

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

***Nestin-cre;Ric8a* mutantse hiire südame areng pärgarterite tekkimise ajal**

Bakalaureusetöö
12 EAP

Hanna Antson

Juhendajad: PhD Raivo Raid

PhD Keiu Kask

TARTU 2017

INFOLEHT

Nestin-cre;Ric8a mutantse hiire südame areng pärgarterite tekkimise ajal

Imetajate süda on esimene organ, mis organogeneesis funktsioneerima hakkab. Kardiogeneesis sisaldab endas keerukaid protsesse, mis tagavad südame korrektse arengu, mis on vajalik embrüo ellu jäämiseks. Neuraalharja päritolu rakud panustavad erinevate südamestruktuuride, nende seas vaskulaarpõimikute, arengusse. Nende õige differentseerumise, migreerumise ja adheesumise tagavad kompleksed signaalivõrgustikud, milles võtmerolli omavad G-valgud. G-valkude poolt vahendatud signaali ülekandeid reguleerib RIC-8, olles G-valgu α -subühikutele molekulaarseks tsäperoniks, kontrollides $G\alpha$ subühikute hulka rakus, ning guaniini nukleotiidivahetusfaktor, võimendades ja pikendades G-valkude signaali rakus. Seega omab RIC-8 olulist rolli kardiogeneesis, tagades korrektse südame arengu.

Märksõnad: RIC-8, kardiogeneesis, neuraalharja päritolu rakud, vaskulaarpõimikud

CERCS kood: B350 Arengubioloogia, loomade kasv, ontogeneesis, embrüoloogia

Nestin-cre;Ric8a mutant mouse's heart development during the formation of coronary arteries

The heart of mammals is the first organ that starts to function in organogenesis. Cardiogenesis involves complex processes that ensure the proper development of the heart, which is essential for the survival of the embryo. Neural crest cells derivatives contribute to the development of various cardiac structures, including those of vascular plexuses. Complex signalling networks ensure proper differentiation, migration and adhesion of the neural crest cells derivatives and G-proteins have a key role in these signalling pathways. G-protein mediated signal transduction is regulated by RIC-8. Acting as a molecular chaperone and as a guanine nucleotide exchange factor for the G-protein α -subunits, RIC-8 controls the amount of $G\alpha$ -subunits in the cell and also amplifies and prolongs the G-protein signal in the cell. Thus, RIC-8 plays an important role in cardiogenesis, ensuring a proper development of the heart.

Keyword: RIC-8, cardiogenesis, cardiac neural crest cells, vascular plexuses

CERCS code: B350 Developmental biology, growth (animal), ontogeny, embryology

SISUKORD

INFOLEHT.....	2
SISUKORD	3
KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1. Ülevaade kardiogeneesist.....	7
1.1.1. Pärarterid	8
1.1.2. Neuraalharja roll pärarterite moodustumisel.....	9
1.2. Guaniini nukleotiidivahetusfaktor RIC-8.....	10
1.2.1. RIC-8 üldine iseloomustus.....	11
1.2.2. G-valgud ja RIC8	12
1.2.3. RIC-8A roll rakkude migratsioonil ja adhesioonil.....	13
1.3. Konditsionaalsete mutantide saamine Cre-lox süsteemi abil.....	14
1.4. Nestini ekspressioon südames.....	14
2. EKSPERIMENTAALOSA	16
2.1. Töö eesmärgid.....	16
2.2. Materjal ja meetodika	16
2.2.1. Töös kasutatud hiireliinid.....	16
2.2.2. Embrüote dissekteerimine	17
2.2.3. Embrüote genotüpiseerimine	17
2.2.4. Embrüote sisestamine koelõikude valmistamiseks	18
2.2.5. Parafiinlõikude valmistamine	18
2.2.6. Histoloogiliste preparaatide valmistamine.....	19
2.2.7. Immuunohistokeemiline analüüs parafiinlõikudele	19
2.2.8. Koelõikude pildistamine	20

2. 3. Tulemused.....	20
2.3.1. <i>NestinCre;Ric8^{lacZ/lox}</i> embrüote südame morfoloogia hindamine	20
2.3.2. Laminiin-1 ja β 1-Integriin lokaliseerimise analüüs	21
2.3.3 α SMA ja $G\alpha_{13}$ lokaliseerimise analüüs.....	23
2.4. Arutelu	25
KOKKUVÕTE.....	28
RESÜMEE/SUMMARY.....	29
KIRJANDUSE LOETELU.....	31
LIHTLITSENTS.....	37

KASUTATUD LÜHENDID

NC – *neural crest*, neuraalhari

NCCs – *neural crest cells*, neuraalharja rakud

CNC – *cardiac neural crest*, südame neuraalhari

CNCCs – *cardiac neural crest cells*, südame neuraalharja rakud

SMCs – *smooth muscle cells*, silelihasrakud

CA – *coronary artery*, pärgarter

CAO – *coronary artery orifice*, pärgarteri ava

RIC-8 – *resistant to inhibitors of cholinesterase 8*

GEF – *guanine nucleotide exchange factor*, guaniini nukleotiidivahetusfaktor

NSCs – *neural stem cells*, neuraalsed tüvirakud

G-valgud – guaniini nukleotiidi siduvad valgud

PBS – *phosphate-buffered saline*, fosfaatpuhvriga soolalahus

PFA – paraformaldehüüd

GPCR - *G-protein coupled receptor*, G-valguga seotud retseptor

OFT – *outflow track*, väljavoolu kulgla

SISSEJUHATUS

Imetaja süda on esimene organ, mis organogeneesi käigus funktsioneerima hakkab. Südame areng on keeruline protsess ning selle õige läbimine on vajalik organismi ellu jäämiseks ja elus püsimiseks. Paljude südamestruktuuride moodustumist on seostatud neuraalharjast pärit rakkude korrektse migreerumise ja diferentseerumisega südames. Üheks selliseks struktuuriks on vaskulaarpõimikutest välja arenevad pärgarterid, mis varustavad südant hapnikurikka vere ning toitainetega. Defektid vaskulaarpõimikute moodustumisel võivad viia pärgarterite laienemiseni, mis põhjustavad sagedasti esinevaid pärgarterite haiguseid.

Selleks, et rakud migreeruksid oma õigetesse kohtadesse ja diferentseeruksid korrektselt, on vajalikud erinevate signaalivõrgustike toimimine. Loomariigis konserveerunud G-valkude vahendatud signaali ülekanne on üheks levinumaks mehhanismiks rakuvälise signaali edastamiseks rakusisesesse keskkonda. G-valkude aktiveerimisel osalevad membraanseoselised retseptorid ja rakusisesed G-valgu aktiivsuse regulaatorid. RIC-8 toimib G-valkudele kui molekulaarne tsäperon, kontrollides nende hulka rakus, ning kui guaniini nukleotiidivahetusfaktor, pikendades ja võimendades G-valkude signaali. RIC-8 funktsiooni on seostatud närvisüsteemi arengu ja talitlusega ning ta mõjutab ka lihaste ja südame arenemist. Sellest tulenevalt uurisime antud valgu mõju südame arengus.

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks on anda kirjanduse ülevaade kardiogeneesist, mille puhul pööratakse suuremat tähelepanu vaskulaarpõimikutest välja arenevate pärgarterite struktuurile ja funktsioonile. Lisaks kirjeldatakse neuraalharja rakkude tähtsust südame arengus ning guaniini nukleotiidivahetusfaktori RIC-8 rolli G-valkude vahendatud signaaliülekandes. Töö eksperimentaalses osas uuritakse vanuses E13.5 ja E14.5 *NestinCre;RIC8a* konditsionaalsete embrüote ja nende pesakonnakaaslaste südameid, keskendudes vaskulaarpõimikute piirkonnale.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Ülevaade kardiogeneesist

Südame eellasrakkudest eristumine algab vahetult peale gastrulatsiooni, mil embrüo anterioorses osas moodustuvad paarilised ektodermaalsed südameplaadid. Nende basaalsetest rakkudest eristuvad omakorda endoteeliaalsed rakud, mis edasise arengu käigus moodustavad kaks endokardiaalset südamatoru (Kirby, 2007). Need torud joonduvad üksteise suhtes paralleelselt ning sulguvad ventraalsel keskjoonel ning moodustavad koos väljaspool paikneva primitiivse müokardiga tuksuva südame hiire kaheksandaks embrüonaalseks arengupäevaks (Kaufmann ja Bard, 1999). Müokardi ja seesmise endoteelirakkude kihi vahelise ruumi täidab ekstratsellulaarne maatriks (*cardiac jelly*) (Wessels ja Markwald, 2000). Lineaarne südamatoru teeb läbi lingustumise (*looping*), mille tulemusena südamatoru keskosa pöörduv paremale ja posterioorne osa vasakule üles (Kaufman ja Bard, 1999; Kirby, 2007). Samaaegselt toimub südamatoru pikenemine, tulevaste kambrite eristumine ja kambrite vaheseina tekkimine (Anderson et al., 2006; Kirby, 2007). Primitiivne vereringe on jälgitav hiirel vanuses E8.5, kui oksügeniseeritud veri suunatakse platsentast loote kehasse ja hapnikuvaene veri loote kehast platsenta poole (Kaufman ja Bard, 1999).

Definitiivse südame arenguga on seotud kolm ekstrakardiaalset rakkude populatsiooni. Nendeks on proepikardiaalorgan, millest pärinevad rakud katavad südame välispinda ja väljavoolukulglat (OFT); dorsaalne mesokard, mis panustab primitiivse kodadevahelise vaheseina moodustumisesse, seob esialgse kodade kambri embrüo keskjoonele ja ühendab kopsuveeni sissevoolu primitiivse kojakambriga (Webb et al., 1999); ning südame neuraalharja rakud, mis migreeruvad väljavoolu kulglasse, aitavad kaasa aordikaare arterite arengule, väljavoolukulgla septatsioonile ja väljavoolukulgla klappide moodustumisele (Kirby, 2007).

Eristumata OFT koosneb aordikotist (*aortic sac*), arteriooskehast (*truncus arteriosus*) ja südamesibulast (*bulbus cordis*). OFT edasisel arengul panevad need osad aluse klappide ja aordi ja kopsutüve põhiosadele (Webb et al., 2003). Aordikott jaguneb tänu sisse migreeruvatele neuraalharja rakkudele (NCC), jagades distaalse OFT aordi- ja kopsukanaliks (Kirby, 2007). Sellele järgneb OFT proksimaalse osa ja poolkuuklappide septatsioon, mille käigus tekkiva vaheseina proksimaalne osa sulgub järk-järgult ühisvatsakese suunas. NCCs

migreeruvad endokardi ja südame välimise kesta vahele, põhjustades luumenis üksteise poole sirutuvate paksendiharjade tekke. Need kohtuvad valendiku keskel, paksendeid kattev endokard lagundatakse ja vaheseina moodustub mesenhüümist ja müokardist (Waldo et al., 1999).

Vatsakeste ja kodade sisse moodustavad trabeekulid, mis suurendavad müokardi oksügenatsiooni koronaarse tsirkulatsiooni puudumisel. Ventrikulaarsetes seintes on rohkem trabeekuleid kui kodade seintes (Wessels ja Sedmera, 2003). Müokardi välimine osa koosneb kompaktselt lihaselisest kihist. Müokardi seinapaksenemine toimub eelkõige epikardi rakkude proliferatsiooni abil.

