripotentsuse ning mille puudumisel toimub rakkude diferentseerumine.

Antud bakalaureusetöö kirjanduse ülevaates kirjeldatakse ES rakkude omadusi, markereid ning nende diferentseerumist. Praktilise osa eesmärgiks oli uurida CHIR99021 mõju hES rakkude pluripotentsuse säilitamisele, diferentseerumisele embrüonaalseteks kehadeks (EB) ja võrrelda CHIR99021 mõju hES rakkudele pluripotentsust või diferentseerumist soodustavas keskkonnas.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. EMBRÜONAALSED TÜVIRAKUD

Embrüonaalsed tüvirakud on eraldatud imetaja blastotsüsti sisemisest massist. Neid rakke iseloomustavad järgmised tunnused: 1) paljunemine st. ise-uuemine; 2) diferentseerumine erinevateks rakkudeks *in vitro* ja *in vivo*; 3) klonogeneetilisus; 4) normaalne kariotüüp; 5) intensiivne proliferatsioon *in vitro* rakukultuuri tingimustes ning 6) võimalus rakke külmutada ja seejärel üles-sulatada edasiseks kasvatamiseks (Brivanlou *et al.*, 2003). mES ja hES rakud on võimelised diferentseerudes moodustama embrüonaalseid kehasid. Samuti kasutatakse hES rakkude diferentseerumisvõime hindamiseks rakkude omadust tekitada teratoome, kui ES rakud transplanteeritakse immuundefitsiitsete hiirte lihastesse. Pluripotentsete ES rakkude põhjustatud teratoomid sisaldavad diferentseerunud rakke kõigist kolmest idukihist: endodermist, ektodermist ja mesodermist (Reubinoff *et al.*, 2000). hES ja ka mES rakud sünteesivad mitmeid transkriptsioonifaktoreid, mis on vajalikud pluripotentsuse säilitamisel (Brivanlou *et al.*, 2003).

1998. a eraldati esimest korda inimese embrüonaalsete tüvirakkude liinid (H1, H7, H9, H13 ja H14). Need rakuliinid on saadud inimese blastotsüstist eraldatud rakkudest. Neid rakuliine iseloomustab pluripotentsus ja normaalne kariotüüp, samuti on kõrgel tasemel ekspresseeritud telomeraasne aktiivsus. Lisaks sünteesivad rakud erinevaid pinnamarkereid SSEA-3 (ingl *k stage-specific embryonic antigen-3*) ja SSEA-4 (*stage-specific embryonic antigen-4*). Pikaajalisel kasvatamisel rakukultuuris (4-5 kuud) säilitavad rakud mittediferentseerunult prolifererumise (Thomson *et al.*, 1998). Diferentseerumist soodustavas rakukultuuri tingimustes on ES rakud võimelised diferentseeruma sõltuvalt kasvukeskkonnast, kas trofoblasti rakkudeks või endodermi, ektodermi või mesodermi progenitorideks. Järgnevalt võivad ES rakud spetsialiseeruda erinevateks rakutüüpideks, näiteks mao epiteeliks (endoderm); kõhredeks, luudeks, sile- ja vöötlihaskoeks (mesoderm); neuraalseks epiteeliks, ganglionideks ja ühekihiliseks kuupepiteeliks (ektoderm). Enim kasutatud H9 rakuliin (WA09) (WiCell research Institute, National Stem Cell Bank, USA) säilitab normaalse XX kariotüübi kuni 6-kuulisel kasvatamisel rakukultuuris (Thomson *et al.*, 1998). hES rakke kasvatati algselt hiire embrüonaalsete fibroblastide (MEF) rakkudest moodustatud aluskihi peal, sest see hoidis ära diferentseerumise ning rakkudel oli võimalik kinnitada fibroblastide rakkude pinnale. Sealjuures fibroblastide rakud tootsid kasvukeskkonda aineid, mis olid vajalikud tüvirakkude

pluripotentsuse säilitamiseks (Thomson *et al.*, 1998). Kui mES rakkude kasvatamisel puudus MEF rakkude kiht, siis rakud diferentseerusid nii inimese leukeemia inhibiitor faktori (LIF) juuresolekul kui ka selle puudumisel (Thomson *et al.*, 1998). Hiljem hakati kasutama Matrigel™ maatriksit, mis sisaldab nii kollageene, laminiine jt seondumiseks vajalikke substraate, et ES rakke saaks kasvatada defineeritud tingimustes. Tänapäeval kasutusel olevad ksenovaba ES rakukultuuri kasvatamise tingimused võimaldavad vähendada makromolekulide ja viiruste ülekande riski. Lisaks on kasutusele võetud seerumi asendajad ning kasvufaktoreid sisaldavad söötmed, nt bFGF, mis on olulisim kasvufaktor ES rakkude kasvatamisel rakukultuuris (Amit *et al.*, 2003).

hES rakkude iseloomustamiseks rakupopulatsioonis kasutatakse pluripotentsusmarkereid, millest kasutusel on nii pinnamarkerid (SSEA-3, SSEA-4) kui ka erinevad transkriptsioonifaktorid (OCT4, NANOG, SOX2). Pinnamarkerid on transmembraansed molekulid, mis osalevad spetsiifiliste valkudega seondumisel ning signaali ülekandel. Erinevad membraanvalkude tüübid eristuvad struktuuri ja signaalmolekulide afiinsuse poolest. Pinnamarkerid SSEA-3 ja SSEA-4 toodetakse pluripotentsetes ES rakkudes, kuid raku diferentseerumisel nende tootmine väheneb kiiresti. Diferentseerunud rakkude pinnal on aga detekteeritav SSEA-1 pinnamarker. Membraanvalgud on kõige olulisemad elusate ES rakkude iseloomustamisel. SSEA-3 sünteesitakse oogeneesi käigus ja esineb ootsüütide, sügootide ja varase lõgustumise staadiumis embrüode membraanis (Shevinsky *et al.*, 1982). Teine tüüp pinnamarkereid on CD (ingl k *cluster of differentiation*) antigeenid, mis kuuluvad erinevatesse klassidesse, näiteks integriinid, adhesioonimolekulid, glükoproteiinid ja retseptorid (Zhao *et al.* 2012).

1.2. PLURIPOTENTSUSMARKERID

1.2.1. OCT4

OCT4 ehk oktameere siduv transkriptsioonifaktor 4, mida kodeerib *POU5F1* (ingl k *POU class 5 homeobox 1*) ehk *OCT4* geen. OCT4 on imetajate pluripotentsete rakkude võtmeregulaator. Mistahes muutused *OCT4* ekspressioonis põhjustavad imetajate ES rakkude diferentseerumist (Wang, 2012).

Hiire *Oct4 knockdown* põhjustab ES rakkude endodermi diferentseerumiseks vajalike geenide üle-reguleerimist (nt GATA6, α -fetoproteiin) või diferentseerumist trofoblasti rakkude suunas (nt CDX2) (Niwa *et al.*, 2000; 2005). Mittediferentseerunud mES rakkudes endogeense *Oct4* ekspressiooni 50% vähenemine põhjustab diferentseerumist trofoektodermi rakkude suunas. *Oct4* ekspressiooni 50% suurenemine põhjustab diferentseerumist ekstraembrüonaalse endodermi või mesodermi suunas (Niwa *et al.*, 2000). Ka LIF puudumise korral spetsialiseerusid rakud ekstraembrüonaalse endodermi ja mesodermi suunas. Seega on pluripotentsetes rakkudes vajalik stabiilne *Oct4* ekspressioon, sest igasugused muutused põhjustavad diferentseerumist (Niwa *et al.*, 2000).

OCT4, NANOG, SOX2 transkriptsioonifaktorite kompleks on vajalik mES ja hES rakkude paljunemiseks ja pluripotentsuse säilitamiseks. Need kolm transkriptsioonifaktorit seonduvad üksteise geenide promootoritele ning moodustavad regulatoorse ringluse. Nii mõjutatakse autoregulatsiooni ja tagasiside mehhanismiga kõigi kolme vajaliku transkriptsioonifaktori sünteesi (Boyer *et al.*, 2005).

1.2.2. SOX2

SOX2 (ingl k *sex determining region Y-box 2*) on transkriptsioonifaktor, mis on oluline pluripotentsete tüvirakkude reguleerija (Adachi *et al.*, 2010). *SOX2* geen kodeerib SOX2 valku (Uniprot a.). SOX2 koos OCT4 ja NANOG transkriptsioonifaktoritega kontrollivad hES rakkude geeniekspressiooni, millega mõjutatakse pluripotentsuse säilitamist (Boyer *et al.*, 2005) ja diferentseerumist neuraalseteks progenitorideks (Adachi *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2012).

hES rakkudes on *SOX2* geeni ekspressioon vajalik, et säilitada pluripotentsus. *SOX2* ekspressiooni muutus põhjustab rakkude diferentseerumist trofoektodermi suunas. Urides kahte hES rakkude liini (HES-3 ja KhES1) ilmnes, et *SOX2* geeni deletsioonil langevad *OCT4* ja *NANOG* ekspressioon, seega näidati *SOX2* mõju *NANOG* ja *OCT4* ekspressioonile. Seejuures *SOX2* ekspressiooni märgataval vähenemisel toimus endodermaalsete markerite (*GATA6* ja *FOXA2*) ekspressiooni suurenemine (Adachi *et al.*, 2010). Seega *SOX2* on vajalik hES rakkude pluripotentsuse säilitamiseks, sest *SOX2* ekspressioon takistab diferentseerumist (Adachi *et al.*, 2010).

mES rakkudes on SOX2 kriitiline faktor suunamaks rakkude diferentseerumist ektodermaalses suunas ja säilitamaks neuraalsete progenitoride omadusi. SOX2 reguleerib mES rakkude spetsialiseerumist neuroektodermiks samal ajal kui OCT4 ja NANOG stimuleerivad diferentseerumist mesendodermi suunas, seega olles prekursoriks mesodermi ja definitiivsele endodermile (Thomson *et al.*, 2011). Ka hES rakkudes indutseerib SOX2 neuraalset induktsiooni ja võimendab ektodermaalset diferentseerumist. Samade autorite poolt on näidatud, et SOX2 repressseerib mesendodermaalset diferentseerumist (Wang *et al.*, 2012).

1.2.3. NANOG

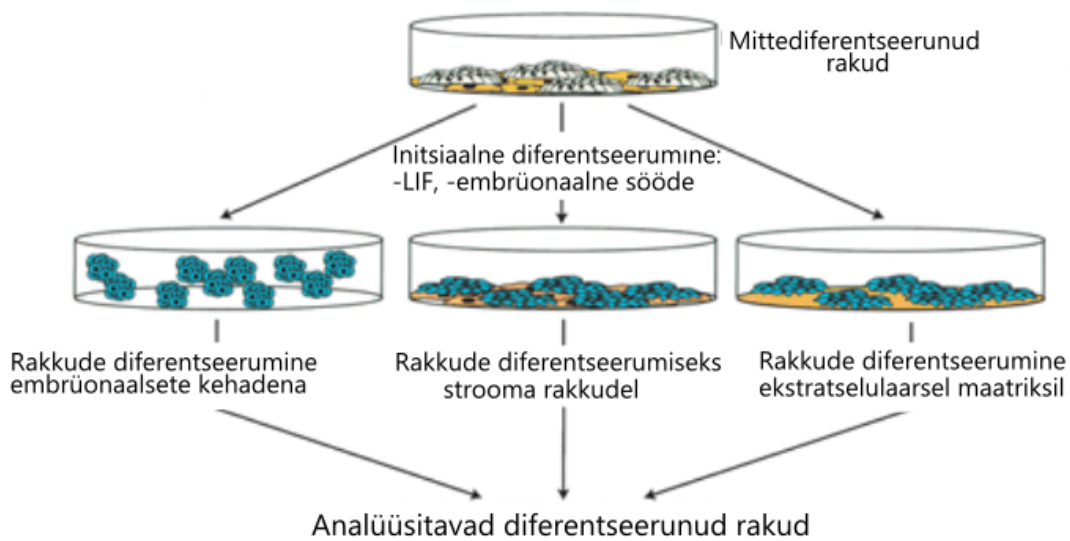
NANOG on homeojärjestuslik transkriptsioonifaktor, millel on oluline roll hES rakkude pluripotentsuse säilitamisel, olles väravahoidja ehk *gatekeeper*, mis hoiab ära diferentseerumist endodermi ja trofektodermi suunas (Hyslop *et al.*, 2005). Hilisemalt on näidatud, et hES rakkudes repressseerib NANOG neuroektodermi ja neuraalharja diferentseerumist (Wang *et al.*, 2012). mES rakkudes on NANOG võimeline säilitama rakkude ise-uenemist sõltumata LIF/STAT3 (ingl k *leukemia inhibitory factor/signal transducer ja activator of transcription 3*) juuresolekust söötmes. Katsete käigus näidati, et *Nanog knockout* mES rakkudel puudus võime moodustada epiblasti, kuid olid võimelised tootma ekstraembrüonaalse endodermi rakke. Seega järeldati, et NANOG soodustab ja on vajalik epiblasti moodustumiseks ning hoiab ära hüpoplasti tekke. Samuti on NANOG vajalik mES rakkude pluripotentsuse säilitamiseks. (Mitsui *et al.*, 2003). Seega on NANOG oluline mES ja hES rakkude pluripotentsuse säilimisel.

1.2.4. SSEA-3

SSEA-3 on glükolipiidne antigeen, mida ekspresseeritakse mittediferentseerunud hES rakkude plasmamembraanis. SSEA-3 on detekteeritav hES rakkudes, kuid mitte mES rakkudes (Lanza *et al.*, 2009). Need süsivesinik-seoselised molekulid kontrollivad raku pinnal olevaid interaktsioone kogu embrüonaalse arengu jooksul (Zhao *et al.*, 2012). Inhibeerides SSEA-3 biosünteesi ES rakkudes on näidatud, et rakkude pluripotentsuse säilitamist see ei mõjuta (Brimble *et al.*, 2007).

1.3. ES rakkude diferentseerumine

hES rakkude kasvatamisel kasutatakse tingimusi, mis säilitavad nende rakkude pluripotentsuse. Pluripotentsuse säilitamiseks kasvatati ES rakke algselt hiire embrüonaalsete fibroblasti (MEF) rakkudel, kuid nüüdseks on see asendatud ekstratsellulaarsete maatriksi (ECM) substraatidega (laminiin) või nende seguga (MatrigelTM), millega kaetakse rakukultuuri plaadid. hES rakkude kasvatamisel *in vitro* ei ole oluline LIF ja STAT3 signaalrajad erinevalt mES rakkude kasvatamisel, kuid oluline on bFGF olemasolu kasvukeskkonnas. Pluripotentsust soodustava kasvukeskkonna eemaldamine põhjustab ES rakkude diferentseerumist (Amit *et al.*, 2000). Vastavates tingimuste võivad ES rakud diferentseeruda endodermi, ektodermi ja mesodermi progenitori rakkudeks. ES rakkude diferentseerimiseks kasutatakse kolme meetodit. Esiteks, ES rakkudel lastakse agregeeruda ning moodustada 3D embrüonaalseid kehasid. Teine diferentseerimismeetod kasutab ES rakkude kasvatamist strooma rakkudel (Nakano *et al.*, 1994). Kolmas meetod on ES rakkude kasvatamine üherakulise kihina ECM valkudel vastavas diferentseerimist soodustavas keskkonnas. Kõik kolm meetodit on efektiivsed ja neil on omad eelised ja puudused. EB moodustamisel on eeliseks 3D struktuuri teke, kus on olulised rakk-rakk interaktsioonid, mis on vajalikud teatud diferentseerumiste jaoks. Samas on puuduseks see, et EB moodustamisel on tegemist väga kompleksete samaaegsete signaalradade moduleerimisega ning rakk-rakk interaktsioonidega. Seetõttu on keeruline interpreteerida tulemusi, kui soovitakse uurida ainult konkreetse rakutüübi progenitorideks spetsialiseerumist, kuna EB sees toimuvaid tsütokiinide ning teiste kasvufaktorite toimet on keeruline määrata. ES rakkude kasvatamine strooma rakkudel on komplitseeritud, sest strooma rakkude poolt produtseeritud kasvufaktorid ja nende kontsentratsioon võib olla raskesti määratav ning nende mõju diferentseerimisprotsessile mittesoovitav. Lisaks on hiljem sorteerimisel vajalik eraldada diferentseeritud rakud ja strooma rakud. ES rakkude kasvatamisel üherakulise kihina ECM valkudel väheneb naaberrakkude mõju diferentseerumisele, mis on üheks lihtsamaks ja kontrollitavamaks meetodiks. Selle meetodi korral on kõige olulisemateks ECM valkude valik ja spetsiifiliste kasvufaktorite ning ainete lisamine kasvukeskkonda, et mõjutada signaalrada sid, mis on vajalikud spetsiifiliste diferentseeritud rakkude saamiseks (Keller, 2005).



