

Munarakust embrüoni: geenide roll

*Elo Madissoon**

Pea kakssada aastat tagasi, 1826. aastal kirjeldas tuntud Eesti embrüoloog Karl Ernst von Baer mikroskoobi abil esmakordselt imetaja munarakku. Teadaolevalt oli tegemist väga suure rakuga, millest võib kasvada uus organism. Mitu põlvkonda teadlaste panust hiljem hakati aru saama, kuidas munarakk ja sperm ühiselt loodavasse organismi panustavad. Üha edasi arenevate mikroskoopia ja geneetiliste meetodite abil selgus, et edukaks organismi arenguks on vaja panust nii emalt kui ka isalt: pool komplekti DNA-d munarakust ja pool spermist. Tänapäeval on inimese väga varajase embrüo uuringutes tähtsal kohal DNA avaldumine ehk leiduvate geenide kasutus RNA tasandil.

Baeri embrüoloogia seaduste kohaselt on embrüo oma esimestel arenguetappidel sarnane teiste organismide arenguetappidega. Just selle, aastasadu püsinud morfoloogilise sarnasuse põhimõtte alusel on tehtud palju uuringuid varase arengu valdkonnas mudelorganismides: hiired, lehmad ja lambad. Nii meie uurimistöös Karolinska instituudis kui ka teiste maailma arengubioloogide töö tulemus viitab aga sellele, et molekulaarsel tasandil on inimese embrüo väga varajane areng üsna unikaalne. Järgnevalt annan ülevaate inimese embrüo esimeste päevade arengust, viljatusest ja muutustest, mis leiavad aset geenide tasandil.

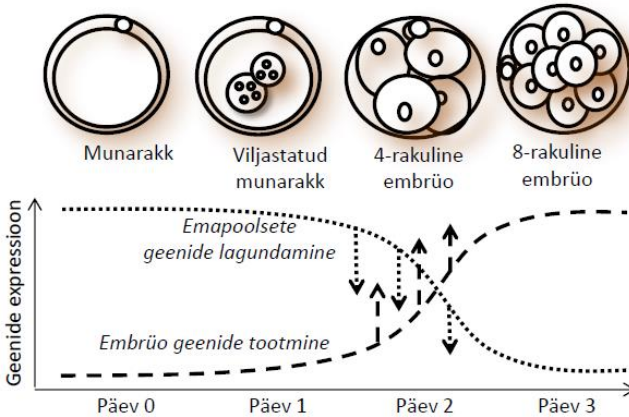
Munarakk on keha suurim rakk. Nii on näiteks lindudel, putukatel, imetajatel. Kui lindudel ja putukatel areneb iseseisev orga-

*Karolinska instituut, Rootsi, kontakt: elo.madissoon@gmail.com

nism välja ainuüksi munas leiduva „toidu“ abil, siis inimestel areneb embrüo iseseisvalt vaid umbes esimesed 6 päeva enne seda, kui embrüo emaka seinale kinnitub ja sealt edasi toitaineid saab. Nende esimese kuue päeva jooksul toimuvad suured muutused: embrüo jaguneb pooldumiste käigus mitmesajaks rakuks, lagundatakse suur hulk munarakuga kaasas olevaid molekule ja sünteesitakse uusi. Selliste protsesside läbiviimiseks kulub palju energiat ja bioloogilisi molekule, mis kõik on pakitud kaasa munarakku. Seetõttu peabki munarakk olema nii suur.

Munarakke valmib viljakatel naistel igas kuus vaid üks (harva kaks). Valmimise käigus kasvab munarakk oma küpse staadiumi suuruseks ning toodetakse palju DNAd ja valke. Kui pärast viljastumist esimesed arengupäevad sõltuvad ainuüksi emapoolsetest munarakuga kaasas olevast DNAST, siis embrüo kolmandaks päevaks, 8-rakulises staadiumis, toodetakse vajalikku materjali embrüost endast (joonis 1). See on ühtlasi staadium, kus üsna tihti esineb arengu peatumine, kuna embrüo enda genoomi ei suudeta aktiveerida. Selline väga varajane iseeneslik abort on viljatute paaride puhul laboritingimustes viljastamisel üsna tavaline.

Inimese viljatuse all mõistetakse paari või indiviidi, kellel aasta kuni kahe kaitseta regulaarse vahekorra jooksul ei teki rasedust. Erinevate allikate väitel kannatab viljatuse all kuni iga seitsmes paar. Põhjuseid on uuritud aastakümneid ja uuritakse veel tänapäevalgi. Algselt avastatud morfoloogiliselt tuntud põhjustena võib välja tuua näiteks munajuhade blokeerituse või sperma halva kvaliteedi. Esimene edukas kehaväline viljastamine (*in vitro fertilization* – IVF) tehti just nimelt munajuhade blokeerituse tõttu, kus sperm ja munarakk ei saanud füüsilise barjääri tõttu ühineda (Steptoe ja Edwards, 1978). Seda tähistati 1978. aastal esimese n-ö katseklaasilapse Louise Browni sünniga ja 2010. aastal IVF-meetodi ehk katseklaasimeetodi edukuse tunnustamisega Nobeli auhinna näol Robert G. Edwardsile (Nobelprize.org, 2010).