Südame lingustumine lõpeb hiirel E12,5-13.0, mil neljakambrilise südame osad on paigutatud oma definitiivsetele kohtadele, moodustunud on esialgsed kambritevahelised seinad ja südameklapid. Edasises arengus toimub kiire südame müokardi suurenemine, mis tingib südame veresoonestiku, sealhulgas pärgarterite, tekke.

1.1.1. Pärgarterid

Pärgarterid (CA) on veresooned, mis varustavad südamelihast ehk müokardi hapnikurikka vere ja toitainetega (Red-Horse et al., 2010). Need jaotatakse kaheks – paremaks ja vasakuks – sõltuvalt kummal pool südant nad paiknevad (Pires-Gomes ja Pérez-Pomares, 2013). Pärgarteri harud paiknevad aordi suhtes kindlates kohtades – üks aordiklapi paremas ja teine vasakus urkes. Selline spetsiifiline lokaliseerimine on vajalik selleks, et verevool läbi erinevate kudede oleks organiseeritud ja et efektiivselt transportida hapnikurikast verd ventrikulaarsesse müokardi (Chen et al., 2014). Pärgarterite süsteemi kuuluvad veel veresoonte võrgustikud, mis kõik kokku moodustavad nn. pärgarterite puu (Pires-Gomes ja Pérez-Pomares, 2013).

Pärgarterid arenevad endoteliaalsest põimikust, mis algselt ümbritseb südant ja on ajutine struktuur (Kirby, 2007). Põimikutest arenevad järk-järgult üksikud intramüokardiaalsed arterid, mis liituvad ja milledest lõpuks arenevad välja pärgarterid – üks peamine peaharu väiksemate kõrvalharudega (Kaufman ja Bard, 1999). Pärgarterid tungivad läbi vatsakeste südame tipuni, andes väikeseid harusid. Vaheseina arter varustab vatsakeste vaheseina (VS) ning annab aluse peamisele parempoolsele pärgarteri harule (Icardo ja Colvee, 2001).

CA peaharude algusosad tekivad väljavoolutrakti seinas ja tungivad edasisel arengul aorti (Chen et al., 2014). Pärgarterite avasid (CAO) pole leitud rohkem kui kaks ning need paiknevad aordi siinustes (urgetes). Vasakul pool asuvat CAO on leitud alati varem, mis lubab arvata, et selle poole pärgarter areneb välja varem (Bogers et al., 1989). CA areng algab koheselt pärast südame lingustumist. See on reguleeritud müokardi poolt, kuid on samal ajal seotud ka epikardi ja selle eellase – proepikardiaalse organi – arenguga (Morabito et al., 2002). Epikardi roll südame arengus on aja jooksul üha rohkem tähelepanu pälvinud. Kui varasemalt arvati, et üksnes kaitsvat ja passiivset rolli omav epikard ei ole südame arengus märkimisväärsel kohal, siis tänapäeval nimetatakse embrüonaalseks epikardiks kompleksset kude, mis lisaks südame koe rakkude arengusse panustamisele toimib ka kui parakriinne signalistasioonikeskus (Pires-Gomes ja Pérez-Pomares, 2013).

Pärgarteri puu olemasolu näidati esmakordselt 1981. aastal. Saadud tulemustest arvati, et pärgarterid tekivad aordi väljapungumisel (Viragh ja Challice, 1981). Sellega seletati, et pärgarterid saavad alguse proepikardist. Peagi järgnes uus avastus, kus pakuti pärgarterite tekkeks välja teine mehhanism. Nimelt aordi siinuse endoteeli rakuahelad kasvavad läbi aordi seinas ja moodustavad vaskulaarse põimiku (*plexuse*) piirkonna, kuhu hiljem tekivad pärgarterid (Tomanek, 2005). Kõige hilisemad uuringud on välja pakkunud veel kolmanda võimaluse pärgarterite tekkimise mehhanismile. Need tulemused põhinevad hiirtel teostatud katsetel ning väidavad, et erinevat tüüpi CA rakkudel on erinev embrüoloogiline päritolu (Red-Horse et al., 2010; Tian et al., 2013). Uuringutega näidati, et mõned juba diferentseerunud venoosse endoteeli rakud säilitavad n.ö. arengulise plastilisuse, mis lubab arvata, et positsioonispetsiifilised südame signaalid käivitavad nende dediferentseerumise, mis võimaldab neil rakkudel areneda pärgarteriteks, kapillaarideks ja veenideks. Seega, pärgarterid pole pärit mitte proepikardist, vaid tekivad endoteeli hargnemisel (Red-Horse et al., 2010).

1.1.2. NC roll pärgarterite moodustumisel

Pikka aega oldi arvamisel, et üksnes kõrvaalgest kuni kolmanda somiidini (vastab rombomeeridele 6-8) asetsev neuraalhari (*postotic* NC) mängib olulist rolli südame arengus. Usuti, et *postotic* NCCs liiguvad südamesse ning panustavad erinevate struktuuride, nagu suurte veresoonte, aordi ja kopsutüve vahelise vaheseina ning väljavoolu kulgla padjandite

arengusse (Kirby, 2007). Aastal 2012 avaldati Nature artikkel uue avastusega, mis väitis, et ka kõrvaalgest eespool asuv neuraalharja regioon (*preotic* NC) mängib olulist rolli südame arengus (Arima et al., 2012). Uurimuse teeb muljetavaldavaks, et erinevate mudelorganismidega (hiired, kanad ja vutid) tehtud katsetega näidati püstitatud hüpoteesi tõenduspärasus, et ka *preotic* NC panustab südame arengusse. Tõendamiseks teostati immuunohistokeemilised analüüsid erinevate antikehadega, mille hulka kuulus ka α SMA, mis on silelihase marker ning tunneb ära ka neuraalharja päritolu rakud. Lisaks kasutati neuraalharja päritolu tuvastamiseks *Wnt1-cre* transgeenset hiirliini, mida ristati reporterhiireliiniga Rosa-26. *LacZ* ekspressiooni jälgimiseks kasutati Xgal värvingut ning südame veresooneid tehti nähtavaks tindi süstimisega. Tulemustest saadud info põhjal selgus, et nii hiirel kui linnul olid *preotic* NCCs rakud liikunud südame piirkonda ning diferentseerunud muuhulgas silelihasrakkudeks ning nad panustavad ka konotrunkaalse regiooni ja vatsakeste vaheseina arengusse (Arima et al., 2012). Lisaks on *preotic* NC seotud pärgarterite formeerumisega, kontrollides veresoonte seinaterviklikkust. Nende rakkude puudumine põhjustab vatsakeste vaheseina defekte, mis näitab südame struktuuride arengu otsest seost nendest neuraalharja rakkudega (Arima et al., 2012). *Preotic* NC rakkude migreerumine südamesse reguleerib ka teisi rakkusid, mis osalevad vatsakeste vaheseina ja papillaarlihaste arengus (Arima et al., 2012). Kui varasemad uuringud on leidnud, et südame NCCs tulenev tüvirakkude populatsioon võib diferentseeruda ka kardiomiotsüütideks (Tamura et al., 2011), siis Arima jt (2012) uurimustöös näidati, et *preotic* NC ei diferentseeru kardiomiotsüütideks.

NCCs-de pluripotsentsuse vähenemine, nende järkjärguline diferentseerumine erinevat tüüpi rakkudeks ja migreerumine vajab kompaktsid rakuautonoomseid protsesse ja rakuväliseid signaale. Selle viivad läbi G-valgud ja nendega seotud endoteliini retseptorid (Dettlaff-Swiercz et al., 2005). Oluline on siinkohal rõhutada, et just $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ allareguleerimine neuraalharja rakkudes põhjustab spetsiifilisi südame väärarenguid, millede hulka kuuluvad ka laienenud valendikuga pärgarterid.

1.2 Guaniini nukleotiidivahetusfaktor RIC-8

1.2.1. RIC-8 üldine iseloomustus

Ric-8 (*Resistance to inhibitor of cholinestrase*) on evolutsiooniliselt konserveerunud geen, mis kodeerib 566 aminohappest koosnevat 63kDa valku RIC-8, mida esmakordselt kirjeldati varbussi *Caenorhabditis elegans* mutantidel, kellel esines resistentsus koliinesteraasi inhibiitorite suhtes (Gabay et al., 2011; Miller et al., 2000, 1996). Mutatsioonid esinesid geenides, mis kodeerisid G-valgu signalisatsiooni ning sünaptilise ülekandega seotud valke (Miller et al., 1996). Struktuurilt koosneb RIC-8 kümnest armadillo motiivist, mis sisaldavad endas kokkupakitud alfa heelikseid (Figuroa et al., 2009). Selline struktuur võimaldab neil interakteeruda paljude teiste valkudega ning seeläbi mõjutada paljusid bioloogilisi protsesse (Figuroa et al., 2009).

RIC-8 peamiseks funktsioonideks peetakse tema rolli guaniini nukleotiidivahetusfaktorina (GEF) (Tall et al., 2003), samuti ka võimet toimida G-valkudele molekulaarse tsäperonina (Gabay et al., 2011). RIC-8 osaleb G-valkude biosünteesis ja vahendab $G\alpha$ -subühikute lokaliseerumist plasmamembraanile. Sellega kontrollib RIC-8 G-valkude hulka rakus ning on vajalik, et hoida G-valgu α -subühikute tase normaalsena (Chan et al., 2013; Gabay et al., 2011).

RIC-8 rolli on uuritud mitmetel mudelorganismidel, nagu näiteks varbruss (*Caenorhabditis elegans*) (Miller et al., 1996), äädikakärbes (*Drosophila melanogaster*) (David et al., 2005), koduhiir (*Mus musculus*) (Tõnissoo et al., 2003), sebrakala (*Danio rerio*) (Nagayoshi et al., 2007), kannuskonn (*Xenopus laevis*) (Romo et al., 2008), rott (*Rattus norvegicus*) (Thomas et al., 2008), limaseen (*Neurospora crassa*) (Wright et al., 2011) ja amööb (*Dictyostelium discoideum*) (Kataria et al., 2013). Selgrootud, varbuss ja äädikakärbes, omavad ühte *Ric-8* geeni, seevastu imetajatel ja sebrakalal on leitud kaks *Ric-8* homoloogi: *Ric-8A* ja *Ric-8B* (Nagayoshi et al., 2007; Tall et al., 2003). *Ric-8A* seondub $G\alpha_q$, $G\alpha_i$, $G\alpha_o$, $G\alpha_{12}$ ja $G\alpha_{13}$ valkudega ning *Ric-8B* $G\alpha_q$ ja $G\alpha_s$ valkudega (Tall et al., 2003).

Ric-8A rolli on näidatud signaaliülekanne regulatsioonil närvisüsteemis, rakkude jagunemisel embrüogeneesis ning rakkude adhesiooni, migratsiooni ja gastrulatsiooni protsessides (Fuentealba et al., 2013; Ma et al., 2012; Miller et al., 2000; Miller ja Rand,

2000; Tõnissoo et al., 2010, 2006). RIC-8A puudumine varajases embrüogeneesis on *C. elegans*, *D. melanogasteri* ja *Mus musculus* mudelorganismidele letaalne (Gabay et al., 2011; Hampoelz et al., 2005; Tõnissoo et al., 2010; Wang et al., 2005).