Joonis 1. ES rakkude diferentseerimise võimalused *in vitro* (Keller 2005, kohandatud).

1.4. ES rakkude diferentseerumine mesodermaalses suunas

Mesodermaalses suunas diferentseeruvad rakud spetsialiseeruvad kardiomiotsüütideks, vaskulaarseteks ja hematopoeetilisteks rakkudeks. Selleks, et kõrge tihedusega ES rakukultuuris diferentseerida kardiomiotsüüte, on vajalik aktiiv A ja BMP4 (ingl k *bone morphogenetic protein 4*) juuresolek. Südamelihase töö paranemine saavutati kardiomiotsüütide transplanteerimisel roti südamesse, kui lisati insuliini-sarnase kasvufaktor 1 ja mitmeid teisi kasvufaktoreid (Laflamme *et al.*, 2007). Hematopoeetiliste rakkude saamiseks on näidatud, et peale EB-de moodustamist soodustavad tsütokiin 3 ja tsütokiin 6 koos BMP4 kasvufaktoritega mesodermaalsete rakkude diferentseerumist (Chadwick *et al.*, 2003). EB-de diferentseerimisel on isoleeritud endoteeli rakke ja näidatud nende võime moodustada veresooni (Levenberg *et al.*, 2002). Nimetatud töö autorid näitasid, et diferentseerides EB-de meetodil, suurenes endoteeli-spetsiifiliste geenide ekspressioon, mis saavutas haripunkti 13-15. päeval. Kasutades PECAM-1 (ingl k *platelet endothelial cell adhesion molecule 1*) antikehasid, oli võimalik isoleerida endoteeli rakud EB-dest (Levenberg *et al.*, 2002).

1.4.1. Mesodermaalsete rakkude markerid

Varajases diferentseerumises olevate mesodermaalsete rakkude iseloomustamiseks võib kasutada erinevaid markereid. Raku pinnal on detekteeritav N-kaderiin, kuid E-kaderiini ekspressioon ei ole enam detekteeritav (Yang ja Weinberg, 2008). Mesodermaalsed progenitorid sekreteerivad ise mitmesuguseid faktoreid nagu aktiviin A, B, C, BMP-2/4, TGF- β 1,2,3, FGF-5, FABP4, WNT-3A ja WNT-8A. Transkriptsioonifaktoritest toodetakse BRACHYURY, EOMES, FOXC1, FOXF1, HAND1, MIX1, SNAI1, SNAI2, TBX6, TWIST-1 ja TWIST-2 (SpaceSrl). Lisaks sellele, et toodetakse mesodermi jaoks vajalikke valke, on oluline, et ei toodeta pluripotentsust iseloomustavaid transkriptsioonifaktoreid ja raku pinnamolekule. Sellest loetelust on pikaajalisem praktiline kogemus BRACHYURY ja HAND1 detekteerimisel antud uurimistöö juhendajal ning seetõttu kasutati neid ka antud töös iseloomustamiseks H9 rakkude varajast diferentseerumist mesodermi suunas (Kallas-Kivi *et al.*, 2016).

1.4.2. BRACHYURY

BRACHYURY on valk, mis mõjutab embrüonaalses arengus mesodermi arenemist ja diferentseerumist (Uniprot KB b.). Valku toodetakse inimeses *T* geenilt, mis asub 6. kromosoomi pika õla 27. positsioonilt. BRACHYURY on transkriptsioonifaktor, mida toodetakse *T-box* geenikompleksis. *T-box* geenikompleksilt sünteesitavad valgud reguleerivad teiste geenide aktiivsust kinnitades DNA-le. BRACHYURY-t on leitud nii bilateraalsetes loomadest kui ka ainuõssetes (Scholz ja Technau, 2003). 1927. a avastati *Brachyury* mutatsiooni hiirtel. Mutatsioon mõjutas heterosügootsete hiirte saba pikkust ja kaelalülide arvu. Homosügootsetel hiirtel oli *Brachyury* mutatsioon letaalne - embrüonaalse arengu 10. päevaks tekkisid defektid mesodermi moodustamisel ja notokordi diferentseerumisel. Samuti oli häiritud mõningate organismi struktuuride väljaarenemine posterioorsest osast kuni maksapungani (Dobrovolskaya-Zavadskaya, 1927; Korzh, 2001). Varajases mesodermaalses suunas diferentseerunud rakkudes on BRACHYURY leidnud kasutust kui mesodermaalne marker. *Brachyury* ekspressioon on indutseeritud BMP ja FGF signaaliradade poolt.

1.4.3. HAND1

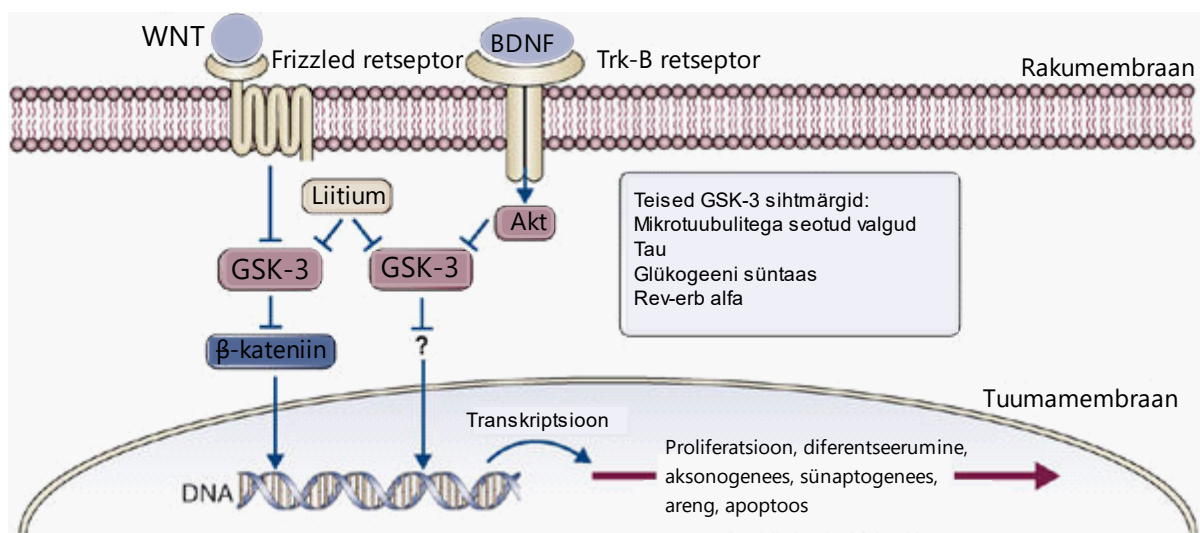
HAND1 (ingl k *heart- ja neural crest derivatives- expressed protein 1*) valk on heeliks-ling-heeliks transkriptsioonifaktorite perekonna liige, millel on kriitiline roll raku diferentseerumises ja organogeneesis, sealhulgas platsenta, kardiovaskulaarse- ja kraniofatsiaalse arengul (Morin *et al.*, 2005). HAND1 on transkriptsioonifaktor, mis võimaldab trofoblasti ja kardiomiotsüütide diferentseerumist. Kasutades *gene targeting* meetodit, uuriti *Hand1* mutantseid hiiri. 7,5 päeva vanustel homosügootsete mutantide embrüotel esinesid defektid trofoblasti rakkude diferentseerumises (Riley *et al.*, 1998). Hiirte suremuse vähendamiseks lisati metsiktüüpi tetraploidsed rakud, kus metsiktüüpi rakud soodustasid trofoblasti arengut, kuid ei mõjutanud embrüo arengut. Selle tagajärjel elasid tetraploidsetest kimäärdest pärinevad looted 10,5 päevani, kuid seejärel surid südamepuudulikkusesse (Riley *et al.*, 1998). HAND1 valk avastati südames, kus faktor piiras arteri- ja vasaku vatsakese arengut. HAND1 on otsene *Nppa* (ingl k *Natriuretic Peptide A*) geeni promooteri aktiveerija. *Nppa* kodeerib arteri natriureetilist faktorit A, mis on peamine südamelihase rakkude sekretoorne produkt ja seega mõjutab südame arengut (Morin *et al.*, 2005).

1.5. Wnt signaalrada

Wnt signaalrada edastab raku pinnal olevate retseptorite poolt saadud signaale raku. Praeguseks on kirjeldatud kolm Wnt signaalrada: kanooniline, mittekanooniline raku polaarsust mõjutav ja mittekanooniline Wnt/kaltsiumi signaalrada. Kõigi nende signaali ülekannete käivitamiseks on vajalik WNT valgu seondumine *frizzled* perekonna retseptoritele, mis seejärel edastab signaali Dsh (ingl k *dishevelled*) valgule raku sees. Kanooniline Wnt signaalrada mõjutab geenide ekspressiooni. Mittekanooniline Wnt/kaltsiumi rada reguleerib kaltsiumi taset raku sees. Mittekanooniline raku polaarsust reguleeriv rada mõjutab tsütoskeletti ja raku kuju. Wnt signalisatsioon võib pärineda naaberrakust (parakriinne) või samast rakust (autokriinne). See on oluline embrüonaalses arengus, reguleerides rakkude spetsialiseerumist, proliferatsiooni, migratsiooni ning organismi telje kujunemist. Wnt signalisatsioon indutseerib

pluripotentsete rakkude diferentseerumist mesodermi ja endodermi progenitorideks (Bakre *et al.*, 2007). Need progenitorid on võimelised järgnevalt diferentseeruma endoteeli-, hematopoeetilisteks rakkudeks ning südame- ja veresoonte lihasrakkudeks (Bakre *et al.*, 2007).

Wnt/ β -kateniini rada e. kanooniline signaalrada reguleerib multifunktsionaalse β -kateniini proteolüüsi. Wnt signaalraja aktiveerimisel akumuleerub β -kateniin tsütoplasmas, seejärel translokeerub tuuma, kus toimib kui TCF/LEF (T-raku faktor/ lümfoidne võimendaja-faktor) perekonna transkriptsiooni mõjutava kofaktorina. Ilma Wnt signaalsatsioonita β -kateniin degradeeritakse, sest moodustub degradatsioonikompleks. See koosneb vähemalt neljast valgust (Lanza *et al.*, 2009). Valgukinaas CK1 α (*casein kinase 1 α*) fosforüleerib β -kateniini Ser-45 ja seejärel Thr-41, Ser-37, Ser-33 (Wu ja Pan 2010). Seejärel seondub sellele kompleksile GSK-3, mis fosforüleerib β -kateniini edasiseks ubikviteerimiseks ja kiireks lagundamiseks proteasoomis. Kaks *scaffold* valku, aksiin ja adenoomne polüpoosne koli (APC), hoiavad valgukompleksi koos (Lanza *et al.*, 2009).



Joonis 2. Wnt signaalraja skeem. Wnt signaalrajas WNT glükoproteiinid interakteeruvad frizzled perekonna retseptoritega, et stimuleerida Dsh-vahendatud GSK-3 inaktivatsiooni. GSK-3 inhibitsioon takistab β -kateniini fosforüleerimise. Sellega jääb β -kateniin lagundamata ning saab toimida transkriptsioonifaktorina mõjutades TCF/ LEF perekonna transkriptsioonifaktorite signaali (Schloesser *et al.*, 2008, kohandatud).

Lisaks suudab Wnt signaalrada mõjutada ja reguleerida ka teisi signaalradu. Näiteks WNT võib seonduda GSK3-le raku proliferatsioonil. WNT inhibeerib GSK3 ja aktiveerib mTOR (ingl k *mammalian target of rapamycin*) signaalrada β -kateniini puudumisel. Samas võib WNT olla ka negatiivne mTOR signaalraja aktivaator, mis Dsh ja GSK3 interaktsiooni tagajärjel aktiveerib tumorsupressori TSC2 (ingl k *Tuberous Sclerosis Complex 2*) (Inoki *et al.*, 2006).

Wnt signaalirada on oluline organogeneesiks ja aitab kaasa rakkude diferentseerumisele. Näiteks LIF-1 sõltuv WNT3A soodustab trofoektodermi moodustumist mES rakkude

diferentseerumisel indutseerides CDX2 (ingl k caudal-type homeobox protein 2) sünteesi, mis on oluline transkriptsioonifaktor varases trofoblasti arengus. (He *et al.*, 2008). On tõendatud, et Wnt raja aktivatsiooniga indutseeritakse mES rakkudes mesodermaalset ja endodermaalset diferentseerimist ning sünteesitakse neile iseloomulikke markereid BRACHYURY, FLK-1, FOXA2, LHX1 ja AFP (Miki *et al.*, 2011).

Wnt raja aktivatsioon on vajalik efektiivseks diferentseerimiseks ja hilisemaks neuraalsete tüvirakkude kloonimiseks ning arenemiseks nii *in vitro* kui ka *in vivo* (Kalani *et al.*, 2008). Samas uuringud näitavad, et Wnt rajal on tähtis roll tüvirakkude pluripotentsuse säilitamisel, mis põhjustab mitmete pluripotentsusfaktorite sünteesi suurenemist (OCT4, NANOG, SOX2) (Sato *et al.*, 2004).