Joonis 1. Inimese embrüo varajane areng ja geenide ekspressiooni muutus. Inimese embrüo esimesed arengupäevad on iseseisvad ja sel ajal toimub palju muutusi, näiteks rakkude jagunemine ja geenide ekspressiooni muutus. Munarakus olemasolev emapoolne DNA lagundatakse embrüo 4–8-rakulises staadiumis 2.–3. päeval, samal ajal, kui algab embrüo enda geenide aktiveerumine.

Kuigi tänapäeval sünnib IVF-meetodi abil miljoneid lapsi igal aastal, saavad sellest abi vaid kuni pooled patsientidest ja paljudel juhtudel tuvastatakse viljatus seletamatutel põhjustel. Seletamatute põhjuste puhul on kõik morfoloogilised ja meditsiinilised tunnused normis, aga rasestumist ei toimu korduvate protseduuride vältel. Selliste silmaga nägematute põhjuste pärast peamegi uurima arengut geenide tasandil, et embrüo normaalset geenide kasutust mõista.

Inimeste, aga ka teiste imetajate munarakkude ja varaste embrüote uurimist geenide tasandil on limiteerinud üks suur aspekt: embrüoid on väga vähe. Paljud bioloogilised meetodid nõuavad suurt kogust rakke. Samas meetodid, mis nõuavad vähem materjali, koguvad andmeid ainult üksikute geenide kohta. See omakorda vajab eelteadmist selle kohta, millised geenid võiksid üldse olulised olla. Tänapäevaks on välja arendatud laiapõhjalised meetodid, mille abil on võimalik koguda andmeid pea kõikide geenide kohta korraga. Kuigi DNA on igas inimese rakus sama, siis geenide kasutus või geeni-

ekspressioon ehk RNA kogus iga geeni kohta võib eri kudedes ja rakkudes kümneid tuhandeid kordi erineda. Seetõttu on oluline uurida just RNA kogust erinevate geenide kohta erinevates rakkudes. Sellised meetodid, näiteks ekspressiooni mikrokiibid ja RNA sekveneerimine on kogu molekulaarbioloogia valdkonda kõvasti edasi arendanud, pakkudes ühe eksperimendi tulemusel infot mitte üksikute, vaid kõikide geenide ekspressiooni ehk RNA koguse kohta. Viimasel ajal on võimalik neid meetodeid kasutada ka väikeses hulgas ja üksikutes rakkudes. Nii ekspressiooni mikrokiipe kui ka RNA sekveneerimist on kasutatud inimese varajase arengu uurimiseks.

Meie uurimirühm Karolinska instituudis uuris inimese munarakke erinevates arengustaadiumites ja väga varaseid embrüoid algselt ekspressiooni mikrokiibi abil (Zhang *et al.*, 2009). Esiteks leiti, et pea poolte geenide puhul, mida munarakk kasutab, ei ole teada nende funktsioon. Aga vaid paar protsenti geenidest osaleb teadaolevalt arengubioloogilistes protsessides. See kõlab väga kahtlaselt: munarakk, mis on laetud varajaseks arenguks vajalike RNA-molekulidega, sisaldab väga palju „tundmatu“ funktsiooniga RNA-molekule, aga väga vähe RNA-molekule, mis on tuntud arengubioloogias. Sellest võis järeldada, et tegelikult väga paljud embrüo varaseks arenguks vajalikud geenid ei ole veel teada. Teiseks leiti, et munaraku erinevad arengustaadiumid ei erine teineteisest RNA ekspressiooni poolest, küll aga erinevad implantatsioonieelsed embrüod teineteisest väga suurel määral. Teadlased üle maailma on jõudnud samale järeldusele nii inimeste kui ka teiste loomade puhul. See avastus illustreerib väga hästi varajase arengu RNA globaalset kasutust: munarakus on palju RNA-molekule varuks (emapoolsed geenid), millest mitmed lagundatakse pärast spermi poolt viljastamist ning hakatakse kiiruga uusi RNA-molekule tootma inimese 8-rakuliseks staadiumiks (joonis 1). Need uued RNA-molekulid on vajalikud väga varastel arenguetappidel ja pärinevad nii spermi kui ka munaraku DNA-lt.