Hiire varajases arengus ekspresseerub RIC-8A närvisüsteemis: kraniaalganglionites, sümpaatilises tüves, neuraalorus ja teistes areneva aju piirkondades. Täiskasvanud hiires leidub RIC-8A-d neokorteksis, hipokampuses, vöökäärus, käbikemas ja väikeajus, mis vastutavad käitumuslike tunnuste eest (Tõnissoo et al., 2003). Heterosügootsetes *Ric8a knock-out* hiirtes põhjustab RIC8A vähesus suurenenud ärevust ja õppimise ning ruumilise mälu häireid (Tõnissoo et al., 2003 ja 2006). Katsed konditsionaalsete *knock-out* (CKO) hiirtega on näidanud, et *Ric8a* puudus postmitootilistest neuronitest põhjustab hiirte sünnijärgset suremust vanuses P0-P6, lihasnõrkust ja spasme, koordinatsiooni- ja tasakaaluhäireid ning südamerütmi ebakorrapärasusi, samuti südamelihase hüpoplaasiat (Ruisu et al., 2013). Samuti on näidatud, et RIC-8A puudus neuraalsetest eellasrakkudest mõjutab südame arengut, kuna vastsündinud P0 mutantsete hiirte südames on tuvastatud kaasasündinud südamedefekte: alaarenenud epikard, müokardi hüpoplaasia, kompakteerumishäiretest põhjustatud rohkete veresiinuste tekkimine vatsakeste vaheseinas, mis viib VSD-ni, ning laienenud pärgarterid (Piia Hurt, bakalaureusetöö 2015).

1.2.2. G-valgud ja RIC-8

Rakkude jagunemist, adhesiooni ja migratsiooni koordineerivad mitmed erinevad signaalide võrgustikud, mis on vahendatud ekstratsellulaarsete signaalide (näiteks hormoonid ja neurotransmitterid) edastamisel rakusisesesse keskkonda. Üheks enim kasutatud mehhanismiks on loomariigis konserveerunud G-valgude vahendatud signaali ülekanne. Heterotrimeersed G-valgud ($G\alpha\beta\gamma$) on membraanseoselised valgud, mis vahendavad signaale rakuvälisest keskkonnast raku seitse korda plasmamembraani läbiva retseptori (GPCR) vahendusel (Bastiani ja Mendel, 2006). Ligandi seondumine retseptori rakuvälisele domeenile aktiveerib GPCR-i, põhjustades selle konformatsioonilist muutust ning toimimist nukleotiidivahetusfaktorina (GEF – *Guanine exchange factor*). GEF aktiivsus vahendab retseptoriga seondunud G-valgu α -subühikul guanosiin-difosfaadi (GDP) vahetust guanosiin-trifosfaadi (GTP) vastu, mis aktiveerib ja vabastab $G\alpha$ -subühiku kui ka $G\beta\gamma$ -kompleksi. Aktiveeritud G-valgu subühikud reguleerivad edasisi efektorvalke ning signaaliradasid.

Signaali aktiivsus inaktiveeritakse $G\alpha$ -subühiku GTPaasse aktiivsuse tõttu, mis hüdrolüüsib seondunud GTP GDPks. Inaktiveeritud GDP- $G\alpha$ subühik seondub uuesti $G\beta\gamma$ -kompleksiga (Afshar et al., 2004; Bastiani ja Mendel, 2006; Tall et al., 2003). Lisaks GPCR vahendavad G-valkude aktiivsust ka mitmed teised rakusisesed regulaator-valgud. Üheks neist on guaniini nukleotiidivahetusfaktor RIC-8, mis seondub inaktiivse GDP- $G\alpha$ kompleksiga, mis viib GDP vabanemiseni ning sellega moodustub stabiilne nukleotiidivaba $G\alpha$ -RIC-8 kompleks. GTP seandumisel kompleksiga vabaneb RIC-8 ning $G\alpha$ -subühik on uuesti aktiveeritud. Selline protsess pikendab ja võimendab G-valgu vahendatud signaali (Afshar et al., 2005, 2004; Bastiani ja Mendel, 2006; Tall et al., 2003).

1.2.3. RIC-8A roll rakkude migratsioonil ja adhesioonil

Varasemad uuringud on näidanud, et RIC-8A on oluline ka neuraalharja rakkude (NCC) migratsioonil ja nendest pärit struktuuride arengul (Fuentealba et al., 2013; Maldonado et al., 2011). *Xenopus laevis* embrüotega on näidatud, et RIC-8A puudumise korral NCC rakkudest põhjustab ebakorrektselt rakkude migreerumist ja fokaalse adhesiooni vähenemist (Fuentealba et al., 2013). Samuti on näidatud RIC-8A seotust rakkude migratsioonil ja tsütoskeleti ümberkorraldustel dorsaalsete kurdude (*dorsal ruffle*) tekkel läbi $G\alpha_{13}$ vahendatud signaliseerimise (Wang et al., 2011).

RIC-8A rolli rakkude migreerumisel ja adhesioonil on uuritud ka hiire väikeajus, kus RIC-8A on oluline rakkude korrektseks migreerumiseks ja basaalmembraanile kinnitumiseks (Ma et al., 2012). *Ric-8A* konditsionaalsetel mutantsetel hiirtel puudub väikeaju Bergmanni gliia korrapärane asetus ning rakkude jätked pole võimelised seonduma basaalmembraani komponendi laminiiniga (Ma et al., 2012). RIC8 puudumine neuraalsetest eellasrakkudest põhjustab samuti häireid rakkude migratsioonis neurogeneesi käigus (Kask et al., 2015). Mutantsete hiirte ajukoor oli õhem ning ebakorrektsel morfoloogiaga sisaldas ektoopilisi väljakasve BM katkemise tagajärel (Kask et al., 2015). Ka *in vitro* katsete tulemused on näidanud, et RIC-8A defitsiitsed rakud ei ole võimelised moodustama korrektselt fokaalse adhesioonikomplekse (FAK) ega stressifibreid, mis põhjustasid rakkude vähenenud migreerumist peamiselt defektse $\beta 1$ -Integriini vahendatud signaaliraja tõttu (Ruisu et al., 2017).

1.3. Konditsionaalsete mutantide saamine Cre-lox süsteemi abil

Cre-loxP süsteem on koespetsiifiline meetod, mis võimaldab saada konditsionaalseid *knockout* hiiri ning uurida kindla geeni mõju olukorras, kus geeni täielik deletsioon viib arengu käigus embrüonaalse surmani. Koht-spetsiifiline rekombinatsioon annab võimaluse juhtida ning kontrollida geeni kustutamist ruumiliselt, ajaliselt ja kindlalt koes (Le ja Sauer, 2001; Sauer ja Henderson, 1988). Cre-loxP süsteem baseerub Cre-rekombinaasi võimel välja lõigata DNA järjestus, mis asub loxP saitide vahel (Sauer ja Henderson, 1988). Cre-rekombinaas (*Causes recombination*) on 38-kDa valk ning loxP saidid on spetsiifilised 34-bp järjestused, mis on pärit bakteriofaagi P1-st (Sternberg, 1981).

Konditsionaalse hiireliini saamiseks tuleb esmalt tüvirakkudes teostada homoloogiline rekombinaas, kus mutatsioon viiakse soovitud geeni. Seejärel süstitakse modifitseeritud tüvirakud blastotsüsti. Saamaks konditsionaalset *knockout* hiireliini tuleb ristata hiired, kellest üks kannab loxP saitide vahel olevat huvipakkuvat geeni, ning teist transgeenset hiirt, kellel ekspresseeritakse Cre-rekombinaasi (Le ja Sauer, 2001). Süsteemi saab kasutada transgeeni sisse või välja lülitamiseks, individuaalsete rakkude või rakuliinide jälgimiseks, reportergeeni ekspressiooniks ja inversioonide või translokatsioonide teostamiseks (Lambert et al., 2007). Konditsionaalne geeni deletsioon lubab hinnata geeni funktsiooni märklaud koes ilma mittemärklaud kudede segava ekspressioonita (Le ja Sauer, 2001).

1.4. Nestini ekspressioon südames

Nestin on intermediaalsete filamentide valk, mida on laialdaselt kasutatud neuraalsete tüvirakkude (NSCs) markerina (Park et al., 2010; Wagner et al., 2006). Seda valku võib leida peale närvisüsteemi organite ka südames (Kachinsky et al., 1995; Wagner et al., 2006), lihases (Kachinsky et al., 1994), nahas (Li et al., 2003) ja pankreases (Esni et al., 2004). Nestini puudumine põhjustab hiirtel peale vanust E8.5 embrüonaalset surma. Kuigi nestini roll embrüonaalses arengus pole veel lõplikult teada, on leitud erinevaid põhjendusi seletamiseks nestini puudumisest tulenevaid anomaaliaid. Ühelt poolt on arvatud, et nestin reguleerib NSCs-de apoptoosi ja rakkude uuenemist. Nestinit mittekodeerivat geeni omavatel

hiirtel oli teiste pesakonna kaaslastega võrreldes väiksemad kehamõõtmed ning neil hiirtel põhjustab nestini puudulikkus embrüonaalset surma peale vanust E8.5, mida põhjendati neuraaloru rakkude ulatusliku apoptoosiga (Park et al., 2010). Teiselt poolt on aga arvatud, et nestin reguleerib rakkude prolifereerumist (Liu et al., 2015). Leiti, et hiired, kes nestinit üleekspresseerivad on suuremad – nende keha kui ka süda ja eesajud olid mõõtmelt suuremad. Selliste hiirte südamed leiti olevat suuremate vatsakestega, paksema müokardiga, mis olid põhjustatud suuremõõtmelisematest kardiomyotsüütidest (Liu et al., 2015). Lisaks on leitud, et nestini ekspressioon panustab arenevate veresoonte rakkude arengusse (Lothian et al., 1999).

Nestinit ekspresseeritakse hiire kardiomyotsüütides vanuses E9.0-E10.5, pärast mida reguleeritakse nestini ekspressioon rakkudes alla (Kachinsky et al., 1995). Nestinit on leitud ka areneva südame epikardis ja arenevates koronaarveresoontes (Wagner et al., 2006) ning müokardis (Liu et al., 2015). Varasemad ristamiskatsed *Nestin-cre* ja *Rosa26* hiireliiniga vanuses E14.5 on näidanud, et LacZ ekspresseerub subepikardiaalkihis ja müokardis, kus ekspresseerus ka RIC-8A (Piia Hurt, bakalaureusetöö 2015).

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

Kui varasemalt on leitud, et vastsündinud Ric8CKO hiirtel esineb võrreldes kontrollhiirtega morfoloogilisi erinevusi (Piia Hurdi bakalaureusetöö, 2015), siis käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli uurida ja kirjeldada nende defektide tekkimise morfoloogilisi ja immuunohistokeemilisi mehhanisme embrüonaalse arengu perioodil, mil südame pärgarterid on oma tekkimise ja esialgse arengu algfaasis E13.5-E14.5.

1. Arenguhäirete morfoloogiline kirjeldamine
2. Laminiini ja integriini immunohistokeemilise ekspressioonimustri kirjeldamine
3. α SMA ja $G\alpha_{13}$ immuunohistokeemilise ekspressioonimustri kirjeldamine

2.2. Materjal ja meetodika

2.2.1. Töös kasutatud hiireliinid

NestinCre;Ric8a^{lacZ/lox} konditsionaalse hiireliini saamiseks kasutati järgmisi hiireliine:

1. *NestinCre* – transgeenne hiireliin, kus Cre-rekombinaasi ekspressioon on kontrollitud *Nestini* promootori poolt.
2. *Ric8a^{lox/lox}* – transgeenne hiireliin, kus loxP järjestuste vahele on asetatud märklaudegen *Ric8*, mille koespetsiifiline Cre-rekombinaas ära tunneb.
3. *Ric8^{lacZ/+}* – lacZ *knock-in* hiireliin, kus reportergeen *lacZ*, millelt sünteesitava β -galaktosidaasi ekspressioon matkib *Ric8a* ekspressiooni, on viidud *Ric8a* lookusesse.