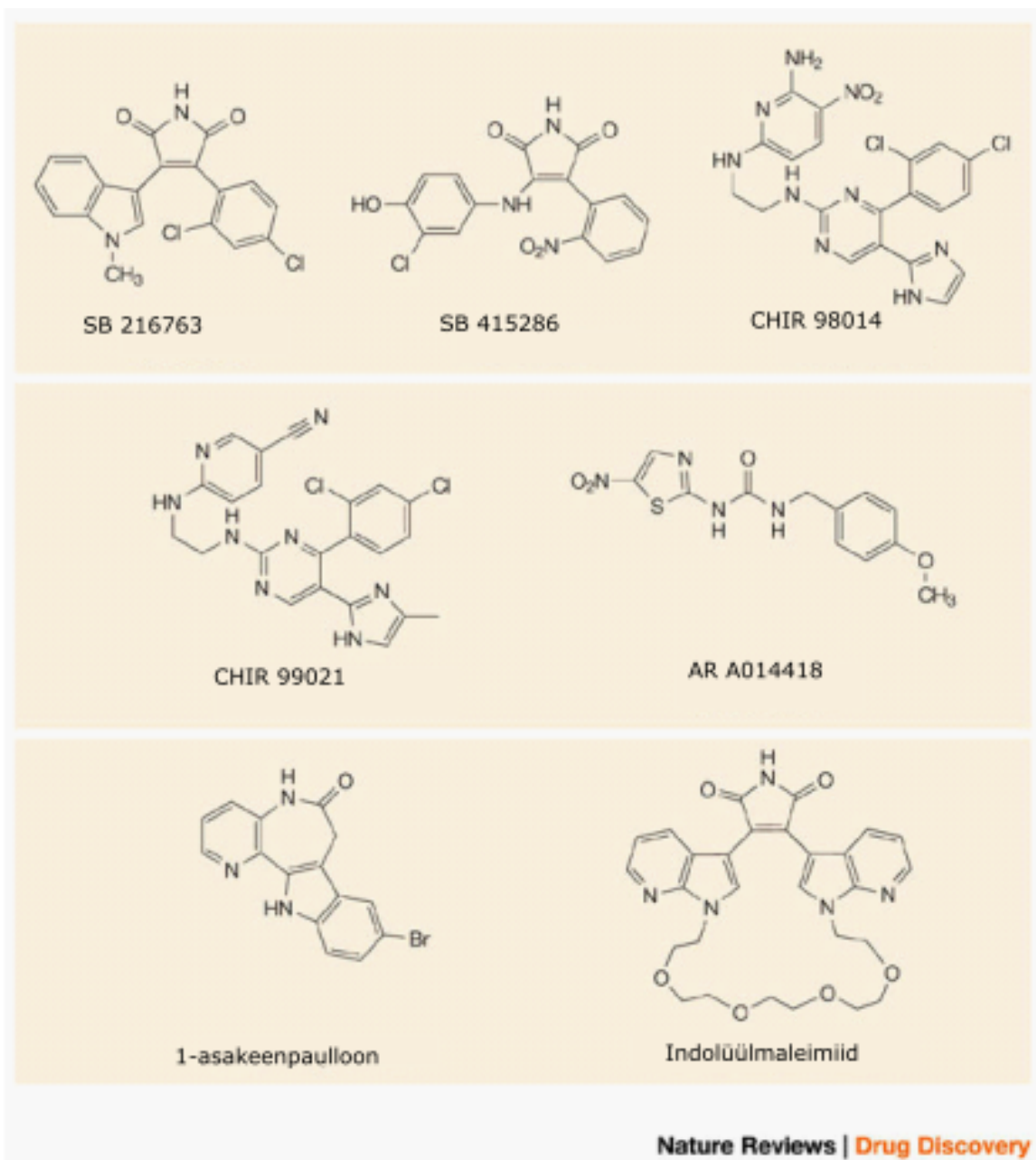
1.6. GSK-3 inhibiitorid

GSK-3 on seriini/treoniini kinaas, mis on konserveerunud signaalmolekul, omades rolli erinevates bioloogilistes protsessides. GSK-3 aktiivsuse muutust seostatakse mitmete haigustega, näiteks diabeediga, põletikudega, neurodegeneratiivsete- ja psühhiaatriliste haigustega. Seetõttu on GSK-3 inhibiitoreid disainitud ning uuritud intensiivselt *in vitro* tingimustes, et leida parim ühend terapeutiliseks kasutamiseks. GSK-3 inhibiitorid jaotatakse vastavalt mehhanismile ATP-konkureerivad, mittekonkureerivad inhibiitorid ja substraadiga konkureerivad inhibiitorid. Ühtedeks väikese molekulmassiga ATP-konkureerivateks sünteetilisteks inhibiitoriteks on puriini analoogid, mis on ka enim uuritud ühendid. Need sünteesiti firma Chiron poolt ning kannavad seetõttu oma nimes lühendit CHIR (Cohen ja Goedert, 2004).

Hiirte ES rakkudes on uuritud nelja keemiliselt sünteesitud GSK-3 inhibiitorit: BIO, SB216763, CHIR99021, CHIR-98014. Nendest uuritustest on kõige madalama toksilisusega CHIR99021 ja SB216763 mES rakkudes tehtud katsetes ning CHIR98014 ja BIO omasid kõige kõrgemat toksilisust (Ring *et al.*, 2003; Naujok *et al.*, 2014). Nendest keemilistest ühenditest ainult CHIR99021 ja CHIR98014 puhul toimus tugev Wnt/ β -kateniini raja induksioon ning BIO ja SB216763 näitasid minimaalset või mitte mingisugust mõju Wnt/ β -kateniini raja aktiveerimisele (Naujok *et al.*, 2014).

CHIR99021 ehk 6-[[2-[[4-(2,4-diklorofenüül)-5-(5-metüül-1H-imidasool-2-üül)-2-pürimidinüül]amino]etüül]-3-püridinekarbonitriil (PubChem) on sünteetiline väikemolekulaarne ühend, mis inhibeerib GSK-3 ja mõjutab kaudselt erinevate rakkude diferentseerumist, arengut, ja reprogrammeerimist. GSK-3 keemiline inhibitsioon viib kanoonilise Wnt-signaalraja aktivatsioonile.

mES rakkude pluripotentsus ja ise-uuenemine CHIR99021 mõjul näitas, et CHIR99021 aktiveerib Wnt/ β -kateniini signaalraja (Li *et al.*, 2011; Ying *et al.*, 2008). Kõrge aktiivsus ja väga madal toksilisus on CHIR99021 kasutamise eelisteks. Seega on CHIR99021-te kasutatud kui väga aktiivse ja kõrgelt selektiivse GSK-3 inhibiitorina mES rakkudes Wnt signaalraja moduleerimisel (Naujok *et al.*, 2014). CHIR99021 soodustab hES rakkudes diferentseerumist mesodermaalses suunas. Roti ES rakkude uurimisel näidati CHIR99021 kontsentratsioonist sõltuvat efekti diferentseerumisgeenide ja pluripotentsusgeenide ekspressioonile (Chen *et al.*, 2013). Seega on CHIR99021 mõju nii hiire kui ka roti ja inimese ES rakkudele erinev.



Joonis 3. GSK-3 inhibiitorite keemiline struktuur (Cohen ja Goedert 2004, kohandatud).

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1. Töö eesmärgid

Antud uurimistöö eesmärgid:

- 1. Uurida CHIR99021 mõju H9 rakkudele pluripotentsust soodustavas ja diferentseerumist soodustavas keskkonnas.**
- 2. Uurida, kas CHIR99021 mõjutab H9 rakkude diferentseerumist embrüonaalseteks kehadeks.**

2.2. Materjal ja meetodika

2.2.1. H9 rakkude kasvatamine

Antud töös kasutati inimese hES rakkude rakuliini H9 (WA09) (WiCell Research Institute, National stem Cell Bank, USA). Tüvirakud kasvatati ja paljundati (passeeriti) Tartu Ülikooli rakubioloogia laborandi Annika Trei poolt. Katsetes kasutati H9 rakke, mille passaažinumber oli väiksem kui 50. H9 rakud kasvatati MatrigelTM (BD Biosciences, USA) kaetud 6-kannulistes või 4-kannulistes koekultuuri plaatides mTeSR1 söötmes (STEMCELL Technologies Inc., Vancouver, Kanada) koekultuuri inkubaatoris 5% CO₂ ja 37°C juures. Söödet vahetati iga päev ning 3-4 päeva järel jagati (passeeriti) rakud uuele 6-kannulisele plaadile, mis oli kaetud uue maatriksiga MatrigelTM. Jagamine toimus mehaaniliselt: rakukolooniaid eemaldati substraadilt ning kolooniate tükid viidi uuele rakukultuuri plaadile. Immuunfluorestsents analüüsi jaoks kasvatati H9 rakke 4-kannulistes plaatides, mille põhjas oli MatrigelTM-i substraadiga kaetud mikroskoobi katteklase.

2.2.2. Antikehad ja reagentid

Reagentid:

CHIR 99021 osteti firmalt Sigma-Aldrich, USA.

Primaarsed antikehad:

1. OCT4 spetsiifiline hiire monoklonaalne antikeha, sc-5279, 200 µg/ml, 1:100, Santa Cruz Biotechnology, USA
2. SSEA-3 spetsiifiline hiire antikeha, 1 µg/ml, 1:40, E- Bioscience, USA
3. Inimese HAND1 spetsiifiline kitse antikeha, 2 µg/ml, 1:100, R&D-Systems, Suurbritannia
4. CD184 (ingl k *cluster of differentiation 184*) - spetsiifiline hiire antikeha fikoerütriini (PE) konjugaat, 1:20, Santa Cruz Biotechnology, USA
5. SOX2 -spetsiifiline hiire antikeha PerCP-Cy™ konjugaat 1:20, BD Pharmigen, USA
6. Nestiini-spetsiifiline hiire antikeha Alexa Fluor 647 konjugaat, 1:20, BD Pharmigen, USA
7. Inimese Brachyury spetsiifiline kitse antikeha Northern Light 557 konjugaat, 1:120, R & D Systems, USA

Sekundaarsed antikehad:

1. Hiire immunoglobuliinide spetsiifiline kitse antikeha, konjugeeritud Alexa Fluor 488, 1:1000, Invitrogen, USA
2. Hiire immunoglobuliinide spetsiifiline kitse antikeha, konjugeeritud Alexa Fluor 555, 1:1000, Invitrogen, USA
3. Roti immunoglobuliinide spetsiifiline kitse antikeha, konjugeeritud Alexa Fluor 488, 1:1000, Invitrogen, USA
4. Kitse immunoglobuliinide spetsiifiline eesli antikeha, konjugeeritud Alexa Fluor 594, 1:1000, Invitrogen, USA

2.2.3. H9 rakkude mõjutamine CHIR99021

CHIR99021 mõju uurimiseks H9 rakkudele kasvatati rakke kolmes erinevas kasvukeskkonnas CHIR99021 juuresolekul pluripotentsust soodustavas või diferentseerumist soodustavas keskkonnas ja ilma CHIR99021 lisamiseta pluripotentses keskkonnas. Pluripotentsust soodustavas keskkonnas kasutati mTeSR1 söödet ja diferentseerumist soodustavas keskkonnas Essential 6 (E6, Thermo Fisher Scientific, USA). Kuna diferentseerumist soodustavas keskkonnas kasvavad H9 rakud eemalduvad MatrigelTM maatriksilt ning moodustavad 3D struktuure ehk embrüonaalseid kehasid, siis immunofluorestsentsiliseks analüüsimiseks ei ole võimalik neid kasutada. Enne CHIR99021 lisamist kasvatati rakke 3 päeva. Seejärel eemaldati mTeSR1 sööde ning lisati sööde, mis sisaldas 3 μM CHIR99021 ja rakke kasvatati 24 h koekultuuri inkubaatoris 5% CO₂ ja 37°C juures. Seejärel rakud analüüsiti või eemaldati embrüonaalsete kehade tegemiseks (mTeSR1 söötmes kasvanud rakud). CHIR99021 kasutatud kontsentratsioon on valitud sarnane eelnevalt publitseeritud andmete alusel (Ware *et al.*, 2014; Theunissen *et al.*, 2014; Galbha *et al.*, 2015). Antud CHIR99021 kontsentratsiooni on kasutatud antud uurimistöö juhendaja poolt mesodermaalse diferentseerimisprotokolliga jaoks ning tulemused on publitseeritud (Kallas-Kivi *et al.*, 2016).

2.2.4. Embrüonaalsete kehade moodustamine

Embrüonaalsete kehade moodustamiseks eemaldati eelnevalt mTeSR1 söötmes CHIR99021 juuresolekul või ilma selleta kasvanud rakukoloniatelt sööde ning lisati diferentseerimissööde E6. Seejärel eemaldati H9 rakukoloniasid mehaaniliselt pipetiotsikuga ning viidi teisele 6-kannulisele madala seondumisvõimega koekultuuri plaadile. EB-de teket jälgiti järgmised 7 päeva. Söödet vahetati 2 päeva järel. EB tõsteti 8. päeval želatiiniga kaetud 6-kannulistes plaatidele E6 söötmes. Želatiiniga katmiseks kasutati 0.1% želatiini lahust vees (PAA Laboratories, USA), mis lisati koekultuuriplaadi kannu ning inkubeeriti koekultuuri plaati 37°C juures 30 min, seejärel želatiini lahus aspireeriti, kuivatati 37°C juures 10 min ning kannudesse lisati 7 päeva vanused EB-d koos E6 söötmeaga. EB-d kinnitusid želatiinile esimese 24 h jooksul. Seejärel vahetati söödet 2 päeva järel.

2.2.5. Immunofluorestsentsmeetod pluripotentsusmarkerite jadiferentseerumismarkerite määramiseks

CHIR99021 mõju H9 rakkudele analüüsiti immuno fluorestsentsmeetodil. Rakke kasvatati 24 h ning seejärel rakud fikseeriti kaheetapilist meetodit kasutades ning inkubeeriti vastavate antikehadega. Esmalt lisati rakkudel olevale söötmele 100 µl 4%-list paraformaldehüüd (PFA) lahust PBS puhverlahuses, inkubeeriti 2 min toatemperatuuril. Seejärel lahus eemaldati ning lisati 500 µl 4% PFA lahust ning inkubeeriti 10 min toatemperatuuril. Seejärel pesti rakud PBS puhvriga ning inkubeeriti 4°C, et analüüsida järgneval päeval. Seejärel PBS puhver aspireeriti ning rakud permeabiliseeriti kasutades permeabiliseerimispuhvrit (Permeabilisation Buffer, eBioscience, USA) 10 min. Peale permeabiliseerimist, lahus aspireeriti ning rakud blokeeriti PBS puhvriga, mis sisaldas 2% NGS (ingl k *normal goat serum*) ja 1% BSA (ingl k *bovine serum albumin*) 10 min toatemperatuuril. Sõltuvalt edasistest antikehadest kasutati blokeerimisel NGS asemel eesli seerumit blokeerimislahuses (2% PBS puhvis, Abcam, Suurbritannia). Seejärel blokeerimislahus eemaldati ning lisati primaarset antikeha sisaldav lahus TBS puhvis ning inkubeeriti 1 h. Seejärel rakke pesti 4 korda 3 min TBS lahusega, mis sisaldas 0,01% Tween 20. Peale pesemist lisati sekundaarse antikeha lahus TBS puhvis ning inkubeeriti pimedas 1 h. Seejärel rakke pesti 3 korda uuesti TBS puhverlahusega ja lisati rakutuumade visualiseerimiseks DAPI (ingl k *4',6'-diamidino-2-phenylindole*) lahus (1:1000) TBS puhvis ning inkubeeriti 3 min. Lahus aspireeriti ning lisati PBS puhver ja mikroskoobi katteklasil olevad rakud sulustati vastavasse paigaldusmeediumisse (fluorestsentsmeedium).

2.2.6. Rakkude analüüs läbivoolutsütomeetrial

Läbivoolutsütomeetriat (FACS) kasutati embrüonaalsete kehade rakkudes diferentseerumismarkerite kvantitatiivseks määramiseks.

EB koguti koos söötmega 15-ml tsentrifuugituubi ja tsentrifuugiti 170 x g 2 min toatemperatuuril. Seejärel sööde eemaldati ning rakkudele lisati 450 µl PBS lahust ning intensiivsel pipeteerimisel saadi rakkude suspensioon. Rakususpensioonile lisati 300 µl 4% PFA lahust PBS puhvis ning inkubeeriti 10 min toatemperatuuril. Seejärel lisati PBS lahus, mis sisaldas 2% FBS (ingl k *fetal bovine seerum*) ning rakud tsentrifuugiti 200 x g 5 min

toatemperatuuril. Seejärel rakkudele eemaldati lahus ning rakud suspendeeriti permeabiliseerimispuhvril ning loeti rakkude arv hemotsütoomeetriga. Rakususpensioon pipeteeriti 96-kannulisele mikroplaadile nii, et kannus oli 3×10^5 kuni 5×10^5 rakku. Mikroplaat tsentrifuugiti $300 \times g$ 3 min toatemperatuuril ning seejärel lahus eemaldati rakkude sademelt mikroplaadi kannu põhjas. Rakkudele kannu põhjas lisati 50 μ l permeabiliseerimispuhvril, mis sisaldas 2% NGS ning inkubeeriti 10 min toatemperatuuril. Seejärel lisati 50 μ l primaarse antikeha lahust permeabiliseerimispuhvrilisse ning inkubeeriti 30 min toatemperatuuril pimedas. Seejärel rakud pesti lisades 200 μ l permeabiliseerimispuhvril ning tsentrifuugiti $300 \times g$ 3 min toatemperatuuril. Lahus eemaldati ning rakkudele lisati 100 μ l PBS puhvril, mis sisaldas 1% BSA ning 2 mM EDTA (läbivoolutsütoomeetria puhver). Rakususpensioon filtreeriti läbi 30 μ m filtri, et ei sisaldaks rakuagregaate ning lisati 300 μ l läbivoolutsütoomeetria puhvril, mis sisaldas DAPI lahust (1:1000). Saadud rakususpensioon analüüsiti läbivoolutsütoomeetriga FACS Aria™ I (BD Biosciences, USA) kasutades tarkvara BD FACSDiva™ (versioon 8.0.)