Eeldades, et inimeste ja hiirte varane areng on morfoloogiliselt ja globaalse geenide kasutuse tasandil väga sarnane, hakka-

sime uurima genee hiirte munarakkudes ja embrüotes. Esiteks avastasime, et inimese ja hiire geenikasutus on küll üsna sarnane munarakus, aga palju erinevam mõned päevad hiljem 2–8-rakulises embrüos (Madisson *et al.*, 2014). Sel ajal toodetakse RNA-molekule embrüo enda geenidelt. Teise toetava tulemusena leiti, et teatud grupi geenide puhul tundub RNA tootmises olevat ajaline nihe: kui inimene hakkas mitmeid embrüo genee kasutama alles mitu päeva pärast viljastamist, siis hiires olid need geenid juba munarakus aktiivsed. See näitas, et märgatava hulga inimese ja hiire geenide reguleerimine võib olla fundamentaalselt erinev. Olles huvitatud siiski inimese viljatuse seletamisest, otsustati edasi töötada inimese munarakkude ja embrüotega.

Meie rühma eesmärk oli koguda andmeid iga uuritava inimese munaraku ja embrüo puhul kõikide geenide kohta. Seetõttu kasutati üksikraku RNA sekveneerimist, mis näitab kõikide geenide RNA-taset igas uuritavas rakus (Tohonen *et al.*, 2015). IVF-protseduuri ülejääkidest kasutati mitutsada raku: munarakke, viljastatud munarakke, 4- ja 8-rakulisi embrüoid. Selle tohutu hulga andmete analüüs näitas, et kõige varasemat embrüo DNA kasutust võivad kontrollida need geenid, mis on inimeste ja teiste primaatide spetsiifilised. Need geenid kodeerivad PRD-domeeniga valke, mis kontrollivad teiste geenide ekspressiooni. Üsna skeptiliselt suhtusime algselt sellesse, et mitmed leitud valkudest ei ole levinud teistes imetajates ja mitmed polnud isegi inimeses varem korralikult kirjeldatud. Uurimistöö leidude kinnitamiseks tehti palju tööd teiste imetajate genoomidega, inimeste embrüonaalsete rakkudega ja muude molekulaarsete meetoditega, mis hõlmasid mitut PRD-domeeniga geeni (Jouhilahti *et al.*, 2016; Madisson *et al.*, 2016). Kõik tulemused toetasid algset leitud ja seetõttu jäi püsima arusaam, et inimese väga varane areng erineb teistest imetajatest reguleerivate geenide kasutuse poolest. Seda on nüüdseks toetanud ka teiste teadlaste uurimistöö (Maeso *et al.*, 2016).

Kokkuvõtteks, inimese väga varajane areng munarakust kuni paarisaja rakulise embrüoni on iseseisev. Embrüo peab hakkama saama ilma emata ning tema geenide kasutus sõltub ainult sellest, mis on talle munarakuga kaasa antud (emapoolne genoom) ja mida ta ise

kasutama hakkab (embrüo aktiivsed geenid). Kuigi morfoloogiliselt on inimese ja teiste imetajate varajane areng väga sarnane, siis geenide ekspressioonis esinevad muutused, mis võivad mängida fundamentaalset rolli embrüo arengus. Seetõttu on inimese viljatuse ja embrüo abordi seletamiseks vaja uurida just nimelt inimesest pärit materjali. Selle lähenemisega oleme avastanud PRD-domeeniga valgud, mis kontrollivad teiste geenide kasutust ja inimese embrüo esimese kuue päeva arengut.

Kirjandus

- Jouhilahti, E. M., Madisson, E., Vesterlund, L., Tohonen, V., Krjutskov, K., Plaza Reyes, A.,... Kere, J. (2016). The human PRD-like homeobox gene LEUTX has a central role in embryo genome activation. *Development*, 143, 3459-3469.
- Madisson, E., Jouhilahti, E. M., Vesterlund, L., Tohonen, V., Krjutskov, K., Petropoulous, S.,... Kere, J. (2016). Characterization and target genes of nine human PRD-like homeobox domain genes expressed exclusively in early embryos. *Scientific reports*, 6, 28995.
- Madisson, E., Tohonen, V., Vesterlund, L., Katayama, S., Unneberg, P., Inzunza, J.,... Kere, J. (2014). Differences in gene expression between mouse and human for dynamically regulated genes in early embryo. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *PLoS One*, 9(8), e102949.
- Maeso, I., Dunwell, T. L., Wyatt, C. D., Marletaz, F., Veto, B., Bernal, J. A.,... Holland, P. W. (2016). Evolutionary origin and functional divergence of totipotent cell homeobox genes in eutherian mammals. *BMC Biol*, 14, 45.
- Nobelprize.org. (2010). The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2010. Nobel Media AB.
- Stephens, P. C., & Edwards, R. G. (1978). Birth after the reimplantation of a human embryo. [Case Reports Letter]. *Lancet*, 2, 366.
- Tohonen, V., Katayama, S., Vesterlund, L., Jouhilahti, E. M., Sheikhi, M., Madisson, E.,... Kere, J. (2015). Novel PRD-like homeodomain transcription factors and retrotransposon elements in early human development. *Nature communications*, 6, 8207.
- Zhang, P., Zucchelli, M., Bruce, S., Hambiliki, F., Stavreus-Evers, A., Levkov, L.,... Hovatta, O. (2009). Transcriptome profiling of human pre-implantation development. *PLoS One*, 4, e7844.