NestinCre hiireliini Cre-rekombinaasi aktiivsuse iseloomustamiseks kasutati reporterliinina B6;129-Gt(ROSA) 26Sortm1Sho/J (ROSA26) hiireliini, kus loxP-STOP-loxP-lacZ konstrukt paiknes ROSA26 lookuses.

Kontrollgrupiks olid *NestinCre;Ric8a^{lacZ/lox}* perekonnakaaslased.

Bakalaureusetöös kasutati katseloomi vastavalt Euroopa Liidus kehtestatud eeskirjadele (FELASA). Loomadega tegelesid ja neid surmasid vastavalt EL direktiivile 2010/63/EU koolituse läbinud ja vastavat luba omavad isikud. Kõiki eksperimendis kasutatud hiiri hoiti standardsetes laboritingimustes, kus neile tagati ööpäevaringselt vabalt kättesaadav söök ja jook.

2.2.2. Embrüote dissekteerimine

Bakalaureusetöös uuritud hiireembrüod olid vanuses 13.5 ja 14.5 arengupäeva. Pärast emashiire kopulatsiooni ning vaginaalse limakorgi tekkimisel, loeti embrüote vanuseks 0.5 päeva (E0.5). Vastaval embrüonaalsel arengupäeval eemaldati embrüod emakasarvedest ning asetati 1x fosfaatpuhvrise (PBS, *phosphate-buffered saline*). Seejärel eemaldati embrüotelt lootekestad ning võeti rebukotist koeproov genotüpiseerimiseks. Embrüod pesti 1x PBS-iga ning fikseeriti üleöö 4% paraformaldehüüdi (PFA) lahuses.

2.2.3. Embrüote genotüpiseerimine

Embrüote genotüpiseerimiseks kasutati PCR meetodit. Dissekteeritud rebukoti koematerjalile lisati 100 µl lüüsilahust [proteinaas K lahus (187 ng/µl), 10x lüüsipuhvrist (180 mM Tris-HCl (pH 9.0); 20 mM (NH₄)₂SO₄; 0.02% Tween 20) ja Milli-Q veest] ning inkubeeriti 56°C juures üleöö. Järgnevalt inaktiveeriti lüüsilahuses olev proteinaas K 96°C juures 20 minutit ja tsentrifuugiti 10 minuti vältel 13000 p/min (Heraeus Instruments Biofuge Pico, Rotor w/ClickSeal lid).

PCR-i läbiviimisel kasutati alljärgnevaid alleelspetsiifilisi praimereid:

NestinCre

5' – AGGTGTAGAGAAGGCACTTAGC – 3'

5' – CTAATCGCCATCTTCCAGCAGG – 3'

Ric8LacZ/+

5' – CGCATCGTAACCGTGCATCT – 3'

5' – CTCTCCCAGCATCCCTCAC – 3'

5' – CACACCCCAGCCGAGTTG – 3'

Ric8lox/lox

5' – GGTAGGGCTCAATGTTGG – 3'

5' – GCCAAACAATCTCTCGAACC – 3'

PCR-i reaktsioonisegu komponendid olid 10x TaqBuffer (NH₄)₂SO₄-ga, 25 mM MgCl₂, 2 mM dNTP, Taq-polümeraas (5U/μl), ddH₂O, 0,5 μl DNA-d, praimerid. Reaktsioonisegu oli kokku 10 μl, uuringud teostati PCR masinaga Biometra Thermocycler.

PCR-i läbiviimise tingimused:

95°C 5 minutit

95°C 30 sekundit

58°C 40 sekundit

72°C 1 minut

72°C 10 minutit

4°C hoidmine

} 32 tsükli

PCR-i tulemused analüüsiti geelelektroforeesil, mille käigus reaktsiooniprodukte lahutati/eraldati 1% või 1,5% TBE (Tris-boraat-EDTA) agarosgeelil, mis sisaldas 7,5 μl etiidumbromiidi. Pikkusmarkerina oli kasutusel 1 kb DNA *ladder*.

2.2.4. Embrüote sisestamine koelõikude valmistamiseks

Embrüoid pesti 3x20 minutit PBS lahusega. Järgnevalt kasutati kasvava kontsentratsiooniga alkoholirida (50%, 60%, 70%, 80%, 96% ja 100% etanooli) üleöö. Seejärel inkubeeriti embrüosid 2x 2h ksülooliga ja 2x 2h parafiiniga. Lõpetuseks sisestati embrüod plokkidesse kindlas orientatsioonis, esmalt vormi õlitades ja seejärel seda parafiiniga täites. Selliselt sisestatud embrüod jäid külmaplaadile tahenema (MICROCIA, AP260-1).

2.2.5. Parafiinlõikude valmistamine

Koelõigud valmistati parafiini sisestatud embrüotest ja 1mm lõikudest. Parafiinblokkidest lõigati mikroomiga (Microm HM 355S) 8 μm lõigud, mis asetati adhesiivsetele alusklaasidele (Menzel-Gläser) ja lasti kuivada ning kinnitada 40°C juures vähemalt 24 tundi.

Parafiinlõigud hoiustati edasisteks katseteks toatemperatuuril.

2.2.6. Histoloogiliste preparaatide valmistamine

Histoloogiliste preparaatide valmistamiseks viidi läbi hematoksüliin-eosiin värving. Selleks hoiti lõikude kinnitumiseks esmalt preparaate 30 min 60°C juures. Seejärel deparafiniseeriti preparaate 3x5 minutit ksülooliga. Koelõikude rehüdreerimiseks kasutati kahaneva kontsentratsiooniga alkoholirida (100%, 96%, 90%, 70%, 50% etanool) 2 minutit ja seejärel ddH₂O 1 minutit. Värvimisprotsessil kasutati hematoksüliini 10 minutit, mille vältel värvusid rakutuomad sinakaks. Pärast esimest värvingut pesti üleliigne hematoksüliin lõikudelt maha ning asetati fikseerumiseks 10 minutiks kraanivette. Järgnes lõikude värvimine eosiiniga 2-3 minutit, mis värvis rakkude tsütoplasma punakaks. Üleliigne värv loputati lõikudelt maha ning asetati taas kraanivette. Värvingu lõppedes dehüdreeriti lõigud kasvava kontsentratsiooniga alkoholireas (70%, 96% ja 100% etanooli 2x1 minutit). Seejärel kanti lõikudele 2x2 minutiks ksülooli ning sulundati Kanada palsamiga (Sigma-aldrich) ja kaeti katteklaasiga.

2.2.7. Immuunohistokeemiline analüüs parafiinlõikudele

Immuunohistokeemilise reaktsiooni teostamiseks kuumutati parafiinlõike esmalt 30 minutit 60°C juures, et lõigud oleksid alusklaasile tugevalt kinnitunud. Koelõigud deparafiniseeriti ksüloolis 2x5 minuti vältel. Järgnevalt rehüdreeriti lõigud kahaneva kontsentratsiooniga alkoholireas (100%, 96%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%). Iga etanooli kontsentratsiooni juures hoiti lõike 2x1 minutit. Seejärel kanti lõikudele 2x1 minutiks ddH₂O. Koelõigud asetati 98°C juures 30 minutiks naatriumtsitratpuhvrise (10 mM, ph=6,0), et eemaldada fikseerimisel tekkinud valkudevahelised ristsidemed. Järgnevalt jahutati lõike 20 minutit ning permeabiliseeriti 0,1% TritonX/PBS lahuses 20 minutit. Lõike blokeeriti 1 h vältel 5% kitseseerumiga 1% BSA/PBS lahuses, et vältida immunoglobiini mittespetsiifilist seondumist. Seejärel inkubeeriti lõike niisutuskambris primaarsete antikehadega üleöö.

Kasutatud antikehad: küülikus valmistatud antikeha Laminiin-1 (Sigma Aldrich; lahjendusega 1:500) ja hiires valmistatud antikeha Integriin-β1 (12G10) (Santa Cruz; lahjendusega 1:400) ning jänese valmistatud antikeha Gα₁₃ (Santa Cruz; lahjendusega 1:100) ja αSMA (Santa

Cruz; lahjendusega 1:800). Negatiivse kontrolli puhul kasutati primaarse antikeha asemel 1% BSA/PBS lahust. Järgnevalt pesti lõike 3x5 minuti jooksul 1x PBT (PBS; 20% Tween-20) lahusega ning inkubeeriti sekundaarsete antikehadega Alexa *goat-anti-mouse* 555 ja *goat-anti-mouse* 488 (lahjendusega 1:1000), Alexa *goat-anti-rat* 555 ja *goat-anti-rat* 488 (lahjendusega 1:1000), Alexa *goat-anti-rabbit* 555 ja *goat-anti-rabbit* 488 (lahjendusega 1:1000)(Molecular Probes, Eugene, OR) 1 h niisutuskarbis toatemperatuuril pimedas. Seejärel pesti lõike 2x5 min 1x PBT lahusega ja 2x5 min PBS lahusega ning inkubeeriti 2 minutit DAPI-ga PBS-s (4',6-diamidino-2-fenüülindool) (Sigma Aldrich, lahjendusega 1:1000), mis aitab rakkudes nähtavale tuua tuumades paikneva DNA. Järgnevalt pesti lõike 2x5 min 1x PBS lahusega. Lõpuks sulundati lõigud Fluoromount geeliga (Electron Microscopy Sciences) ning kaeti katteklaasiga. Lõikude täieliku kuivamise vältimiseks lakiti katteklaaside servad läbipaistva lakiga.

2.2.8. Koelõikude pildistamine

Histoloogilisi ja immuunohistokeemilisi preparaate pildistati ja analüüsiti mikroskoobiga Olympus BX51 Quantum, mis oli varustatud Olympus DP71 kaameraga. Immuunohistokeemiliste preparaatide analüüsimiseks kasutati lisaks konfokaalmikroskoopi Olympus IX81 ning selle programmi Fluoroview™ FV1000. Saadud piltide järeltöötamiseks ja dokumenteerimiseks kasutati arvutiprogrammi Adobe Photoshop CS4 11.0.