Läbivoolu tsütofluorimeetriseliseks analüüsiks primaarsete antikehadena kasutati inimese CD184-spetsiifilist PE konjugeeritud antikeha, SOX2-spetsiifilist PerCP-Cy™ konjugaati ja nestiini-spetsiifilist Alexa Fluor 647 konjugaati. Immunoglobuliini isotüübi kontrollidega proovid valmistati sarnaselt, kuid primaarse antikeha asemel kasutati isotüübi kontrolli antikeha. Analüüsid teostati 7. ja 14. päeval.

2.2.7. Valgusmikroskoopia

CHIR99021 mõju uurimiseks rakkude morfoloogiale jäädvustati H9 rakkude kolooniad ja embrüonaalsed kehad kasutades valgusmikroskoopi suurendustega 1x, 4x ja 6,3x. Rakkude arvu ja pindala mõõtmiseks kasutati vabavara programmi Fiji (avaldatud 30.05.2017, USA).

2.2.8. Rakkude arvu määramine hemotsütomeetri kambris

Läbivoolutsütomeetria proovide valmistamiseks oli vajalik teada rakkude arvu uuritava proovis. Rakkude arvu määramiseks pipeteeriti 10 µl fikseeritud rakkude rakususpensiooni hemotsütomeetri kambrisse ning loeti rakkude arv kasutades valgusmikroskoopi.

2.2.9. Andmete statistiline analüüs

EB arvu ja nende suuruse võrdlemisel kasutati *student*-i t-testi MS Excel (versioon 15.0, avaldatud 12.04.2016), kus 95% tõenäosuse ja $p < 0,05$ väärtuse korral arvestati, et tulemused on statistiliselt erinevad. Tulemuste esitamisel on kasutatud aritmeetilist keskmist ja selle standardviga. Läbivoolutsütomeetria tulemusi analüüsiti programmiga Flowing software (versioon 2.5.1, avaldatud 4.11.2013, Soome).

Fluorestsentsi intensiivsuse kvantiteerimisel kasutati samuti Fiji programmi, kus muudeti pilt esmalt 8-bitiliseks must-valgeks pildiks ning järgnevate sätetega detekteeriti halli värvi intensiivsus üksikrakkudes. Saadud tulemused analüüsiti t-testiga.

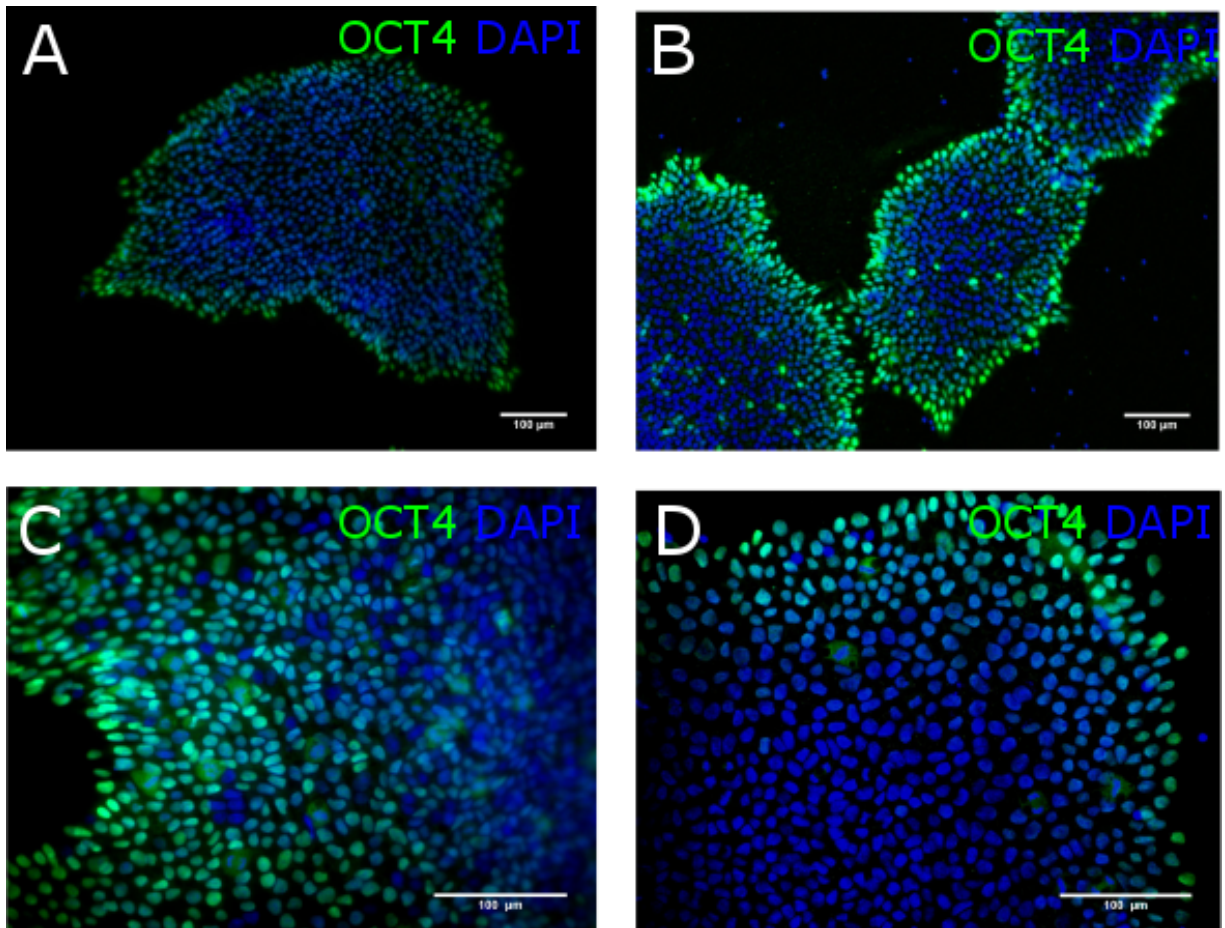
2.3. Tulemused ja arutelu

2.3.1 GSK-3 inhibeerimise mõju H9 rakkude pluripotentsusele

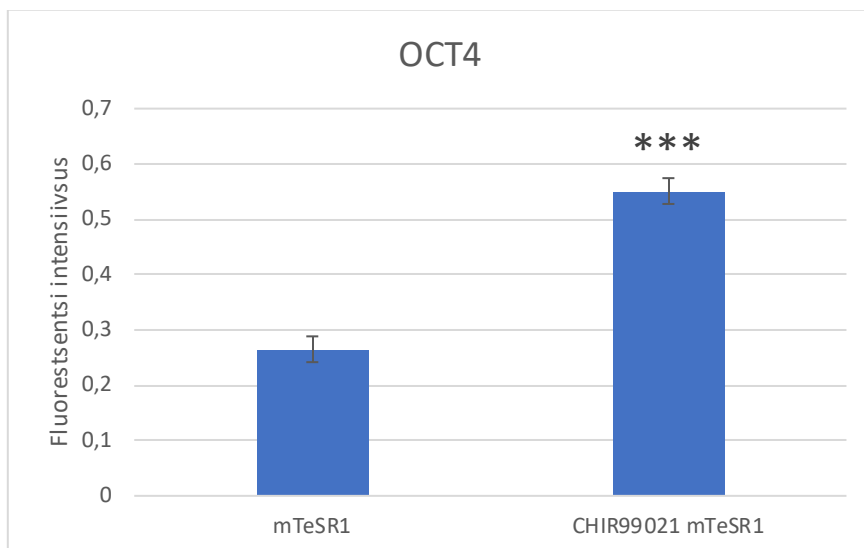
H9 rakkude pluripotentsuse säilitamisel *in vitro* tingimustes on vajalikud vastavad kasvutingimused, sealhulgas vastava maatriksi olemasolu ning kasvufaktorite rikas sööde. Sellegipoolest võivad H9 rakud spontaanselt diferentseeruda keskkonna muutuste ning mistahes manipulatsioonide tõttu. Seetõttu on vajalik H9 rakkude kasvatamiseks leida sellised ained (ühendid), mille lisamisel saadakse rakkude pluripotentsust säilitada. Esmalt uurisime GSK-3 inhibiitori CHIR99021 mõju H9 rakkude pluripotentsusele. Pluripotentsuse

hindamiseks detekteeriti transkriptsioonifaktori OCT4 valgu ekspressioon fluorestsentsmikroskoobiga.

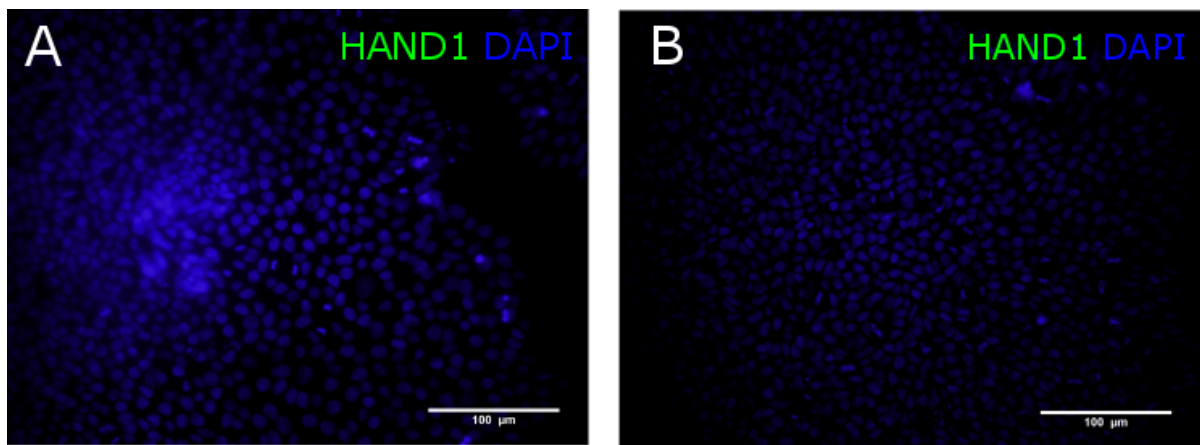
Tulemuste analüüsil täheldati, et CHIR99021 juuresolekul mTeSR1 söötmes suurenes OCT4 sünteesivate rakkude arv võrreldes mõjutamata rakkudega, milleks olid mTeSR1 söötmes kasvanud rakud (joonis 4 ja 5). Selles katses kasutati H9 rakke, mille passeerimise arv oli 48. OCT4 valgu tase suurenes, millest võis järeldada, et rakud säilitasid pluripotentsuse. Difereentseerumise uurimiseks uuriti HAND1 valgutaset ning täheldati, et HAND1 valgu tase ei olnud detekteeritav (joonis 6). Antikehade spetsiifilisuse kontrollimiseks kasutasime rakkude inkubeerimist sekundaarse antikehaga (joonis 7). Seega CHIR99021 soodustas pluripotentsuse säilitamist H9 rakkudes.



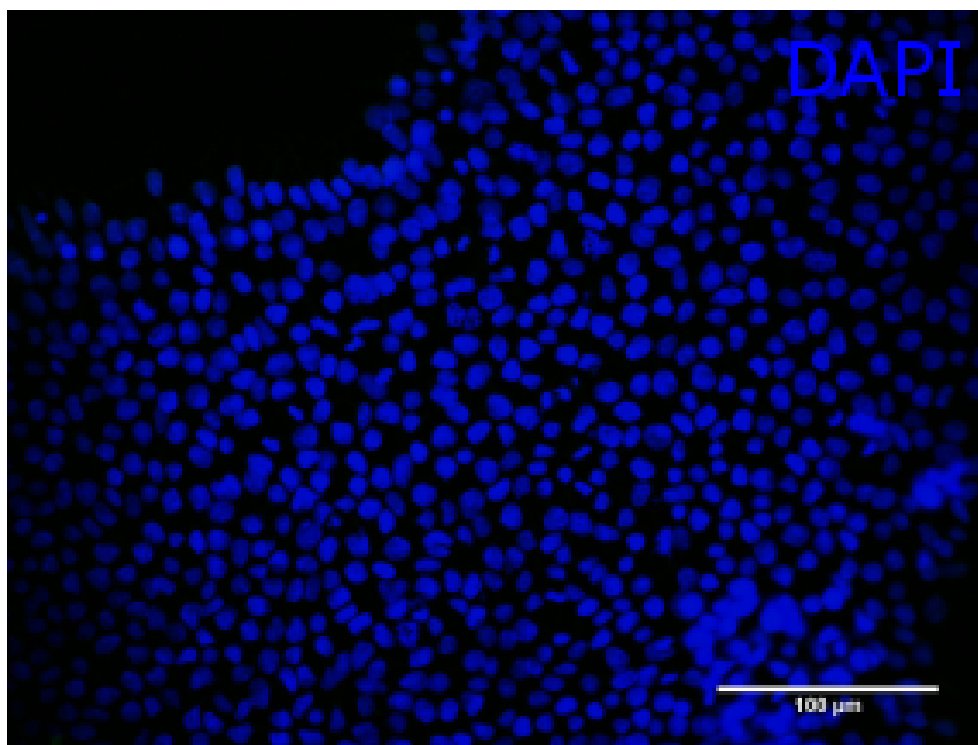
Joonis 4. OCT4 valguga tase H9 rakkude koloonias mTeSR1 ja CHIR99021 juuresolekul. A., C. mTeSR1 söötmes kasvatatud H9 rakukoloonia. B., D. CHIR99021 juuresolekul mTeSR1 söötmes kasvatatud H9 rakukoloonia.



Joonis 5. OCT4 fluoretsentsi intensiivsus H9 rakkude koloonias mTeSR1 ja CHIR99021 juuresolekul. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.



Joonis 6. HAND1 valgu tase H9 rakkude koloonias mTeSR1 ja CHIR99021 juuresolekul. **A.** mTeSR1 söötmes kasvatatud H9 rakkude koloonia, **B.** CHIR99021 juuresolekul mTeSR1 söötmes kasvatatud H9 rakukoloonia.



Joonis 7. Antikehade afiinsuse kontrollimiseks inkubeeriti H9 rakke ainult sekundaarse antikehaga.

2.3.2 GSK3-inhibeerimise mõju H9 rakkudele pluripotentsust soodustavas ja diferentseerumist soodustavas keskkonnas

Wnt signaalrada on oluline nii ES rakkude pluripotentsuse säilitamisel kui ka diferentseerumisel. Järgnevalt uurisime, kas GSK-3 inhibeerimisel on erinevus, kui kasvukeskkonnaks on pluripotentsust või diferentseerumist soodustav keskkond. Kasutatud söötmete erinevus esines selles, et E6 sööde ei sisalda kasvufaktoreid bFGF ja TGF- β (ingl *transforming growth factor beta*), mis on vajalikud FGF ja TGF- β signaaliradade aktivatsiooniks pluripotentsuse säilitamisel. H9 rakke kasvatati 24 h pluripotentsust soodustavas söötmes mTeSR1, millele oli lisatud CHIR99021 ning diferentseerumist soodustavas söötmes E6, mis sisaldas CHIR99021. Tulemusi võrreldi rakkudega, mida kasvatati mTeSR1 söötmes ilma CHIR99021 lisamiseta. Rakke analüüsiti 24 h pärast pluripotentsusmarkerite OCT4 ja pinnamarker SSEA-3 ning diferentseerumismarkeri BRACHYURY tasemete suhtes. Selles katses kasutati H9 rakke 43. passaažist, kuid sellele katsele eelnevalt oli rakkudele lisatud 2-kordne kogus mTeSR1 söödettavalise 1-kordse koguse asemel.