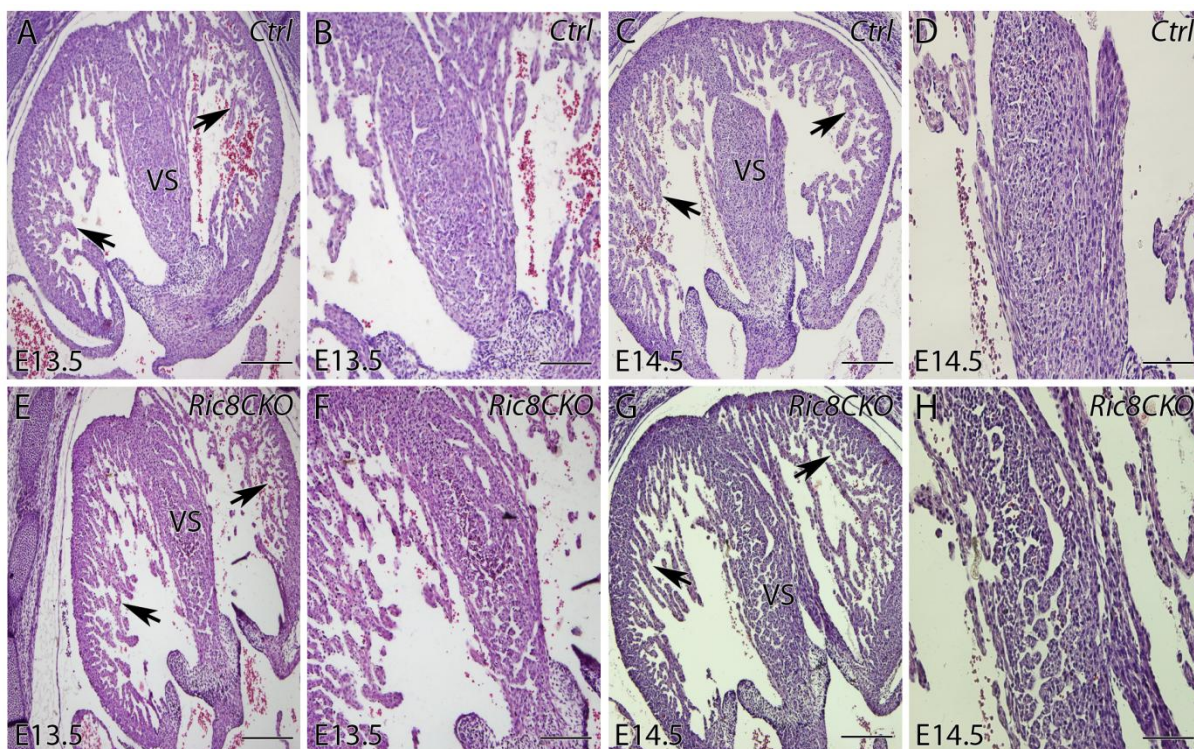
2. 3. Tulemused

2.3.1. *NestinCre;Ric8^{lacZ/lox}* embrüote südame morfoloogia hindamine

Antud bakalaureusetöös võrreldi E13.5 ja E14.5 vanuses olevaid *Ric8a* mutantseid konditsionaalseid *NestinCre;Ric8^{lacZ/lox}* (edaspidi Ric8CKO) embrüosid ja kontrollpesakonnakaaslaste embrüote südame arengut.

Varasemalt on leitud, et vastsündinud P0 Ric8CKO hiirtel esineb südames morfoloogilisi erinevusi võrreldes kontrollhiirtega (Piia Hurt, bakalaureusetöö 2015), seega oli käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks uurida ja kirjeldada nende defektide tekkimise mehhanisme embrüonaalse arengu perioodil. Esmalt uuriti E13.5 ja E14.5 Ric8CKO embrüote südame morfoloogiat eosiin-hematoksüliiniga töödeldud histoloogilistel lõikudel. Tulemused

analüüsidest leiti, et E13.5 kontrollembrüo areneva südame vatsakeste vahesein on rohkem kompakteerunud (Joonis 1 A, B; n=1) kui Ric8CKO embrüo vatsakeste vahesein (Joonis 1 E, F; n=1). Sarnase tulemuseni jõuti ka E14.5 vanuste kontrollembrüote (Joonis 1 C, D; n=3) ja Ric8CKO (Joonis 1 G, H; n=3) embrüote südame võrdlemisel. Lisaks leiti, et E13.5 ja E14.5 vanuse kontrollembrüote südame vatsakeste parietaalse seina müokardi trabeekulite kiht on tihedam ja korrapärasem (Joonis 1 A, C) võrreldes Ric8CKO mutantsete südametega, kus trabeekulid paiknesid hõredamalt ning olid väiksemad (Joonis 1 E, G).

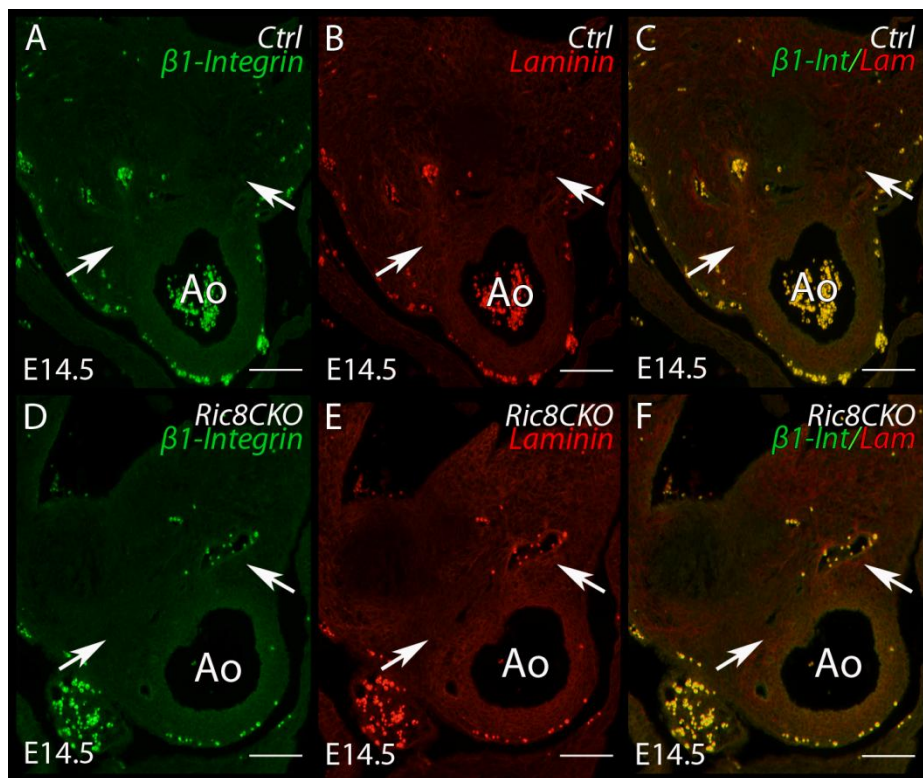


Joonis 1. E13.5 ja E14.5 Ric8CKO embrüote südames on vatsakeste vahesein vähem kompakteerunud ning müokardi trabeekulite kiht on hõredam (mustad nooled). (A, C) E13.5 ja E14.5 kontroll-embrüo (Ctrl) südame ristlõigud. (B, D) Suurendatud väljalõiked vatsakeste vaheseinast (VS) vastavalt A ja C piltidelt. (E, G) E13.5 ja E14.5 Ric8a mutantse konditsionaalse embrüo südame (Ric8CKO) südame ristlõigud HE värvinguga. (F, H) Suurendatud väljalõiked piltide E ja G vatsakeste vaheseinast. Hematoksüliin-eosiin. Mustad nooled tähistavad vatsakeste trabeekulite piirkondi. Mõõtlõik, 100 µm.

2.3.2. Laminiin-1 ja β 1-Integriin lokalisatsiooni analüüs

Järgnevalt uuriti immunohistokeemilise analüüsiga basaalmembraani komponenti laminiini, kasutades küülikus valmistatud Laminiin-1 vastast antikeha, ning selle retseptorit β 1-

integriini, kasutades hiire valmistatud $\beta 1$ -Integriini vastast antikeha. Katse tulemusi analüüsidest leiti, et $\beta 1$ -Integriini ekspressioon on kontrollhiirte ja Ric8CKO mutantsete hiirte vaskulaarpõimikute piirkonnas võrdne (Joonis 2 A, D; n=3). Seevastu, Laminiin-1 ekspressioonitase oli Ric8CKO embrüote vaskulaarpõimikute piirkonnas kõrgem võrreldes kontrollembrüote sama piirkonnaga (Joonis 2 B, E; n=3). $\beta 1$ -Integriini ja Laminiin-1 kolokalisatsioon oli sarnane nii kontrollembrüo südames kui ka Ric8CKO vaskulaarpõimikute piirkonnas (Joonis 2 C, F). Antud katsetes avaldus ka tendents, kus võrreldavatel lõikudel hinnatud E14.5 Ric8CKO embrüote südames on pärgarterite vaskulaarpõimikud laiemate valendikega, rohkem harunenud ning hõlmavad suurema ala kui pesakonnakaaslaste südames (Joonis 2, valged nooled). Need tulemused annavad alust arvata, et Ric8CKO mutantsetes südames on need kiiremini arenenud, mis võivad viia laienenud pärgarteriteni P0 hiirte südames (Piia Hurt, bakalaureusetöö 2015).

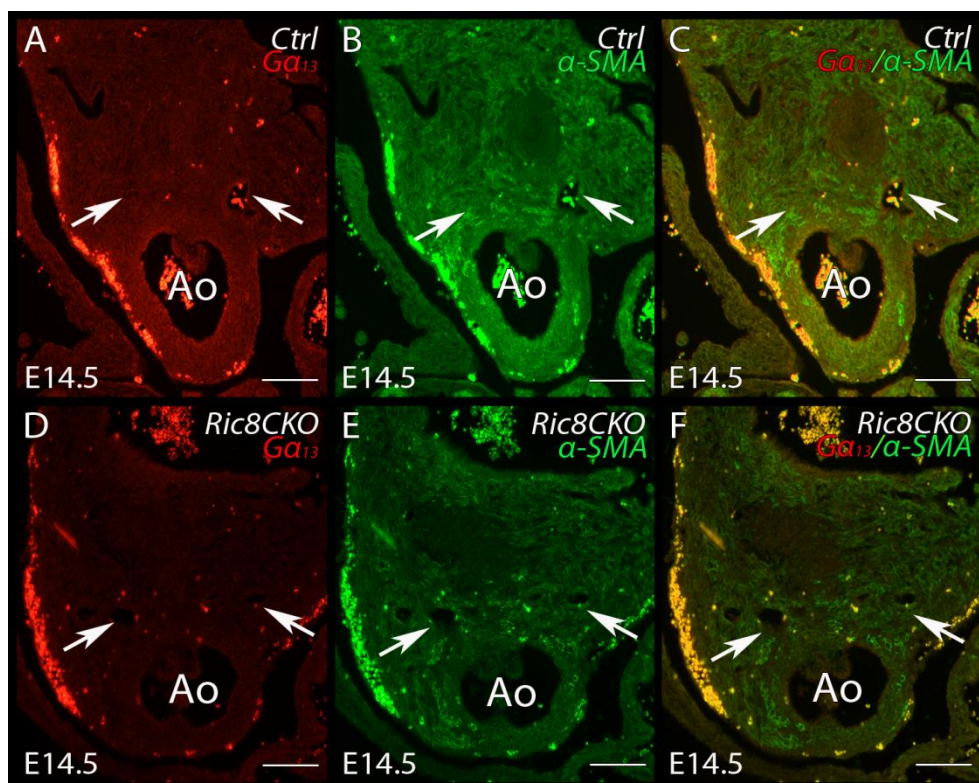


Joonis 2. E14.5 Ric8CKO embrüote vaskulaarpõimikute piirkonnas (valge nool) on Laminiin-1 ekspressioonitase kõrgem. Ristlõigud (A, B, C) kontrollembrüote (Ctrl) ning (D, E, F) Ric8a mutantse hiire embrüote (RicCKO) südame piirkonnast. (A, D) $\beta 1$ -Integriin ekspressioonimuster. (B, E) Laminiin-1 ekspressioonimuster. (C, F) $\beta 1$ -Integriin ja Laminiin-1 kolokalistatsioon. Valged nooled tähistavad vaskulaarpõimikute piirkonda. Lühendid: (AO) aort. Mõõtlõik, 100 μm .

2.3.3. α SMA ja $G\alpha_{13}$ lokaliseerimise analüüs

Histoloogiliste preparaatide analüüsi järgselt soovisime teada neuraalharja päritolu rakkude lokaliseerimise südames. Selleks ilmutasime immuunohistokeemiliselt neuraalharja päritolu markeri – α SMA. Tulemustest selgus, et nii kontroll-embrüotel (n=3) kui ka Ric8CKO mutantidel (n=3) on α SMA positiivsete rakkude hulk vaskulaarpõimikute arenemise piirkonnas hinnanguliselt sarnane (Joonis 3. B, E), millest võib järeldada, et mõlemal juhul migreeruvad NC derivaadid südamesse. Teiseks leidsime, et α SMA positiivsed NC pärit rakkud asuvad rohkem aordi ümbruses ning vaskulaarpõimikute piirkonnas nii Ric8CKO kui ka pesakonnakaaslastel (Joonis 3. B, E). Sellest võib järeldada, et mutantsetes embrüotes migreeruvad NC derivaadid normaalselt aordi ja vaskulaarpõimikute piirkonda, panustades nende arengusse.

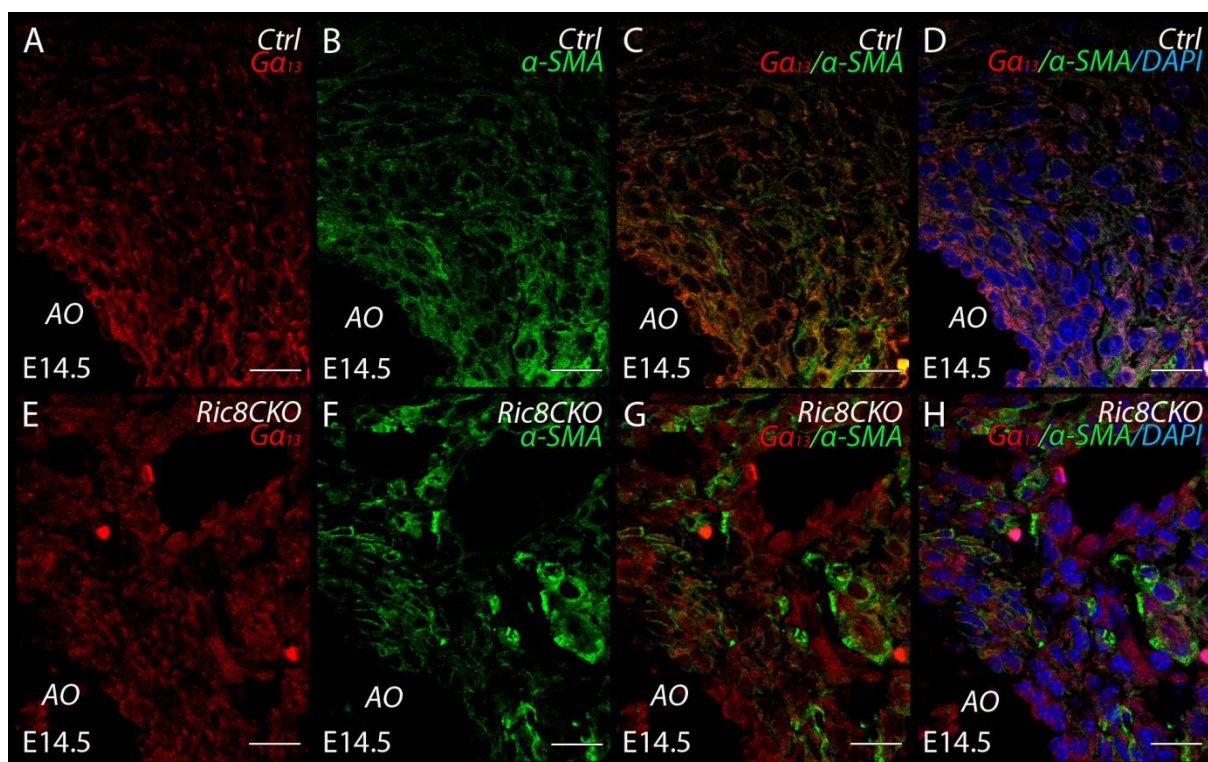
Uurimaks RIC-8A otseseid interaktsioonipartnereid, tegime katse $G\alpha_{13}$ vastase anti-keha kasutades ning leidsime, et Ric8CKO hiirtel (n=2) on võrreldes pesakonnakaaslastega (n=2) $G\alpha_{13}$ üldine ekspressioonitase vaskulaarpõimikute piirkonnas alla reguleeritud (Joonis 3 A, D).



Joonis 3. E14.5 Ric8CKO embrüote $G\alpha_{13}$ ekspressioonitase on vaskulaarpõimikute piirkonnas (valged nooled) alla reguleeritud. Ristlõigud (A, B, C) kontrollembriote (Ctrl) ning (D, E, F) Ric8a mutantse hiire embrüote (Ric8CKO) südame piirkonnast. (A, D) $G\alpha_{13}$ ekspressioonimuster. (B, E) α SMA ekspressioonimuster.

(C, F) $G\alpha_{13}$ ja α SMA kolokalistasioon. Valged nooled tähistavad vaskulaarpõimikute piirkonda. Lühendid: (AO) aort. Mõõtlõik, 100 μ m.

Selleks, et uurida lähemalt $G\alpha_{13}$ ja α SMA lokalisatsiooni ja kolokalisatsiooni vaskulaarpõimikute piirkonnas, kasutasime koelõikude pildistamiseks konfokaalmikorskoopi. Tulemusi analüüsid leidsime, et kontrollembrüotel moodustab α SMA muster antud piirkonnas korrapärase ning seotud võrgustiku (Joonis 4 B). Ric8CKO mutandil aga nägime, et α SMA muster on kohati katkendlik ning ebakorrapärasem (Joonis 4 F). Lisaks leidsime, et kontrollembrüöl oli märgata suuremat $G\alpha_{13}$ ja α SMA kolokalistasiooni rakkude ümber, mis sidus võrgustikuna rakke omavahel (Joonis 4 C, D). Seevastu mutandil kolokalistasioon peaaegu puudus, rakkudel puudus ühendav struktuur (Joonis 4. G, H). Samuti oli Ric8CKO hiireliini vaskulaarpõimikute piirkonnas märgata kohati üksnes $G\alpha_{13}$ -ga ümbritsetud tuumasid, kohati üksnes α SMA-ga ümbritsetud tuumasid (Joonis 4 G, H).



Joonis 4. E14.5 Ric8CKO embrüote $G\alpha_{13}$ ja α SMA ekspressioonimuster on katkendlik ja ebäühtlane, kolokalistasioon peaaegu puudub. Ristlõigud (A, B, C, D) kontrollembrüote (Ctrl) ning (E, F, G, H) Ric8a mutantse hiire embrüote (RicCKO) vaskulaarpõimikute piirkonnast. (A, E) $G\alpha_{13}$ ekspressioonimuster. (B, F) α SMA ekspressioonimuster. (C, G) $G\alpha_{13}$ ja α SMA kolokalistasioon. (D, H) $G\alpha_{13}$, α SMA ja DAPI kolokalistasioonimuster. Lühendid: (AO) aort. Mõõtlõik, 100 μ m.

2.4. Arutelu

Käesolevas bakalaureusetöös leiti, et Ric8CKO mutantide ja kontroll-pesakonnakaaslaste vahel esines morfoloogilisi ja immuunohistokeemilisi erinevusi südame arengus juba vanuses E13.5 ja E14.5. Mutandil esinesid kompakteerumishäired vatsakeste vaheseinas, väiksemad ja hõredamad trabeekulid ning kiiremini välja arenenud pärgarterite (CA) vaskulaarpõimikud, mis väljendusid nende suuruse erinevuses võrreledes pesakonnakaaslastega. Need tulemused võivad anda seletuse varem sama hiireliini mutantsete P0 vanuses südames leitud VSD, trabeekulite diameetri vähenemise ning laienenud pärgarterite tekke põhjustele (Piia Hurt, bakalaureusetöö 2015). Kirjandusest on teada, et südamesse migreerunud NCCs panustavad vatsakeste vaheseina- ning pärgarterite moodustumisesse (Arima et al., 2012). Meie katsete tulemused näitasid, et α SMA positiivseid rakke oli vaskulaarpõimikute piirkonnas hinnanguliselt võrdselt, mis lubavad arvata, et Ric8CKO hiireliinil pole NC derivaatide migreerumine antud piirkonda häiritud. Nestin ekspresseerub hiire areneva südame epikardis, arenevates koronaarsetes veresoontes (Wagner et al., 2006) ning müokardis paiknevates kardiomüotsüütides (Kachinsky et al., 1995; Liu et al., 2015). Samuti on leitud, et RIC-8A ja Nestin ekspresseeruvad samades südame piirkondades, subepikardiaalkihis ja müokardis (Piia Hurt, bakalaureusetöö 2015), mille põhjal järeldati, et Ric8CKO mutantsetel hiirtel on RIC-8A nendest piirkondadest välja lülitatud. Koronaarse veresoonekonna ja silelihasrakkude (SMCs) tekkimiseks on vajalik epikardi epiteel-mesenhümaalne transitsioon (Pérez-Pomares et al., 1997), tänu millele moodustuvad pärgarterite SMCs, müokardi fibroblastid ja kapillaaride endoteel (Kirby, 2007). Seega häired epikardist pärit rakkude migreerumisel ja differentseerumisel võivad viia eelpool mainitud anomaaliateni. Sellest võime järeldada, et RIC-8A puudumine neuraalharja rakkudest, kardiomüotsüütidest ja epikardi rakkudest võib olla CA vaskulaarpõimikute ja trabeekulite ebakorrekse arengu ning vaheseina kompakteerumishäirete põhjuseks.

Uurimaks defektide võimalikke tekkemehhanisme, tegime immunohistokeemilise analüüsi α SMA, $G\alpha_{13}$, β 1-Integriin ja Laminiin-1 vastaste antikehadega. α SMA on silelihasrakkude (SMCs) marker, mis tunneb ära ka neuraalharja päritolu rakud (Arima et al., 2012). Katsete tulemustest leidsime, et α SMA positiivsete rakkude hulk vaskulaarpõimikute piirkonnas oli nii kontrollil kui Ric8aCKO mutandil hinnanguliselt võrdne. Sellest võime järeldada, et RIC-8A välja lülitamisel pole NC derivaatide migreerumine antud piirkonda häiritud. $G\alpha_{13}$, RIC-8A otsene interaktsioonipartner, ekspressioon südames oli mutandil alla reguleeritud. Sarnase