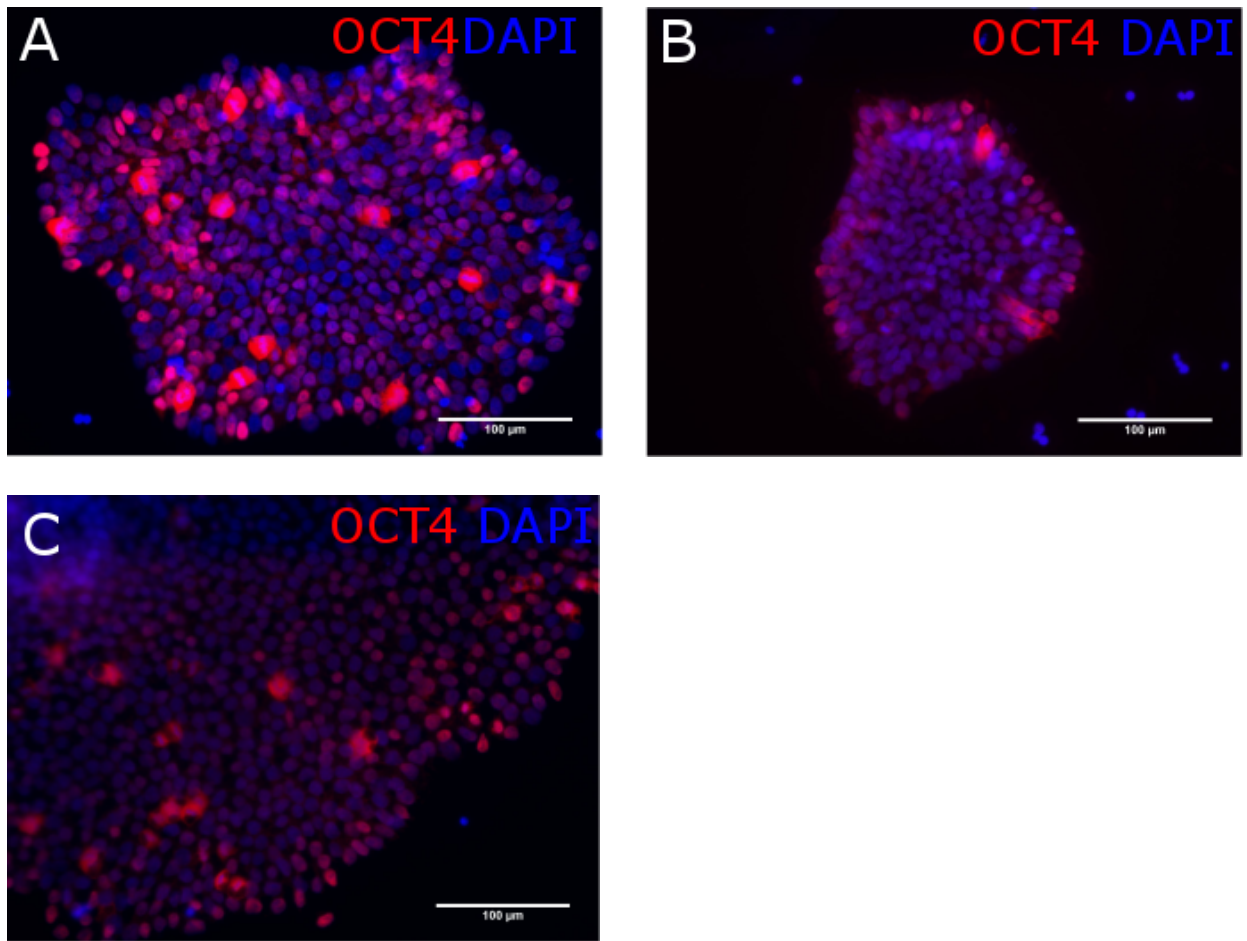
OCT4 valgutase suurenes CHIR99021 juuresolekul mTeSR1 söötmes kasvatatud rakkudel ning seda eriti koloonia äärtes olevates rakkudes (joonis 8) ning järelkult säilitasid rakud pluripotentsuse sarnaselt eelpool kirjeldatud eksperimendis. Kui rakke kasvatati E6 söötmes (ilma bFGF) CHIR99021 juuresolekul, siis rakkude OCT4 valgu tase vähenes märgatavalt. Täpsemal kvantiteerimisel ilmnas, et OCT4 valgutase oli pluripotentses keskkonnas CHIR99021 juuresolekul kasvanud rakkudes siiski mõnevõrra langenud, kuid mitte nii märgatavalt kui rakkudes, mida kasvatati diferentseerumist soodustavas keskkonnas. Kuna antud rakkude kasvatamisel esines tavapärasest kasvatamisprotokollist kõrvalekalle, siis erinevust eelmise katse tulemustest saab põhjendada sellega, et H9 rakud on väga tundlikud mistahes keskkonna muutuste suhtes.

Pluripotentsuse säilimist CHIR99021 juuresolekul pluripotentses keskkonnas kinnitas plasmamembraanis detekteeritav SSEA-3 (joonis 10). Samuti oli SSEA-3 glükosfingolipiidide tase rakumembraanil madalam diferentseerimiskeskkonnas kasvatatud rakkudega ning vaevu detekteeritav koloonia ääres olevatel rakkudel võrreldes pluripotentses keskkonnas kasvatatud rakkudega. Kui vaatlesime koloonia äärtes toimunud muutusi (joonis 10 parempoolne paneel), siis ilmnas, et CHIR99021 juuresolekul ja ilma selleta pluripotentsust soodustavas keskkonnas

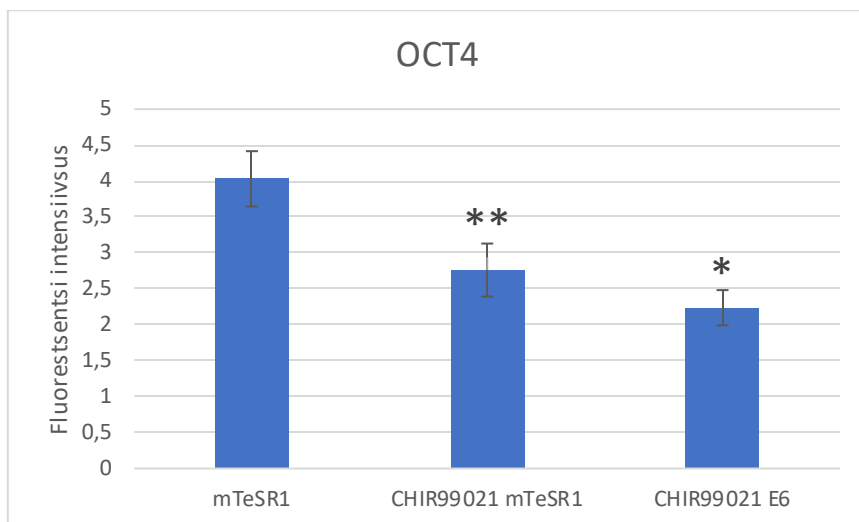
oli SSEA-3 valgutase detekteeritav, kuid CHIR99021 juuresolek diferentseerumist soodustavas keskkonnas põhjustas SSEA-3 valgutaseme vähenemise. Märkatavad muutused toimusid koloonia äärtes olevatel rakkudel, mis viitas sellele, et nendel rakkudel on eelsoodumus diferentseerumiseks sõltuvalt raku asukohast koloonias.

Rakkude diferentseerumise uurimiseks kasutasime varajast mesodermaalses suunas diferentseerumist iseloomustavat transkriptsiooni faktorit BRACHYURY. Diferentseerumismarkeri BRACHYURY valgu tase oli suurem CHIR99021 ja E6 söötmes kasvanud rakkudel võrreldes mTeSR1 söötmes kasvatatud rakkudega, seda nii CHIR99021 juuresolekul või ilma (joonis 11). BRACHYURY valgu tase oli vaevu detekteeritav CHIR99021 juuresolekul mTeSR1 söötmes kasvatatud rakkudel ning puudus mTeSR1 söötmes kasvatatud rakkudel. Sellest võib järeldada, et mTeSR1 söötme kasutamisel efektiivset diferentseerumist ei toimunud ning rakud olid pluripotentsed.

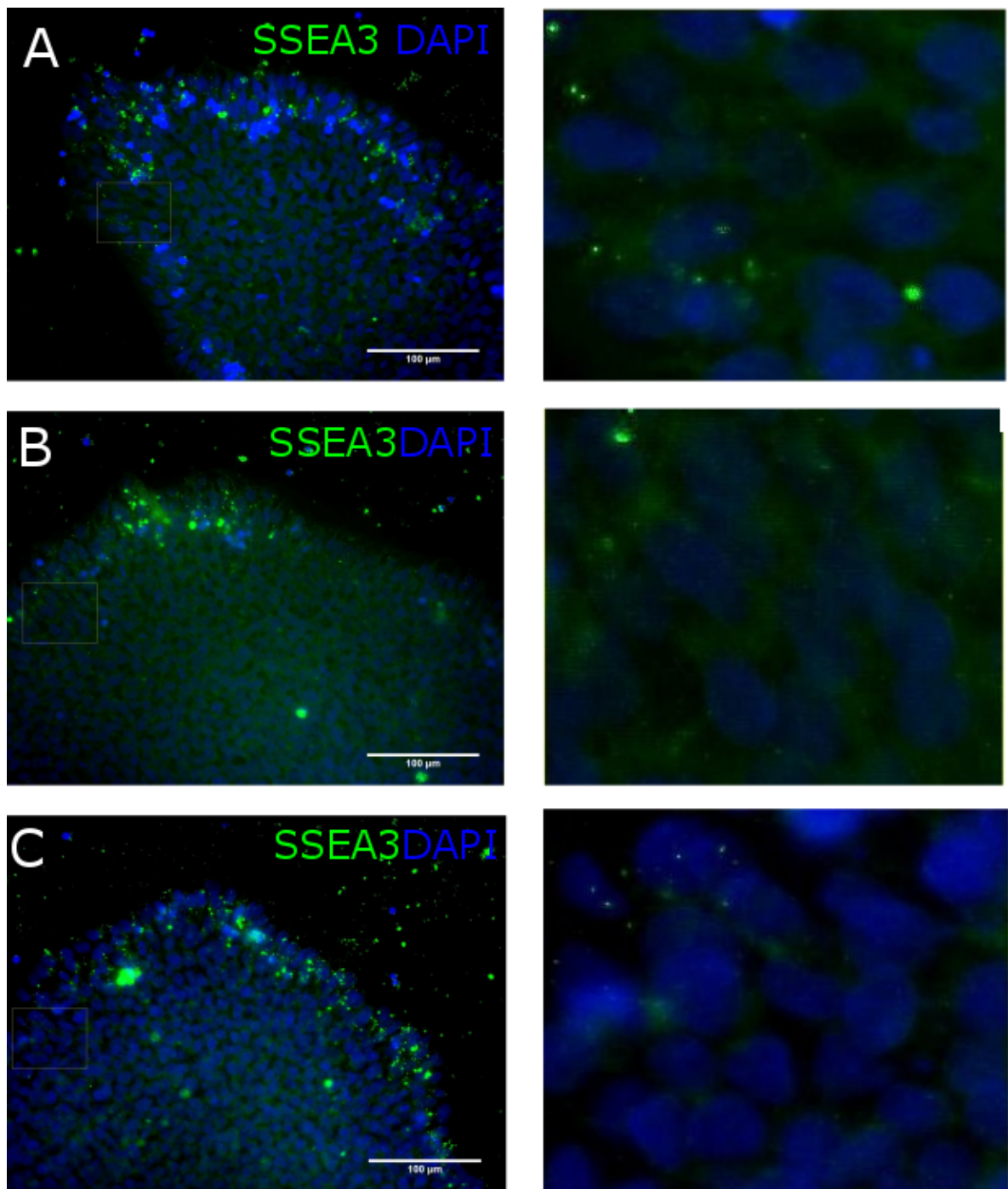
Seega GSK-3 inhibiitor CHIR99021 soodustab pluripotentsuse säilitamist sellises kasvukeskkonnas, mis soodustab pluripotentsust, kuid potenseerib diferentseerumist mesodermaalses suunas diferentseerumist soodustavas keskkonnas. Töö tulemused on kooskõlas Xu ja kaasautorite poolt publitseeritud tulemustega, kus näidati, et hES rakkudes Wnt signaaliraja aktiveerimine hoiab hES rakke nn *naive* ehk primitiivses olekus (Xu *et al.*, 2016). Samuti näidati nende autorite poolt, et CHIR99021 ei indutseeri hES rakkude apoptoosi ega mõjuta rakutsükli, kuid vähendab proliferatsiooni. Samas tuleb arvestada, et hES rakud on võimelised ilmselt ise produtseerima Wnt ligande, mis soodustavad β -kateniini aktivatsiooni ning hoiavad autokriinse regulatsiooni kaudu naiivsetes hES rakkudes ja mES rakkudes Wnt/ β -kateniini signaaliraja aktiivsetena. MEF ja mES rakkudel on näidatud, et need rakud sekreteerivad mitmeid WNT ligande (Berge *et al.*, 2011; Hao, 2006; Li *et al.*, 2011). Võrreldes primitiivseid hES rakke ja nn *primed* ehk eelsoodumusega rakke, on leitud RNA-seq analüüsil, et mRNA-d, mis kodeerivad WNT ligande on suurenenud primitiivses olekus (Sperber *et al.*, 2015). Rekombinantset WNT3A kasutades on näidatud, et see soodustab primitiivsetes hES rakkudes ise-uuenemist, kui Wnt signaalrada oli eelnevalt inhibeeritud. Samas Wnt ligandidest WNT5A kasutamine sellist tulemust ei andnud ning seetõttu arvatakse, et ligandidel on erinev võime aktiveerida Wnt signaalirada (Xu *et al.*, 2016). Naiivsed ELF1 hES rakud, mida inkubeeriti WNT inhibiitoriga omasid mõningaid nn eelsoodumust iseloomustavate spetsiifiliste valkude ekspressiooni ning selliste valkude ekspressiooni, mis olid erinevad nii primitiivsetel kui nn eelsoodumusega tüvirakkudel (Xu *et al.*, 2016). Kuivõrd GSK-3 inhibiitoriga mõjutamisel pluripotentsust ja diferentseerumist soodustavas keskkonnas produtseerivad H9 rakud ise WNT ligande, vajab edasist uurimist.



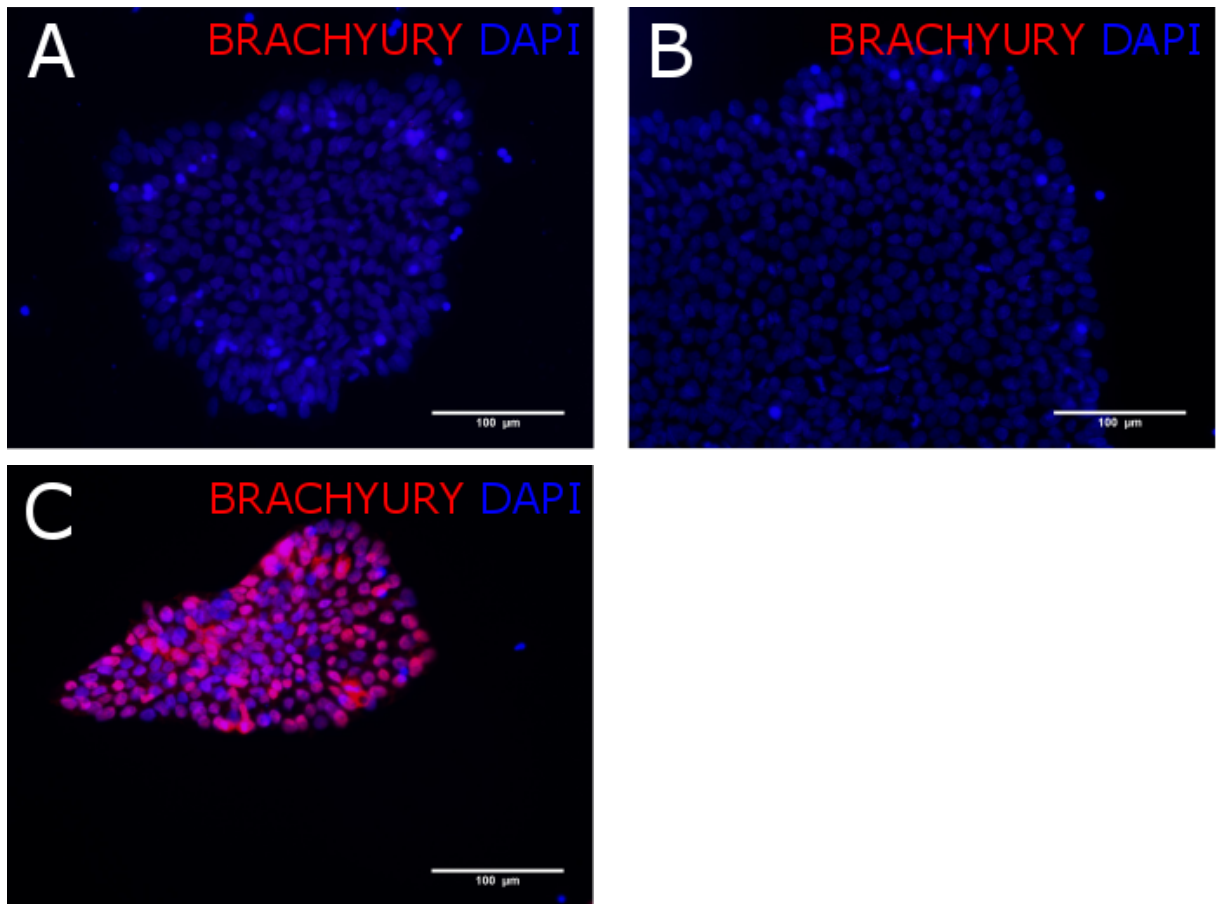
Joonis 8. OCT4 valgu tase H9 rakukoloonias CHIR99021 juuresolekul pluripotentsust (mTeSR1) ja diferentseerimist soodustavas (E6) keskkonnas. **A.** mTeSR1 söötmes kasvatatud H9 rakukoloonia, **B.** CHIR99021 juuresolekul mTeSR1 söötmes kasvatatud H9 rakukoloonia. **C.** CHIR99021 juuresolekul E6 söötmes kasvatatud H9 rakukoloonia.



Joonis 9. OCT4 fluorestsentsi intensiivsus H9 rakukoloonias CHIR99021 juuresolekul pluripotentsust (mTeSR1) ja diferentseerimist soodustavas (E6) keskkonnas võrreldes ilma CHIR99021 lisamiseta kasvatatud rakkudega (mTeSR1). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.



Joonis 10. SSEA-3 glükosfingolipiidide tase H9 rakukoloonias CHIR99021 juuresolekul pluripotentsust (mTeSR1) ja diferentseerimist soodustavas (E6) keskkonnas. Parempoolsel paneelil on suurendus koloonia piirkonnast, mis on näidatud ruudu sees.



Joonis 11. BRACHYURY ekspressioon H9 rakukoloonias CHIR99021 juuresolekul pluripotentsust (mTeSR1) ja diferentseerimist soodustavas (E6) keskkonnas. A. mTeSR1 söötmes kasvatatud H9 rakukoloonia, B. CHIR99021 juuresolekul mTeSR1 söötmes kasvatatud H9 rakukoloonia, C. CHIR99021 juuresolekul E6 (puudub bFGF) söötmes kasvatatud H9 rakukoloonia.

2.3.3 GSK3 inhibeerimise mõju embrüonaalsete kehade moodustamisele H9 rakkudest

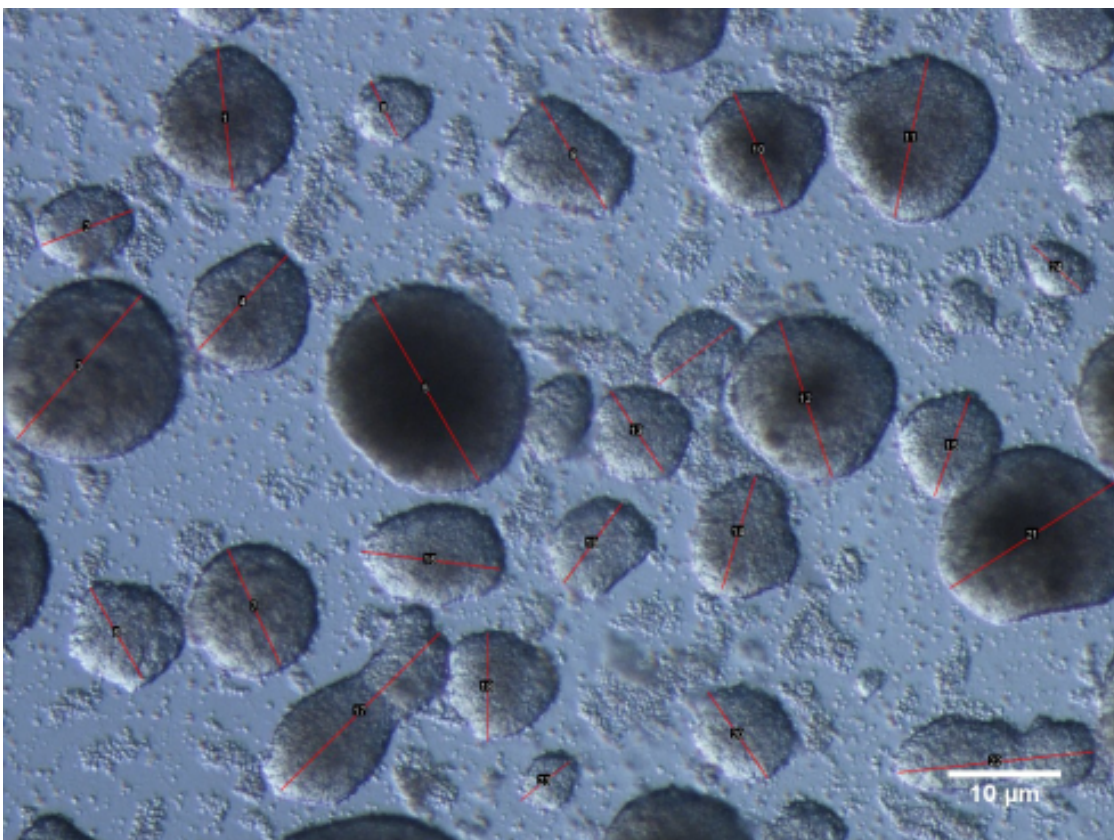
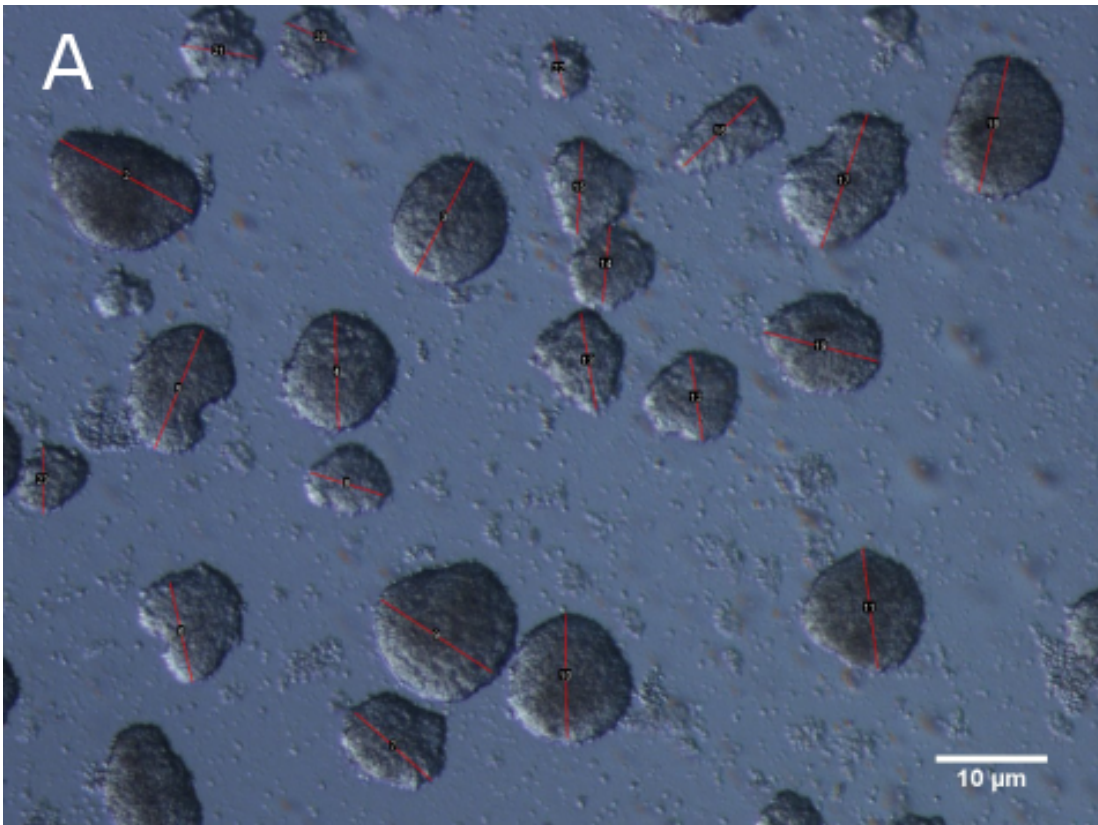
Embrüonaalsete kehade tekkeks on vajalik, et ES rakud oleksid pluripotentsed, sest ainult sellistel rakkudel on võime moodustada 3D struktuure ning diferentseeruda kolme lootelehe rakkude suunas. Seetõttu uurisime, kas eelnevalt CHIR99021 mõjutatud H9 rakud, mida kasvatati mTeSR1 söötmes ning säilitasid pluripotentsuse, on võimelised diferentseeruma embrüonaalseteks kehadeks (EB) ning kas GSK-3 inhibeerimine võib põhjustada erinevusi EB moodustamisel. Selleks kasvatati H9 rakke mTeSR1 söötmes 24 h, millele oli lisatud või puudus CHIR99021. EB moodustamist jälgiti esimese 24 h möödumisel ning järgneva 14 päeva jooksul jälgiti EB kasvamist. Selleks loeti EB-de arv ning mõõdeti nende suurus valgusmikroskoobiga tehtud piltidel. EB moodustuvad esimese 24 h jooksul ning edasi toimub

järk-järguline EB-de läbimõõdu suurenemine ja diferentseerumine, kuid muutusi EB-de arvus ei esinenud. Diferentseerumise edenemisel on vajalik, et algselt suspensioonis olevad EB kinnitused ning selleks kasutatakse 7-8 päevaste EB üleviimist želatiiniga kaetud koekultuuri plaadile, millele toimub kinnitumine.

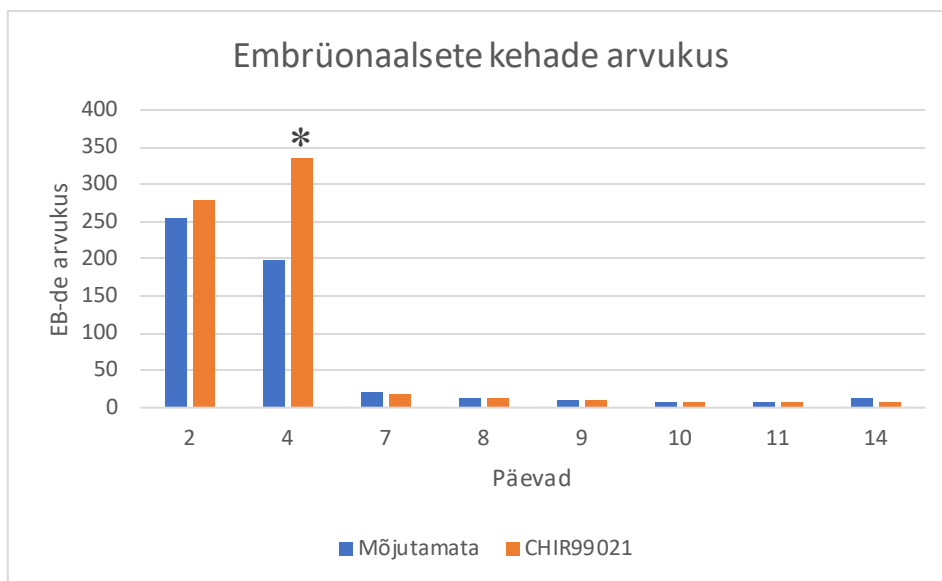
Ilmnes, et EB-de arv oli mõnevõrra suurem eelnevalt H9 rakkude kasvatamisel CHIR99021 juuresolekul võrreldes ilma CHIR99021 lisamiseta kasvanud rakkudest moodustunud EB-dega. Erinevus EB-de moodustamises olid statistiliselt erinev 4. päeval võrreldes EB-dega, mis kasvasid mTeSR1 söötmes ilma CHIR99021 lisamiseta (joonis 13). EB-de arvukuse analüüsimisel ilmnes, et esimestel päevadel mTeSR1 söötmes EB-de arv langes kuni 8. päevani. CHIR99021 juuresolekul EB-de arvukus suurenes 4. päevani ning järgnevalt langes 8. päevani. EB kanti üle želatiiniga kaetud koekultuuri plaadile 8. päeval ja jälgiti nende kinnitumist (joonis 13). Pärast 8. päeva EB-de arv ei muutunud märgatavalt, sest tegemist oli kinnitunud EB-dega. Kui vaadeldi EB kinnitumist želatiinile, siis ei ilmnenud erinevusi selles, kas H9 rakke oli eelnevalt enne EB tegemist kasvatatud CHIR99021 juuresolekul või mitte ning kinnitumine toimus 24 h jooksul.

GSK-3 inhibiitoriga eelnevalt mõjutatud H9 rakkude korral oli moodustunud EB-de läbimõõt suurem kui mõjutamata rakkudel (joonis 12 ja 14). Statistiliselt erinevad olid EB suurused 2., 4. ja 7. päevadel. Peale želatiiniga kaetud koekultuuri plaadile kandmist EB-de arv ei muutunud ning ka nende suurus ei muutunud märgatavalt. Muutused toimusid rakkude diferentseerumisel, sest pikemaajalisel kasvatamisel oli märgata tsüstiliste moodustiste ilmumist EB struktuuridesse (joonis 15).