tulemuseni *Nes;Ric8aCKO* hiireliini uurides on jõutud ka neokorteksit ja hipokampust (Kask et al., 2015) ning tüvirakke (Ruisu et al., 2017) uurides. RIC-8A on G-valkudele molekulaarseks tsäperoniks, vahendades $G\alpha$ -subühikute seondumist plasmamembraaniga ning sellega kontrollides nende hulka rakus (Gabay et al., 2011). Samuti omab RIC-8A GEF toimet $G\alpha$ subühikutele, mis pikendab ja võimendab G-valgu signaali (Afshar et al., 2005; Bastiani ja Mendel, 2006; Tall et al., 2003). NCCs-de korrektseks migreerumiseks on vajalik RIC-8A õige interaktsioon signaalikaskaadis olevate valkudega, mille puudumine viib rakkude ebakorrekse migreerumise ja adhesiooni vähenemiseni (Fuentealba et al., 2013). Laminiini ja integriini ekspressiooni vaatasime, et tuvastada, kas RIC-8A puudumisel ilmneb signaaliraja häireid rakkude adhesioonil ja migratsioonil. Laminiin, peamine basaalmembraani (BM) valk (Timpl, 1996), ümbritseb tulevaste veresoonte rakke südames (Rienks et al., 2014). Meie katsete tulemused näitasid, et *Ric8CKO* hiirte vaskulaarpõimikute piirkonnas on Laminiini ekspressiooni tase kõrgem võrreldes pesakonnakaaslaste sama piirkonnaga. See lubab oletada, et varasem vaskulaarpõimikute arenemine mutantsete hiirte südames põhjustab varasemat BM teket, mille tulemusena laminiini ekspressioon mutandi vaskulaarpõimiku piirkonnas oli kõrgem. Basaalmembraanil lokaliseeritud laminiin on võimeline seonduma läbi rakumembraani ulatava integriiniga (Belkin ja Stepp, 2000). Integriin on vajalik BM-laminiin võrgustiku tekkeks, mis on aluseks korrektsele BM-le, mis võimaldab rakkude adhesiooni ning rakk-BM vahelist kontakti (Yang et al., 2015). Meie katse tulemused näitasid, et $\beta 1$ -Integriini ekspressioon oli *Ric8CKO* ja pesakonnakaaslaste südames sarnane. See lubab arvata, et $\beta 1$ -Integriini hulk vaskulaarpõimikute piirkonnas pole mutantsel hiirel võrreldes kontrolliga muutunud, kuid see lubab üksnes spekuloida, kas $\beta 1$ -Integriini aktiveeritud vormi hulk on mutantse ja kontrollhiire puhul vaskulaarpõimikute piirkonnas võrdne (Ruisu et al., 2017). $G\alpha_{13}$ on võimeline raku sees seonduma integriiniga (Gong et al., 2010). Varasemalt on leitud, et RIC-8A puudumisel on rakkude seondumine laminiinile häiritud, mis viib rakkude ebakorrekse migreerumiseni (Kask et al., 2015). Samuti on leitud, et RIC-8A on vajalik $\beta 1$ -Integriin aktivatsiooniks ja $\beta 1$ -Integriini poolt vahendatud rakkude migratsiooniks (Ruisu et al., 2017). Sellest võime oletada, et RIC-8A puudumine põhjustab $G\alpha_{13}$ allareguleerimist, mis võib omakorda viia $\beta 1$ -Integriini inaktivatsioonini. See omakorda võib põhjustada laminiini ebakorrapärasust BM-l, ning viia NCC-de, epikardi rakkude ja kardiomyotsüütide adhesiooni ja migratsiooni häireteni. Lisaks võivad need põhjustada CA vaskulaarpõimikute ja trabeekulite anomaaliaid ning kompakteerumishäireid, mis võivad olla

sama hiireliini P0 südame puhul leitud defektide põhjuseks (Piia Hurt, bakalaureusetöö 2015).

KOKKUVÕTE

Antud bakalaureusetöö eesmärgiks oli uurida ja kirjeldada *Nestin-cre;Ric8a* konditsionaalsete hiirte südame võimalikke arengudefekte, pöörates suuremat tähelepanu vaskulaarpõimikute piirkonnale, kus arenevad välja pärgarterid. Samuti tahtsime uurida, mis võis olla eelkirjeldatud defektide põhjuseks. Selleks uurisime neuraalharjarakkude markerit α SMA-d, RIC-8A otsest interaktsioonipartnerit $G\alpha_{13}$, basaalmembraani peamist komponenti Laminiin-1 ning β 1-Integriini.

Bakalaureusetöö kokkuvõtteks tegime järgmised järeldused:

- Vanuses E13.5 ja E14.5 esinevad Ric8CKO embrüotel morfoloogilised erinevused võrreldes pesakonnakaaslastega, milleks on kompakteerumishäired vatsakeste vaheseinas, väiksemad ja hõredamad trabeekulid vatsakestes ning vaskulaarpõimikute kiirem välja arenemine
- Vanuses E14.5 esinesid Ric8CKO embrüotel vaskulaarpõimikute piirkonnas kõrgem Laminiin-1 ekspresioonitase
- Vanuses E14.5 ei tuvastanud me Ric8CKO ja tema pesakonnakaaslaste puhul β 1-Integriini ekspresioonitaseme muutust
- Vanuses E14.5 leidsime, et Ric8CKO embrüotel on $G\alpha_{13}$ ekspresioon vaskulaarpõimikute piirkonnas ja aordi ümbruses alla reguleeritud, kuid ei suutnud tuvastada erinevust α SMA positiivsete rakkude hulgas eelpool nimetatud piirkondades
- Vanuses E14.5 leidsime, et kontrollembrüote vaskulaarpõimikute piirkonnas on $G\alpha_{13}$ ja α SMA kolokalisatsioon suurem ning α SMA filamentid moodustavad rakke ühendavaid struktuure, seevastu Ric8CKO hiireliinil kolokalisatsioon peaaegu puudus ning rakkudel ei olnud üksteisega filamentide kaudu ühendatud

RESÜMEE/SUMMARY

Nestin-cre;Ric8a mutant mouse's heart development during the formation of coronary arteries

Hanna Antson

Summary

Cardiogenesis can be considered to be one of the most important stages of organogenesis, which ensures the possibility of further development of the embryo. Consequently, defects in the development of the heart can lead to embryonic lethality at the early stages of development.

Coronary arteries arise in the heart of the mouse at the age of E16 and their main function is to supply the heart with oxygenated blood and nutrients. Their development begins at the early stages of cardiogenesis by the formation of the vascular plexus regions, which is associated with the correct differentiation, migration and adhesion of the neural crest cell derivatives.

Neural crest cell derivatives, which arise from pluripotent neural crest cells, contribute to different development of various cardiac structures, including outflow tracks and coronary arteries. Correct differentiation, migration and adhesion of cells originating from the neural crest are associated with G-protein-regulated signaling pathways. RIC-8 is a molecular chaperon and a guanine exchange factor for G-proteins, which results in a normal level of G-proteins in the cell, and the amplified and prolonged signal transmitted by them. In our mouse line, *Ric8* was removed from the Nestin-cre positive cells. Therefore, we wanted to investigate what effect G-proteins and G-protein-regulated downstream signaling pathways have on a developing heart.

The aim of this Bachelor's thesis was to investigate mouse cardiogenesis and describe possible defects, in the heart of the *Nestin-Cre;Ric8a* conditional mice at the age E13.5 and E14.5. To investigate the causes of defects earlier found in P0 mice, we focused our attention to the vascular plexus region. We also wanted to investigate what might have been the cause of the defects. Therefore we examined the neural crest marker, α SMA, the direct interaction

partner of RIC-8A, $\text{G}\alpha 13$, the main component of the basement membrane, Laminin-1, and Laminin-1's main receptor, $\beta 1$ -Integrin.

To conclude the bachelor thesis, we made the following conclusions:

- At the ages E13.5 and E14.5, we detected morphological differences between Ric8CKO embryos and its littermates. Mutant mice had compaction disturbance in the ventricular septum, smaller and thinner trabecula carneae and faster development of the vascular plexuses
- *At the* age E14.5, the Ric8CKO embryos showed a higher expression of Laminin-1 in the vascular plexus area
- At the age E14.5, we did not detect difference in the expression level of $\beta 1$ -integrin between Ric8CKO mutant mice and its littermates
- At the age E14.5, we detected that in Ric8CKO embryos the $\text{G}\alpha 13$ expression was downregulated in the plexuses and around the aorta, but we could not detect the difference between α SMA positive cells in the abovementioned regions
- At the age E14.5, we found that control mice in the area of the plexuses larger than the $\text{G}\alpha 13$ and α SMA colocalization and form nucleus-forming structures, whereas, on the Ric8CKO mouse line, the colocalization was almost absent, and the cells did not have a structure interconnec

KIRJANDUSE LOETELU

Artiklid

- Afshar, K., Willard, F.S., Colombo, K., Johnston, C.A., McCudden, C.R., Siderovski, D.P., Gönczy, P. (2004) RIC-8 is required for GPR-1/2-dependent $G\alpha$ function during asymmetric division of *C. elegans* embryos. *Cell* 119 (2): 219–230.
- Afshar, K., Willard, F.S., Colombo, K., Siderovski, D.P., Gönczy, P. (2005) Cortical localization of the $G\alpha$ protein GPA-16 requires RIC-8 function during *C. elegans* asymmetric cell division. *Development* 132 (20): 4449–4459.
- Anderson, R.H., Brown, N.A., Moorman, A.F.M., 2006. Development and structures of the venous pole of the heart. *Developmental Dynamics* 235 (1): 2-9
- Arima, Y., Miyagawa-Tomita, S., Maeda, K., ... Kurihara, H. (2012) Endothelin signalling. *Nature Communications* 3: 1211–1267.
- Bastiani, C., Mendel, J. (2006) Heterotrimeric G proteins in *C. elegans*. *WormBook*: 1–25.
- Belkin, A.M., Stepp, M.A., 2000. Integrins as receptors for laminins. *Microscopy Research and Technique* 51 (3): 280-301
- Bogers, A.J., Gittenberger-de Groot, A.C., Poelmann, R.E., Péault, B.M., Huysmans, H.A. (1989) Development of the origin of the coronary arteries, a matter of ingrowth or outgrowth? *Anatomy and Embryology* 180(5): 437–441.
- Chan, P., Thomas, C.J., Sprang, S.R., Tall, G.G. (2013) Molecular chaperoning function of Ric-8 is to fold nascent heterotrimeric G protein α subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 (10): 3794–3799.
- Chen, H.I., Sharma, B., Akerberg, B.N., ... K., Red-Horse, K. (2014) The sinus venosus contributes to coronary vasculature through VEGFC-stimulated angiogenesis. *Development* 141 (23): 4500–12.
- David, N.B., Martin, C. a, Segalen, M., Rosenfeld, F., Schweisguth, F., Bellaïche, Y. (2005) *Drosophila* Ric-8 regulates $G\alpha_i$ cortical localization to promote $G\alpha_i$ -dependent planar orientation of the mitotic spindle during asymmetric cell division. *Nature Cell Biology* 7 (11): 1083–1090.
- Dettlaff-Swiercz, D.A., Wettschureck, N., Moers, A., Huber, K., Offermanns, S. (2005) Characteristic defects in neural crest cell-specific $G\alpha_q$ / $G\alpha_{11}$ - and $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ -deficient mice. *Developmental Biology* 282 (1): 174–182.