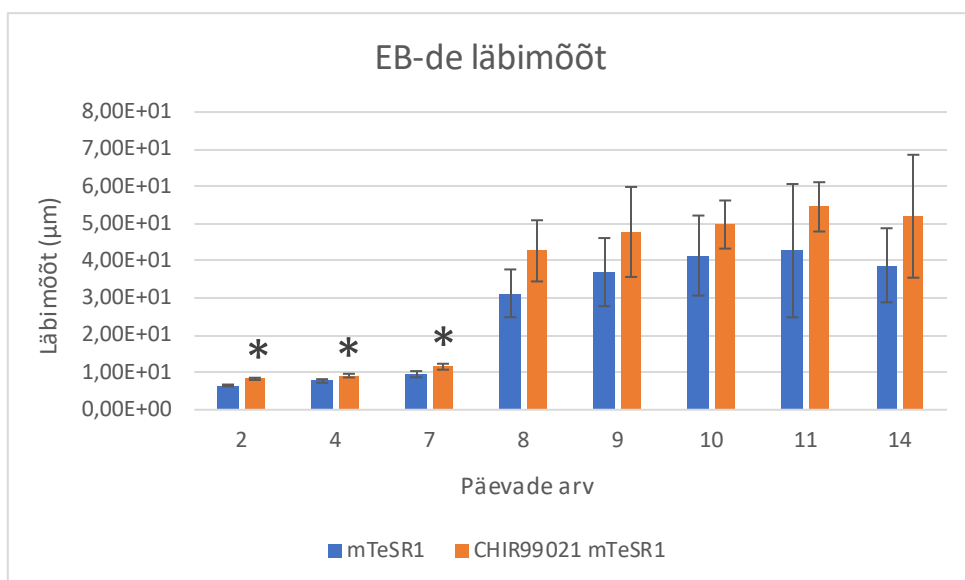
Antud töö tulemused viitavad sellele, et CHIR99021 soodustab pluripotentsuse säilimist, sest selliste rakkude diferentseerumisvõime moodustada EB-sid oli suurem võrreldes nende rakkudega, mida ei olnud eelnevalt GSK-3 inhibiitoriga mõjutatud. Primitiivsematel ES rakkudel on parem diferentseerumisvõime võrreldes nn eelsoodumusega ES rakkudega, samuti omavad erinevad hES rakuliinid erinevat diferentseerumisvõimet (Osafune *et al.*, 2008). Seetõttu võib arvata, et ka GSK-3 inhibiitoriga mõjutatud H9 rakud võisid olla primitiivsemas olekus ning seetõttu omada paremat diferentseerumispotentsiaali kui eelnevalt inhibiitoriga töötlemata H9 rakud.



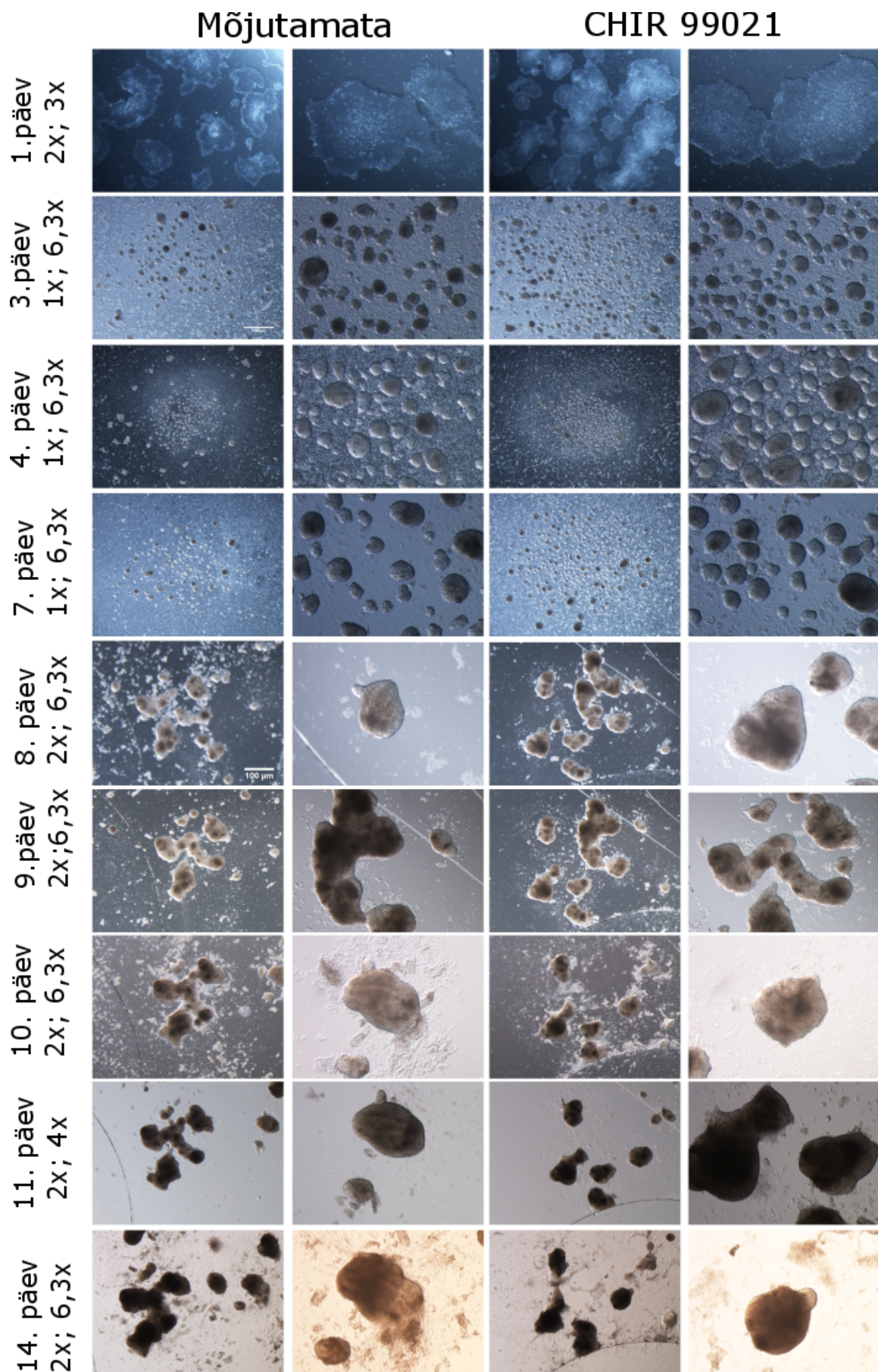
Joonis 12. Moodustunud EB arv 7. päeval. A- H9 rakke kasvatati mTeSR1 söötmes, B- H9 rakke kasvatati mTeSR1 söötmes, millele oli lisatud CHIR99021.



Joonis 13. Moodustunud embrüonaalsete kehade arv. H9 rakke kasvatati mTeSR1 söötmes, millele oli lisatud CHIR99021 või mis ei sisaldanud CHIR99021 (mõjutamata). **Sinine-** mTeSR1 söötmes kasvanud hES rakud, **punane-** CHIR99021 koosmõjul kasvanud mTeSR1 söötmes kasvanud hES rakud. Statistiline olulisus * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, veapiiriks kasutatud +/- SEM.



Joonis 14. Moodustunud embrüonaalsete kehade läbimõõt. H9 rakke kasvatati mTeSR1 söötmes, millele oli lisatud CHIR99021 või mis ei sisaldanud CHIR99021 (mõjutamata). **Sinine-** mTeSR1 söötmes kasvanud hES rakud, **punane-** CHIR99021 koosmõjul kasvanud mTeSR1 söötmes kasvanud hES rakud. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, Statistiline olulisus arvatud mTeSR1 söötmes kasvatatud EB-de ja CHIR99021 mTeSR1 kasvatatud EB-de suhtes sama päeva kohta. Tulemused on esitatud keskmine +/- SEM. 2. päeval analüüsitud EB-de arv oli 76 ja CHIR99021 eeltötlusega EB-de arv oli 79, 4. päeval vastavalt 40 ja 54, 7. päeval 23 ja 24, 8. päeval 13 ja 13, 9. päeval vastavalt 12 ja 8, 10. päeval vastavalt 7 ja 8, 11. päeval vastavalt 7 ja 6, 14. päeval vastavalt 13 ja 6.

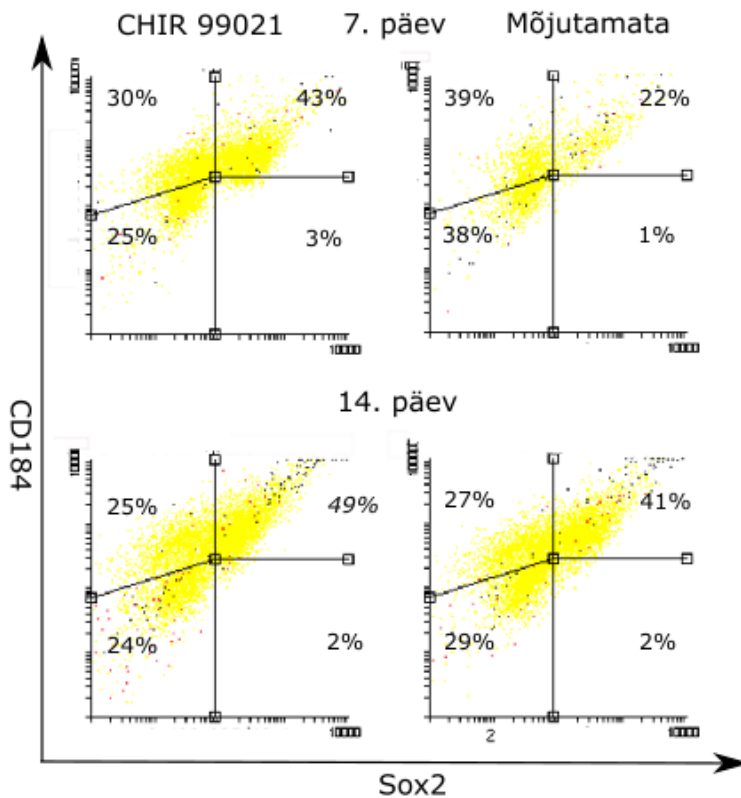
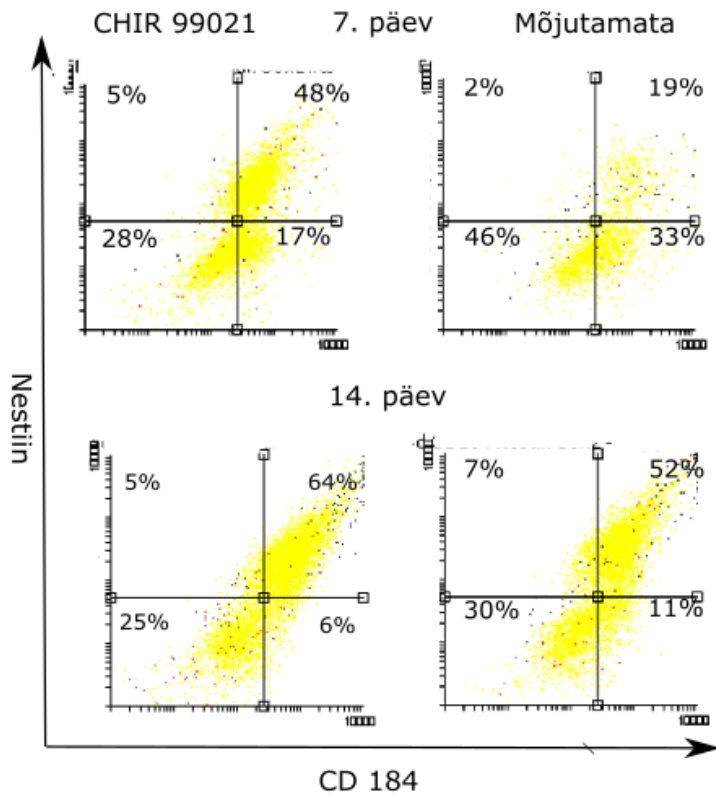


Joonis 15. Moodustunud embrüonaalsed kehad kui H9 rakke kasvatati mTeSR1 söötmes, millele oli lisatud CHIR99021 või mis ei sisaldanud CHIR99021 (mõjutamata). Pildid on tehtud valgusmikroskoobiga. Suurendused (1x, 2x, 3x, 6,3x). 1. päeval on rakukolooniad, millest EB moodustati.

2.3.4. GSK3 inhibeerimise mõju embrüonaalsete kehade diferentseerumisele

Eelnevalt leidsime, et EB-de moodustamisel on märgatav erinevus, kui H9 rakke eelnevalt kasvatati GSK3 inhibiitori juuresolekul pluripotentsust soodustavas keskkonnas. EB-de detailsemaks analüüsimiseks kasutasime läbivoolutsütomeetriat iseloomustamiseks EB rakkudes kolme markeri: SOX2, Nestiini (ektodermaalsed markerid) ja CD184 (endodermaalne marker) valkude taset.

Läbivoolutsütomeetriline analüüs teostati 7. ja 14. päeval kasvatatud embrüonaalsete kehade (EB-de) mehaaniliselt üherakuliseks suspendeeritud rakususpensiooniga. Eelnevalt CHIR99021 juuresolekul kasvatatud H9 rakkudest moodustunud EB rakkudes oli SOX2 valk detekteeritav 7. päeval 46% rakkudes (SOX2 positiivsed rakud). Ilma CHIR99021 lisamiseta kasvatatud rakkudest moodustunud EB-des oli SOX2 valk detekteeritav (SOX2 positiivsed) 23% rakkudes. SOX2 positiivsete rakkude hulga määramisel 14. päeval ilmnis, et CHIR99021 juuresolekul kasvatatud H9 rakkudest moodustunud EB rakkudes oli SOX2 valk detekteeritav 51% rakkudest ning ilma CHIR99021 lisamiseta kasvatatud H9 rakkudest moodustunud EB-des oli 43% SOX2 positiivseid rakke (joonis 16). Sarnaselt oli CD184 positiivsete rakkude hulk mõnevõrra suurem (73% versus 62% 7. päeval ja 74% versus 68% 14. päeval) CHIR99021 juuresolekul kasvatatud H9 rakkudest moodustunud EB-des. Nestiin positiivsete rakkude hulga uurimisel oli ka nestiin-positiivsete rakkude arv suurem eelnevalt GSK-3 inhibiitoriga mõjutatud H9 rakkudest moodustunud EB-del (53% versus 21% 7. päeval ja 71% versus 59% 14. päeval). Nende tulemuste põhjal võib järeldada, et CHIR99021 mTeSR1 söötmes soodustas pluripotentsuse säilitamist ja diferentseerumist EB-deks. Need tulemused samuti viitavad sellele, et GSK-3 inhibiitoriga mõjutatud H9 rakud võisid olla primitiivsemas olekus ning seetõttu omada paremat diferentseerumispotentsiaali kui eelnevalt inhibiitoriga töötlemata H9 rakud. See vajab aga edasist uurimist, et näidata, kas H9 rakud ekspresseerivad primitiivsele olekule iseloomulikke transkriptsioonifaktoreid GSK-3 inhibeerimisel pluripotentsust soodustavas keskkonnas.



Joonis 16. GSK3 inhibiitori mõju rakkude diferentseerumisele EB moodustamisel. Läbivoolutsütomeetriline analüüs teostati embrüonaalsetest kehast saadud rakususpensiooniga ning rakke analüüsiti markerite SOX2 (ektodermi marker), CD184 (endodermi marker) ja Nestiini (ektodermi marker) suhtes.

KOKKUVÕTE

Tüvirakuteraapia aluseks on efektiivsete tüvirakkude diferentseerimisprotokollide olemasolu ja töökindlus. Diferentseerumisprotokollide täiustamisega tegeletakse väga intensiivselt. Lähtuvalt sellest uuriti antud töös, kas Wnt raja aktiveerimisega on võimalik hES rakke pluripotentsust hoida ning kuidas Wnt signaalraja aktivatsioon mõjutab varajast diferentseerimist. Üheks potentsiaalseks keemiliselt sünteesitud ühendiks Wnt signaalraja moduleerimisel on GSK-3 inhibiitor CHIR99021. Antud bakalaureusetöös uuriti CHIR99021 mõju embrüonaalsetele tüvirakkudele pluripotentsust või diferentseerumist soodustavas keskkonnas ja diferentseerumisele embrüonaalseteks kehadeks. Selleks, et määrata CHIR99021 mõju H9 rakkudele analüüsiti H9 rakke kasutades immunofluorestsentsmeetodit, hemotsütomeetriat ja läbivoolutsütomeetriat.

Töö tulemusel ilmnnes, et GSK-3 inhibiitori CHIR99021 mõju H9 rakkudele sõltub kasvukeskkonnast. Pluripotentsust soodustavas keskkonnas säilitasid H9 rakud OCT4 valgu sünteesi või toimus OCT4 valgu taseme suurenemine.

Diferentseerumist soodustavas keskkonnas H9 rakud diferentseerusid mesodermaalse suunas.

Uurides, kas eelnevalt CHIR99021 mõjutatud rakud, mis olid kasvatatud pluripotentsust soodustavas keskkonnas, on võimelised diferentseeruma moodustades embrüonaalseid kehasid, ilmnnes, et nende embrüonaalsete kehade arv oli suurem ja moodustunud kehad olid suurema läbimõõduga ning sisaldasid enam diferentseerunud rakke, kui need embrüonaalsed kehad, mis moodustati pluripotentsetest rakkudest ilma CHIR99021 eelneva mõjutamiseta.

Kokkuvõttes, Wnt signaalraja moduleerimine võimaldab H9 rakkudes nii säilitada pluripotentsust kui ka soodustada diferentseerumist vastavalt teiste signaalradade aktivatsioonile pluripotentsust soodustavas või diferentseerumist soodustavas keskkonnas.

GSK-3 inhibitor CHIR99021 effect on H9 cell line

Helena Tull

SUMMARY

Human embryonic stem (hES) cells are blastocyst derived cells, which are pluripotent and have ability to differentiate to different cell types. hES cells have certain type of plasticity, that on one hand gives them ability to differentiate to different cell types and on the other hand, makes its culturing *in vitro* difficult to control. For effective differentiation the existing protocols must be improved. It has been shown that activating Wnt signaling pathway in hES cells is important to maintain these cells in pluripotent state, however the effect of modulating Wnt signaling on early differentiation is unknown. CHIR99021 is chemically synthesized substance for activating Wnt pathway. CHIR99021 is glycogen synthetase kinase inhibitor 3 (GSK-3) that activates Wnt pathway and through that can affect cells differentiation, development and reprogramming. CHIR99021 is preferred among others GSK-3 inhibitors, because of its high activity and low toxicity.

In this study we characterized the effect of CHIR99021 on H9 cells in the conditions supporting pluripotency or differentiation. We also studied the effect of CHIR99021 pretreatment in pluripotency supporting conditions on H9 cells differentiation ability to form embryoid bodies (EB).

For characterizing H9 cells we used immunofluorescence, hemocytometry and fluorescence-activated cell sorting (FACS) methods. In the presence of CHIR99021 in pluripotency supporting conditions the OCT4 protein level increased. In differentiating conditions CHIR99021 supported the differentiation into mesodermal lineage. When H9 cells were pretreated with CHIR99021 before formation embryoid bodies, then EB from CHIR99021-pretreated H9 cells formed EB in higher number and size compared to EBs formed from the H9 cells in the absence of CHIR99021.

In conclusions, modulating Wnt signaling pathway supports the pluripotency and differentiation potential in H9 cells, but it is influenced by other active signaling pathways provided by the culturing environment.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Adachi, K., Suemori, H., Yasuda, S., Nakatsuji, N. ja Kawase, E. (2010). Role of SOX2 in maintaining pluripotency of human embryonic stem cells. *Genes to Cells*. 15: 455–470.
- Amit, M., Carpenter, M. K., Inokuma, M. S., Chiu, C.-P., Harris, C. P., Waknitz, M. A., Itskovitz-Eldor, J. ja Thomson, J. A. (2000). Clonally Derived Human Embryonic Stem Cell Lines Maintain Pluripotency and Proliferative Potential for Prolonged Periods of Culture. *Developmental Biology*. 227: 271–278.
- Amit, M., Margulets, V., Segev, H., Shariki, K., Laevsky, I., Coleman, R., ja Itskovitz-Eldor, J. (2003). Human Feeder Layers for Human Embryonic Stem Cells. *Biology of Reproduction*. 68: 2150-6
- Bakre, M. M., Hoi, A., Mong, J. C. Y., Koh, Y. Y., Wong, K. Y. ja Stanton, L. W. (2007). Generation of Multipotential Mesendodermal Progenitors from Mouse Embryonic Stem Cells via Sustained Wnt Pathway Activation. *Journal of Biological Chemistry*. 282: 31703–31712.
- Berge, D. ten, Kurek, D., Blauwkamp, T., Koole, W., Maas, A., Eroglu, E., Siu, R.K. ja Nusse, R. (2011). Embryonic stem cells require Wnt proteins to prevent differentiation to epiblast stem cells. *Nature cell biology*. 13: 1070–1075.
- Boyer, L. A., Lee, T. I., Cole, M. F., ... Young, R. A. (2005). Core Transcriptional Regulatory Circuitry in Human Embryonic Stem Cells. *Cell*. 122: 947–956.
- Brimble, S. N., Sherrer, E. S., Uhl, E. W., Wang, E., Kelly, S., Merrill, A. H., Robins, A. J., Schulz, T. C. (2007). The Cell Surface Glycosphingolipids SSEA-3 and SSEA-4 Are Not Essential for Human ESC Pluripotency. *STEM CELLS*. 25: 54–62.
- Brivanlou, A. H., Gage, F. H., Jaenisch, R., Jessell, T., Melton, D., ja Rossant, J. (2003). Setting Standards for Human Embryonic Stem Cells. *Science*. 300: 913–916.
- Chadwick, K., Wang, L., Li, L., Menendez, P., Murdoch, B., Rouleau, A., ja Bhatia, M. (2003). Cytokines and BMP-4 promote hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells. *Blood*. 102: 906–915.
- Chen, Y., Blair, K., ja Smith, A. (2013). Robust Self-Renewal of Rat Embryonic Stem Cells Requires Fine-Tuning of Glycogen Synthase Kinase-3 Inhibition. *Stem Cell Reports*. 3: 209–217.

- Cohen, P., ja Goedert, M. (2004). GSK3 inhibitors: Development and therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov.* 6:479-87
- Dobrovolskaya-Zavadskaya, N., (1927) Sur la mortification spontanée de la chez la souris nouveau-né et sur l'existence d'un caractère (facteur) héréditaire, non-viable. *Crit. Rev. Soc. Biol.* 97: 114–116.
- Galbha, D., Sharat, S., Sabitri, G., ... Heindryckx Björn. (2015). Alternative Routes to Induce Naïve Pluripotency in Human Embryonic Stem Cells. *STEM CELLS.* 33: 2686–2698.
- Hao, J., Li, T.-G., Qi, X., Zhao, D.-F., ja Zhao, G.-Q. (2006). WNT/ β -catenin pathway up-regulates Stat3 and converges on LIF to prevent differentiation of mouse embryonic stem cells. *Developmental Biology.* 290: 81–91.
- He, S., Pant, D., Schiffmacher, A., Meece, A., ja Keefe, C. L. (2008). Lymphoid Enhancer Factor 1-Mediated Wnt Signaling Promotes the Initiation of Trophoblast Lineage Differentiation in Mouse Embryonic Stem Cells. *STEM CELLS.* 26: 842–849.
- Hyslop, L., Stojkovic, M., Armstrong, L., Walter, T., Stojkovic, P., Przyborski, S., Herbert, M., Murdoch, A., Strachan, T., Lako, M. (2005). Downregulation of NANOG Induces Differentiation of Human Embryonic Stem Cells to Extraembryonic Lineages. *STEM CELLS.* 23: 1035–1043.
- Inoki, K., Ouyang, H., Zhu, T., ... Guan, K.-L. (2006). TSC2 Integrates Wnt and Energy Signals via a Coordinated Phosphorylation by AMPK and GSK3 to Regulate Cell Growth. *Cell.* 126: 955–968.
- Kalani, M. Y. S., Cheshier, S. H., Cord, B. J., Bababeygy, S. R., Vogel, H., Weissman, I. L., ... Nusse, R. (2008). Wnt-mediated self-renewal of neural stem/progenitor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 105: 16970–16975.
- Kallas-Kivi, A., Trei, A., ja Maimets, T. (2016). Lovastatin Decreases the Expression of CD133 and Influences the Differentiation Potential of Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells International.* 2016: 1–16.
- Keller, G. (2005). Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine. *Genes and Development.* 19: 1129–1155.
- Korzh, V. P. (2001). N. Dobrovolskaya-Zavadskaya and the Discovery of the T gene1. *Russian Journal of Developmental Biology.* 32: 192–195.
- Laflamme, M. A., Chen, K. Y., Naumova, ... Murry, C. E. (2007). Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nature Biotechnology.* 25: 1015–1024.
- Lanza, R., Gerhart, J., Hogan, B., Melton, D., Pedersen, R., Thomas, E. D., Thomson, J., Wilmot sir I. 2009. Essentials of Stem Cell Biology, lk. 319-322; 339-341, *Stem Cells*

in the Gastrointestinal Tract; Characterization of Pluripotent Cells., 2nd ed., vol.1., Academic Press, Kanada.

- Levenberg, S., Golub, J. S., Amit, M., Itskovitz-Eldor, J., ja Langer, R. (2002). Endothelial cells derived from human embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 99: 4391–4396.
- Li, W., Sun, W., Zhang, Y., Wei, W., Ambasudhan, R., Xia, P., Talantova, M., Lin, T., Kim, J., Wang, X. (2011). Rapid induction and long-term self-renewal of primitive neural precursors from human embryonic stem cells by small molecule inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 108: 8299–8304.
- Miki, T., Yasuda, S-Y., Kahn, M. (2011). Wnt/ β -catenin Signaling in Embryonic Stem Cell Self-renewal and Somatic Cell Reprogramming. *Stem Cell Rev.* 7: 836–846.
- Mitsui, K., Yoshimi, T., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., Maruya, M., Maeda, M., Yamanaka, S. (2003). The Homeoprotein Nanog Is Required for Maintenance of Pluripotency in Mouse Epiblast and ES Cells. *Cell.* 113: 631–642.
- Morin, S., Pozzulo, G., Robitaille, L., Cross, J., ja Nemer, M. (2005). MEF2-dependent Recruitment of the HAND1 Transcription Factor Results in Synergistic Activation of Target Promoters. *Journal of Biological Chemistry.* 280: 32272–32278.
- Nakano, T., Kodama, H., ja Honjo, T. (1994). Generation of lymphohematopoietic cells from embryonic stem cells in culture. *Science.* 265: 1098–1101.
- Niwa, H., Miyazaki, J., ja Smith, A. G. (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nature Genetics.* 24: 372–376.
- Niwa, H., Toyooka, Y., Shimosato, D., Strumpf, D., Takahashi, K., Yagi, R., ja Rossant, J. (2005). Interaction between Oct3/4 and Cdx2 Determines Trophectoderm Differentiation. *Cell.* 123: 917–929.
- Naujok, O., Lentes, J., Diekmann, U., Davenport, C., Lenzen, S. (2014). Cytotoxicity and activation of the Wnt β -catenin. *BMC Res Notes.* 7: 273.
- Osafune, K., Caron, L., Borowiak, M., Martinez, R. J., Fitz-Gerald, C. S., Sato, Y., Cowan, Melton, D. A. (2008). Marked differences in differentiation propensity among human embryonic stem cell lines. *Nature Biotechnology.* 26: 313–315.
- Riley, P., Anson-Cartwright, L. ja Cross, J. C. (1998). The Hand1 bHLH transcription factor is essential for placentation and cardiac morphogenesis, *Nat Genet.*, 18: 271-5
- Reubinf, B. E., Pera, M. F., Fong, C.-Y., Trounson, A., ja Bongso, A. (2000). Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nature Biotechnology.* 18: 399–404.

- Ring, D. B., Johnson, K. W., Henriksen, E. J., Nuss, J. M., Goff, D., Kinnick, T. R., ... Harrison, S. D. (2003). Selective Glycogen Synthase Kinase 3 Inhibitors Potentiate Insulin Activation of Glucose Transport and Utilization In Vitro and In Vivo. *Diabetes*. 52: 588–595.
- Sato, N., Meijer, L., Skaltsounis, L., Greengard, P., ja Brivanlou, A. H. (2004). Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nature Medicine*. 10: 55-63.
- Schloesser, R. J., Huang, J., Klein, P. S., ja Manji, H. K. (2008). Cellular Plasticity Cascades in the Pathophysiology and Treatment of Bipolar Disorder. *Neuropsychopharmacology*. 33: 110–133
- Scholz, C. B., ja Technau, U. (2003). The ancestral role of Brachyury: expression of Nembra1 in the basal cnidarian *Nematostella vectensis* (Anthozoa). *Development Genes and Evolution*. 212: 563–570.
- Shevinsky, L. H., Knowles, B. B., Damjanov, I., ja Solter, D. (1982). Monoclonal antibody to murine embryos defines a stage-specific embryonic antigen expressed on mouse embryos and human teratocarcinoma cells. *Cell*, 30: 697–705.
- Sperber, H., Mathieu, J., Wang, Y., ... Ruohola-Baker, H. (2015). The metabolome regulates the epigenetic landscape during naïve to primed human embryonic stem cell transition. *Nature cell biology*. 17: 1523–1535.
- Theunissen, T. W., Powell, B. E., Wang, H., Mitalipova, M., Faddah, D. A., Reddy, J., ... Jaenisch, R. (2014). Systematic Identification of Culture Conditions for Induction and Maintenance of Naive Human Pluripotency. *Cell Stem Cell*. 15: 471–487.
- Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., ja Jones, J. M. (1998). Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science*, 282: 1145-1147
- Thomson, M., Liu, S. J., Zou, L.-N., Smith, Z., Meissner, A., ja Ramanathan, S. (2011). Pluripotency Factors in Embryonic Stem Cells Regulate Differentiation into Germ Layers. *Cell*. 145: 875–89
- Wang, Z., Oron, E., Nelson, B., Razis, S., ja Ivanova, N. (2012). Distinct Lineage Specification Roles for NANOG, OCT4, and SOX2 in Human Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell*. 10: 440–454.
- Ware, C. B., Nelson, A. M., Mecham, B., Hesson, J., Zhou, W., Jonlin, E. C., ... Ruohola-Baker, H. (2014). Derivation of naïve human embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 111: 4484–4489.

- Zhao, W., Ji, X., Zhang, F., Li, L., Ma, L. (2012). Embryonic stem cell markers. *Molecules*. 17: 6196–6236.
- Wu, D., ja Pan, W. (2010). GSK3: a multifaceted kinase in Wnt signaling. *Trends in biochemical sciences*. 35: 161–168.
- Xu, Z., Robitaille, A. M., Berndt, J. D., Davidson, K. C., Fischer, K. A., Mathieu, J., ... Moon, R. T. (2016). Wnt/ β -catenin signaling promotes self-renewal and inhibits the primed state transition in naïve human embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 113: 6382–6390.
- Yang, J. ja Weinberg, R. A. (2008) Epithelial-Mesenchymal Transition: At the Crossroads of Development and Tumor Metastasis. *Developmental Cell*. 14: 818-829
- Ying, Q.-L., Wray, J., Nichols, J., Batlle-Morera, L., Doble, B., Woodgett, J., ... Smith, A. (2008). The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature*. 453: 519–523.

VEEBIAADDRESSID:

1. PubChem, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/chir99021#section=Top>, kasutatud 26.05.2018
2. Spacesrl, <http://www.spacesrl.com/promozioni3/provvvisorie/early-mesodermal-lineage-markers/>, kasutatud 26.05.2018
3. Thermo Fischer Scientific, kasutatud 15.02.2018, <https://www.thermo fisher.com/order/catalog/product/A1516401>
4. Uniprot KB a., kasutatud 12.02.2018, <https://www.uniprot.org/uniprot/P48431>
5. Uniprot KB b., kasutatud 12.02.2018, <http://www.uniprot.org/uniprot/O15178>

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Helena Tull

(sünnikuupäev: 13.06.1996)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „GSK-3 inhibiitori CHIR99021 toime H9 rakkudele“

mille juhendajateks on Ade-Kallas Kivi(PhD) ja Annely Lorents (PhD).

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

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates 31.12.2021 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