- Esni, F., Stoffers, D.A., Takeuchi, T., Leach, S.D. (2004) Origin of exocrine pancreatic cells from nestin-positive precursors in developing mouse pancreas. *Mechanisms of Development* 121 (1): 15–25.
- Figuerola, M., Hinrichs, M.V., Bunster, M., Babbitt, P., Martinez-Oyanedel, J., Olate, J. (2009) Biophysical studies support a predicted superhelical structure with armadillo repeats for Ric-8. *Protein Science* 18 (6): 1139–1145.
- Fuentealba, J., Toro-Tapia, G., Arriagada, C., ... Torrejón, M. (2013) Ric-8A, a guanine nucleotide exchange factor for heterotrimeric G proteins, is critical for cranial neural crest cell migration. *Developmental Biology* 378 (2): 74–82.
- Gabay, M., Pinter, M.E., Wright, F.A., Chan, P., Murphy, A.J., Valenzuela, D.M., Yancopoulos, G.D., Tall, G.G. (2011) Ric-8 proteins are molecular chaperones that direct nascent G protein α subunit membrane association. *Science Signaling* 4 (200): ra79.
- Gong, H., Shen, B., Flevaris, P., Chow, C., Lam, S.C.-T., Voyno-Yasenetskaya, T.A., Kozasa, T., Du, X. (2010) G protein subunit $G\alpha_{13}$ binds to integrin $\alpha IIb\beta 3$ and mediates integrin „outside-in“ signaling. *Science* 327 (5963): 340–343.
- Hampoelz, B., Hoeller, O., Bowman, S.K., Dunican, D., Knoblich, J. (2005) *Drosophila* Ric-8 is essential for plasma-membrane localization of heterotrimeric G proteins. *Nature Cell Biology* 7 (11): 1099–1105.
- Icardo, J.M., Colvee, E. (2001) Origin and course of the coronary arteries in normal mice and in iv/iv mice. *Journal of Anatomy* 199 (Pt 4): 473–482.
- Kachinsky, A.M., Dominov, J.A., Miller, J.B. (1995) Intermediate filaments in cardiac myogenesis: nestin in the developing mouse heart. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 43 (8): 843–847.
- Kachinsky, A.M., Dominov, J.A., Miller, J.B. (1994) Myogenesis and the intermediate filament protein, nestin. *Developmental Biology* 165 (1): 216–228.
- Kask, K., Ruisu, K., Tikker, L., Karis, K., Saare, M., Meier, R., Karis, A., Tõnissoo, T., Pooga, M. (2015) Deletion of RIC8A in neural precursor cells leads to altered neurogenesis and neonatal lethality of mouse. *Developmental Neurobiology* 75 (9): 984–1002.
- Kataria, R., Xu, X., Fusetti, F., Keizer-Gunnink, I., Jin, T., van Haastert, P.J.M., Kortholt, A. (2013) *Dictyostelium* Ric8 is a nonreceptor guanine exchange factor for heterotrimeric G proteins and is important for development and chemotaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*

- A. 110 (16): 6424–6429.
- Lambert, J.M., Bongers, R.S., Kleerebezem, M. (2007) Cre-lox-based system for multiple gene deletions and selectable-marker removal. *Applied and Environmental Microbiology* 73 (4): 1126-1135
- Le, Y., Sauer, B. (2001) Conditional Gene Knockout Using Cre Recombinase. 17.
- Li, L., Mignone, J., Yang, M., Matic, M., Penman, S., Enikolopov, G., Hoffman, R.M. (2003) Nestin expression in hair follicle sheath progenitor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (17): 9958-9961.
- Liu, J., Ji, X., Li, Z., Zheng, H., Zheng, W., Jia, J., Shen, H., Zhang, Q., An, J. (2015) Nestin overexpression promotes the embryonic development of heart and brain through the regulation of cell proliferation. *Brain Research* 1610: 1-11.
- Lothian, C., Prakash, N., Lendahl, U., Wahlström, G.M. (1999) Identification of both general and region-specific embryonic CNS enhancer elements in the nestin promoter. *Experimental Cell Research* 248 (2): 509-519
- Ma, S., Kwon, H.J., Huang, Z. (2012) Ric-8a, a guanine nucleotide exchange factor for heterotrimeric G proteins, regulates bergmann glia-basement membrane adhesion during cerebellar foliation. *The Journal of Neuroscience* 32 (43): 14979–14993.
- Miller, K.G., Alfonso, a, Nguyen, M., Crowell, J. a, Johnson, C.D., Rand, J.B. (1996) A genetic selection for *Caenorhabditis elegans* synaptic transmission mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 (22): 12593–12598.
- Miller, K.G., Emerson, M.D., McManus, J.R., Rand, J.B. (2000) RIC-8 (Synembryn): a novel conserved protein that is required for G(q)α signaling in the *C. elegans* nervous system. *Neuron* 27 (2): 289-299.
- Miller, K.G., Rand, J.B. (2000) A role for RIC-8 (synembryn) and GOA-1 (G(o)α) in regulating a subset of centrosome movements during early embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 156 (4): 1649-1660.
- Morabito, C.J., Kattan, J., Bristow, J. (2002) Mechanisms of embryonic coronary artery development. *Current Opinion in Cardiology* 17 (3): 235-241.
- Nagayoshi, S., Hayashi, E., Abe, G., ... Kawakami, K. (2007) Insertional mutagenesis by the Tol2 transposon-mediated enhancer trap approach generated mutations in two developmental genes: *tcf7* and *synembryn*-like. *Development* 135 (1): 159-169.
- Park, D., Xiang, A.P., Mao, F.F., ... N., Lahn, B.T. (2010) Nestin is required for the proper self-renewal of neural stem cells. *Stem Cells* 28 (12): 2162-2171.

- Pérez-Pomares, J.M., Macías, D., García-Garrido, L., Muñoz-Chápuli, R. (1997) Contribution of the primitive epicardium to the subepicardial mesenchyme in hamster and chick embryos. *Developmental Dynamics* 210 (2): 96–105.
- Pires-Gomes, A., Pérez-Pomares, J. (2013) The Epicardium and Coronary Artery Formation. *Journal of Developmental Biology* 1: 186–202.
- Red-Horse, K., Ueno, H., Weissman, I.L., Krasnow, M.A. (2010) Coronary arteries form by developmental reprogramming of venous cells. *Nature* 464 (7288): 549–553.
- Rienks, M., Papageorgiou, A.P., Frangogiannis, N.G., Heymans, S. (2014) Myocardial extracellular matrix: An ever-changing and diverse entity. *Circulation Research* 112 (5): 872–888.
- Romo, X., Pastén, P., Martínez, S., Soto, X., Lara, P., De Arellano, A.R., Torrejón, M., Montecino, M., Hinrichs, M.V., Olate, J. (2008) X_{Ric}-8 is a GEF for G α and participates in maintaining meiotic arrest in *Xenopus laevis* oocytes. *Journal of Cellular Physiology* 214 (3): 673–680.
- Ruisu, K., Meier, R., Kask, K., Tõnissoo, T., Velling, T., Pooga, M. (2017) RIC8A is essential for the organisation of actin cytoskeleton and cell-matrix interaction. *Experimental Cell Research*: 1–11.
- Sauer, B., Henderson, N. (1988) Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85: 5166–5170.
- Sternberg, N. (1981) Bacteriophage P1 site-specific recombination. *Journal of Molecular Biology* 150 (4): 603–608.
- Tall, G.G., Krumins, A.M., Gilman, A.G. (2003) Mammalian Ric-8A (synembryn) is a heterotrimeric G α protein guanine nucleotide exchange factor. *Journal of Biological Chemistry* 278 (10): 8356–8362.
- Tamura, Y., Matsumura, K., Sano, M., ... H., Fukuda, K. (2011) Neural crest-derived stem cells migrate and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 31 (3): 582–589.
- Thomas, C.J., Tall, G.G., Adhikari, A., Sprang, S.R. (2008) Ric-8A catalyzes guanine nucleotide exchange on G α 1 bound to the GPR/GoLoco exchange inhibitor AGS3. *Journal of Biological Chemistry* 283 (34): 23150–23160.
- Tian, X., Hu, T., He, L., ... Zhou, B. (2013) Peritruncal coronary endothelial cells contribute to proximal coronary artery stems and their aortic orifices in the mouse heart. *PLoS One* 8 (11): 1–9.

- Timpl, R. (1996) Macromolecular organization of basement membranes. *Current Opinion in Cell Biology* 8 (5): 618-624.
- Tomanek, R.J. (2005) Formation of the coronary vasculature during development. *Angiogenesis* 8 (3): 273-284.
- Tõnissoo, T., Kõks, S., Meier, R., Raud, S., Plaas, M., Vasar, E., Karis, A. (2006) Heterozygous mice with Ric-8 mutation exhibit impaired spatial memory and decreased anxiety. *Behavioural Brain Research* 167 (1): 42–48.
- Tõnissoo, T., Lulla, S., Meier, R., Saare, M., Ruisu, K., Pooga, M., Karis, A. (2010) Nucleotide exchange factor RIC-8 is indispensable in mammalian early development. *Developmental Dynamics* 239 (12): 3404–3415.
- Tõnissoo, T., Meier, R., Talts, K., Plaas, M., Karis, A. (2003) Expression of ric-8 (synembryn) gene in the nervous system of developing and adult mouse. *Gene Expression Patterns* 3 (5): 591–594.
- Wagner, N., Wagner, K.-D., Scholz, H., Kirschner, K.M., Schedl, A. (2006) Intermediate filament protein nestin is expressed in developing kidney and heart and might be regulated by the Wilms' tumor suppressor Wt1. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 291 (3): 779–787.
- Waldo, K.L., Lo, C.W., Kirby, M.L. (1999) Connexin 43 expression reflects neural crest patterns during cardiovascular development. *Developmental Biology* 208 (2): 307–323.
- Wang, H., Ng, K.H., Qian, H., Siderovski, D.P., Chia, W., Yu, F. (2005) Ric-8 controls *Drosophila* neural progenitor asymmetric division by regulating heterotrimeric G proteins. *Nature Cell Biology* 7 (11): 1091–1098.
- Wang, L., Guo, D., Xing, B., Zhang, J.J., Shu, H.B., Guo, L., Huang, X.Y. (2011) Resistance to inhibitors of cholinesterase-8A (Ric-8A) is critical for growth factor receptor-induced actin cytoskeletal reorganization. *Journal of Biological Chemistry* 286 (35): 31055–31061.
- Webb, S., Anderson, R.H., Lamers, W.H., Brown, N. (1999) Mechanisms of deficient cardiac septation in the mouse with trisomy 16. *Circulation Research* 84 (8): 897–905.
- Webb, S., Qayyum, S.R., Anderson, R.H., Lamers, W.H., Richardson, M.K. (2003) Septation and separation within the outflow tract of the developing heart. *Journal of Anatomy* 202 (4): 327–342.
- Wessels, A., Sedmera, D. (2003) Developmental anatomy of the heart: a tale of mice and man. *Physiological genomics* 15 (3): 165–176.

- Viragh, S., Challice, C.E. (1981) The origin of the epicardium and the embryonic myocardial circulation in the mouse. *The Anatomical Record* 201 (1): 157–168.
- Wright, S.J., Inchausti, R., Eaton, C.J., Krystofova, S., Borkovich, K. (2011) RIC8 is a guanine-nucleotide exchange factor for G α subunits that regulates growth and development in *Neurospora crassa*. *Genetics* 189 (1): 165–176.
- Yang, H., Borg, T.K., Liu, H., Gao, B.Z. (2015) Interactive relationship between basement-membrane development and sarcomerogenesis in single cardiomyocytes. *Experimental Cell Research* 330 (1): 222–232.

Raamatud

- Kaufman M.H., Bard J.B.L. (1999) *The Anatomical Basis of Mouse Development*. Academic Press, San Diego.
- Kirby, M.L. (2007) Cardiogenic Fields and Heart Tube Formation, p. 36-49. *In* Kirby, M.L. *Cardiac Development*. Oxford University Press.
- Kirby, M.L. (2007) Molecular Control of Looping, p. 102-117. *In* Kirby, M.L. *Cardiac Development*. Oxford University Press.
- Kirby, M.L. (2007) Epicardium and Coronary Vessel Development, p. 148-157. *In* Kirby, M.L. *Cardiac Development*. Oxford University Press.
- Kirby, M.L. (2007) Neural Crest, Great Arteries, and Outflow Septation, p. 158-175 *In* Kirby, M.L. *Cardiac Development*. Oxford University Press.

Bakalaureusetööd

- Hurt, P. (2015) *Nestin-cre;Ric8a* konditsionaalse mutantse hiire (*Mus musculus*) kaasasündinud südame arengudefektid.

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina Hanna Antson (sünnikuupäev: 14. jaanuar 1994)

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

Nestin-cre;Ric8a mutantse hiire südame areng pärgarterite tekkimise ajal,

mille juhendajad on Raivo Raid ja Keiu Kask

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 25.08.2019 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, 25.08.2017